

**Entwicklung molekularbiologischer und
serologischer Methoden zum Nachweis von
Infektionen mit dem humanen Bocavirus und
dem Polyomavirus WU**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**vorgelegt von Florian Neske
geb. in Frankfurt/Main**

Würzburg 2009

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Rethwilm

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation

„Entwicklung molekularbiologischer und serologischer Methoden zum Nachweis von Infektionen mit dem humanen Bocavirus und dem Polyomavirus WU“

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher, noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Langen, den

.....
(Florian Neske)

Die vorliegende kumulative Doktorarbeit umfasst die folgenden Veröffentlichungen:

1. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections (2006)

Benedikt Weissbrich, Florian Neske, Jörg Schubert, Franz Tollmann, Katharina Blath, Kerstin Blessing and Hans-Wolfgang Kreth

Mein Anteil an dieser Veröffentlichung war die Testung der respiratorischen Proben mittels qualitativer PCR auf DNA des humanen Bocavirus, die Datenauswertung und Mitarbeit am Manuskript.

Mit den folgenden Unterschriften wird bestätigt, dass Florian Neske den von ihm aufgeführten Anteil an dieser Veröffentlichung geleistet hat.

..... Florian Neske Prof. Dr. Axel Rethwilm Dr. Benedikt Weißbrich
..... Dr. Kerstin Blessing Dr. Jörg Schubert Dr. Franz Tollmann
..... Katharina Blath Prof. Dr. Hans-Wolfgang Kreth	

2. Real-Time PCR for Diagnosis of Human Bocavirus Infections and Phylogenetic Analysis (2007)

Florian Neske, Kerstin Blessing, Franz Tollmann, Jörg Schubert, Axel Rethwilm, Hans-Wolfgang Kreth, and Benedikt Weissbrich

In dieser Arbeit habe ich die quantitative real-time-PCR zur Detektion von DNA des humanen Bocavirus in Nasenrachensekreten, Serum- und Stuhlproben etabliert und die Testung der respiratorischen Proben durchgeführt. Ferner habe ich die phylogenetische Untersuchung des humanen Bocavirus anhand des VP2-Gens behandelt. Die Daten wurden von mir ausgewertet und ich habe an der Erstellung des Manuskripts mitgearbeitet.

Mit den folgenden Unterschriften wird bestätigt, dass Florian Neske den von ihm aufgeführten Anteil an dieser Veröffentlichung geleistet hat.

.....
Florian Neske Prof. Dr. Axel Rethwilm Dr. Benedikt Weißbrich

.....
Dr. Kerstin Blessing Dr. Jörg Schubert Dr. Franz Tollmann

.....
Prof. Dr. Hans-Wolfgang Kreth

3. WU Polyomavirus Infection in Children, Germany (2008)

Florian Neske, Kerstin Blessing, Franziska Ullrich, Anika Prötzel, Hans Wolfgang Kreth, and Benedikt Weissbrich

Für diese Veröffentlichung habe ich das Testverfahren einer qualitativen PCR zur Detektion von Polyomavirus-WU DNA bei Kindern mit akuter respiratorischer Erkrankung etabliert und die Durchführung der Testung der respiratorischen Proben betreut. Die Daten wurden von mir ausgewertet und ich habe an der Erstellung des Manuskripts mitgearbeitet.

Mit den folgenden Unterschriften wird bestätigt, dass Florian Neske den von ihm aufgeführten Anteil an dieser Veröffentlichung geleistet hat.

.....
Florian Neske Prof. Dr. Axel Rethwilm Dr. Benedikt Weißbrich

.....
Dr. Kerstin Blessing Franziska Ullrich Anika Prötzel

.....
Prof. Dr. Hans-Wolfgang Kreth

4. Detection of WU polyomavirus DNA in nasopharyngeal samples, serum and stool by real-time (2009)

Florian Neske, Kerstin Blessing, Anika Pröttel, Franziska Ullrich, Hans-Wolfgang Kreth, Benedikt Weissbrich

Bei dieser Veröffentlichung habe ich die quantitative real-time-PCR zur Detektion von Polyomavirus-WU DNA in Nasenrachensekreten, Serum- und Stuhlproben etabliert und die Bestimmung der Polyomavirus-WU DNA-Menge in den Proben betreut. Die Daten wurden von mir ausgewertet und ich habe an der Erstellung des Manuskripts mitgearbeitet.

Mit den folgenden Unterschriften wird bestätigt, dass Florian Neske den von ihm aufgeführten Anteil an dieser Veröffentlichung geleistet hat.

.....
Florian Neske Prof. Dr. Axel Rethwilm Dr. Benedikt Weißbrich

.....
Dr. Kerstin Blessing Franziska Ullrich Anika Pröttel

.....
Prof. Dr. Hans-Wolfgang Kreth

5. Prolonged Detection of human bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of children with respiratory tract disease (in press)

Kerstin Blessing, Florian Neske, Ulla Herre, Hans-Wolfgang Kreth, Benedikt Weissbrich

Die Virus-Last-Bestimmung und Sequenzierung der auf das humane Bocavirus positiv getesteten Proben wurde von mir durchgeführt und ausgewertet. Ferner habe ich an der Erstellung des Manuskripts mitgearbeitet.

Mit den folgenden Unterschriften wird bestätigt, dass Florian Neske den von ihm aufgeführten Anteil an dieser Veröffentlichung geleistet hat.

..... Florian Neske Prof. Dr. Axel Rethwilm Dr. Benedikt Weißbrich
..... Dr. Kerstin Blessing Dr. Ulla Herre Prof. Dr.Hans-Wolfgang Kreth

6. High prevalence of antibodies against polyomavirus WU, polyomavirus KI, and human bocavirus in German blood donors (submitted)

Florian Neske, Christiane Prifert, Jörg Schubert, Barbara Scheiner, Moritz Ewald, Andreas Opitz, Benedikt Weissbrich

Für diese Arbeit habe ich den Immunfluoreszenztest für gegen das humane Bocavirus und das Polyomavirus gerichtete IgG entwickelt und die Bestimmung der Seroprävalenz bei gesunden Erwachsenen für diese beiden Viren durchgeführt. Die Daten wurden von mir ausgewertet und ich habe an der Erstellung des Manuskripts mitgearbeitet.

Mit den folgenden Unterschriften wird bestätigt, dass Florian Neske den von ihm aufgeführten Anteil an dieser Veröffentlichung geleistet hat.

..... Florian Neske Prof. Dr. Axel Rethwilm Dr. Benedikt Weißbrich
..... Dr. Jörg Schubert Dr. Andreas Opitz Moritz Ewald
..... Barbara Scheiner Christiane Prifert	

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Herrn Prof. Dr. A. Rethwilm für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Bereitschaft mich als Doktorand anzunehmen.

Herrn Dr. B. Weißbrich für das interessante Thema, seine Betreuung und die Hilfe bei wissenschaftlichen Problemen.

Herrn Prof. Dr. J. Kreft für die Bereitschaft als Zweitgutachter dieser Arbeit zu fungieren.

Den TA's der Virusdiagnostik für das nette Arbeitsklima und ihre praktische Unterstützung, im Besonderen Julia Becker, Irina Hensel, Miriam Mildner und Barbara Scheiner.

Dem Büroteam Miriam und Karin für die nette Atmosphäre zwischen den Experimenten.

Meinen Mitstreitern Anika Pröttel, Franziska Ulrich, Friederike Ruf, Maria Thomas, Daniel Schneiderbanger, Moritz Ewald, Christiane Prifert, Kerstin Blessing, Jörg Schubert, Ulla Herre, Adriana Balasiu, Katharina Godzik und Daniel Matthes für die gute Zusammenarbeit und ihren Humor im Laboralltag.

Meinem Vater für seine Unterstützung, Motivation und Vertrauen.

Tillmann für seine Geduld sich meine Probleme wieder und wieder anzuhören und mich in allen Lebenslagen zu begleiten.

Meiner Frau und meinen Töchtern, ihr seid das was wirklich zählt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
Einleitung:	5
Virale Erreger von respiratorischen Infektionen	5
Das humane Bocavirus.....	6
Das Polyomavirus WU	8
Untersuchung der klinischen Relevanz von neu entdeckten Viren.....	8
Zielsetzung	10
Ergebnisse:	11
Arbeiten zum humanen Bocavirus	11
Untersuchung der hBoV-Infektionshäufigkeit durch qualitative PCR (Publikation 1) ...	11
Quantitative hBoV-real-time-PCR (Publikation 2).....	12
Verlaufsstudien bei Kindern mit hBoV-Infektion (Publikation 5).....	13
Phylogenetische Untersuchung von hBoV (Publikation 2).....	14
HBoV-Seroprävalenz bei gesunden Erwachsenen (Publikation 6).....	15
Veröffentlichte Arbeiten zum humanen Bocavirus.....	17
Arbeiten zum humanen Polyomavirus WU	52
Untersuchung der WUPyV-Infektionshäufigkeit durch qualitative PCR (Publikation 3).....	52
Quantitative WUPyV-real-time-PCR (Publikation 4).....	52
Phylogenetische Untersuchung von WUPyV (unpubliziert)	54
WUPyV-Seroprävalenz bei gesunden Erwachsenen (Publikation 6)	55
Veröffentlichte Arbeiten zum humanen Polyomavirus WU	57
Diskussion:	64
Das humane Bocavirus.....	64
Das Polyomavirus WU	70
Schlussfolgerung	74
Literaturverzeichnis	75
Anhang	78
1. Sequenzierprimer	78
2. Publikationen.....	80
3. Tagungsbeiträge	81
4. Lebenslauf	82

Zusammenfassung

Durch Viren ausgelöste Infektionen der Atemwege zählen zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen. Durch molekularbiologische Verfahren konnten in den vergangenen Jahren bis dahin unbekannte Viren in respiratorischen Proben nachgewiesen werden, darunter das humane Bocavirus (hBoV) in 2005 und das Polyomavirus WU (WUPyV) in 2007. In der vorliegenden Arbeit wurden qualitative und quantitative DNA-Nachweisverfahren für hBoV und WUPyV etabliert und validiert, um retrospektiv die Infektionshäufigkeit von hBoV und WUPyV bei hospitalisierten Kindern mit akuter respiratorischer Erkrankung (ARE) der Universitätskinderklinik Würzburg zu untersuchen. Zusätzlich wurden phylogenetische Untersuchungen dieser Viren durchgeführt. Zum Nachweis von Antikörpern gegen Kapsidproteine von hBoV und WUPyV wurde ein auf rekombinanten Baculoviren basierender Immunfluoreszenztest (IFT) etabliert.

hBoV-DNA konnte in 12 % von 834 untersuchten Nasenrachensekreten (NRS) von Kindern mit ARE aus dem Zeitraum von Januar 02 – September 05 detektiert werden. Das mediane Alter der hBoV-positiven Kinder war 1,8 Jahre, die mediane hBoV-Last betrug $4,9 \times 10^3$ Kopien/ml. Bei einem großen Teil (39,1 %) der hBoV-DNA-positiven Kinder wurden Koinfektionen mit anderen respiratorischen Viren detektiert, was jedoch keine signifikante Auswirkung auf die nachgewiesene hBoV-DNA-Menge hatte. Kinder mit Bronchitis wiesen eine signifikant höhere Viruslast auf als Kinder mit Fieberkrämpfen. Im Rahmen einer Verlaufsstudie konnte hBoV-DNA bei einem Kind über einen Zeitraum von 4,5 Monaten in NRS nachgewiesen werden.

Bei einem Teil der Kinder mit hBoV-DNA-positiven NRS wurden Serum- und Stuhlproben auf hBoV-DNA untersucht. In einer von 10 Serumproben und 14 von 31 Stuhlproben konnte hBoV-DNA nachgewiesen werden. Dabei war die hBoV-DNA-Menge im NRS signifikant höher, wenn die Stuhlprobe ebenfalls positiv war.

Die phylogenetische Analyse von hBoV bestätigte die vom Erstbeschreiber ermittelten Cluster (St1 und St2). Diese Cluster weisen eine hohe Identität zueinander auf, sowohl auf Nukleotid- ($\geq 99,6$ %) als auch auf Aminosäure (AS)-Ebene ($\geq 99,9$ %). Ein Zusammenhang zwischen den Clustern und klinischen oder virologischen Faktoren war nicht ersichtlich.

Die Untersuchung auf IgG-Antikörper gegen hBoV-VP2 ergab bei gesunden Erwachsenen eine Seroprävalenz von 74 %. Ein Zusammenhang zwischen Alter und Seropositivität für hBoV-VP2 war nicht erkennbar.

Die WUPyV-Untersuchungen wurden anhand von NRS durchgeführt, die im Zeitraum von Januar 02 – September 05 und Januar 07 – Juli 07 entnommen wurden. Dabei konnte

WUPyV-DNA bei 5,2 % der Proben mit einer medianen Viruslast von $9,5 \times 10^2$ Kopien/ml nachgewiesen werden. Das mediane Alter der WUPyV-infizierten Kinder betrug 3,0 Jahre. Bei 54,8 % der WUPyV-positiven Kinder konnte eine Koinfektion mit einem anderen respiratorischen Virus festgestellt werden, wobei keine Korrelation zwischen Koinfektion und WUPyV-DNA-Menge ersichtlich wurde. Eine Assoziation zwischen der WUPyV-Last in NRS und klinischer Diagnose war nicht feststellbar. In 3 von 14 Serum- und 2 von 14 Stuhlproben von Kindern mit WUPyV-DNA-positivem NRS konnte WUPyV-DNA detektiert werden. Dabei war die WUPyV-Last im NRS von Kindern mit positivem Serum höher als bei Kindern mit negativem Serum.

Durch die phylogenetischen Untersuchung von WUPyV konnten zwei Cluster mit hoher Nukleotid-Identität ($\geq 99,2$ %) ermittelt werden. Der Großteil (60,3 %) der Substitutionen war nicht synonym, was zu einer Identität auf AS-Ebene von 98,8 % führte. Von den AS-Mutationen waren 76 % Cluster-spezifisch.

Mit dem etablierten WUPyV-spezifischen IFT konnte bei gesunden Erwachsenen eine IgG-Seroprävalenz von 88 % für WUPyV ermittelt werden. Ein signifikanter Unterschied im medianen Alter zwischen Anti-WUPyV-VP1-positiven und -negativen Probanden konnte nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte durch die etablierten molekularen und serologischen Nachweisverfahren die Infektionshäufigkeit von hBoV und WUPyV bei Kindern mit ARE, die Phylogenie der Viren und die Seroprävalenz bei gesunden Erwachsenen erforscht werden. Die in den vorliegenden Studien ermittelten Infektionshäufigkeiten für hBoV und WUPyV deckten sich mit anderen Publikationen zur Epidemiologie von hBoV und WUPyV. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten keine offensichtlichen Assoziationen zwischen einer hBoV- oder WUPyV-Infektion und einer respiratorischen Erkrankung festgestellt werden. Zur Untersuchung der Pathogenität von hBoV und WUPyV sind daher noch weitere Studien notwendig.

Abstract

Respiratory tract infections are a major cause of human morbidity and are caused by a broad spectrum of microbial agents, mostly viruses. In recent years, the use of molecular biology methods led to the discovery of several novel viruses, including the human bocavirus (hBoV) in 2005 and the polyomavirus WU (WUPyV) in 2007. In this study, we established qualitative and quantitative polymerase chain reaction assays for both viruses in order to investigate their genoprevalence in hospitalized children with acute respiratory diseases (ARD). Furthermore, phylogenetic analyses of hBoV and WUPyV were performed. In order to study the antibody response against hBoV and WUPyV, immunofluorescence assays (IFA) based on recombinant baculoviruses were established for both viruses.

Nasopharyngeal aspirates (NPA) from the period of January 02 to September 05 of hospitalized children with ARD were retrospectively tested for the presence of hBoV DNA. We found that 12 % of the NPA were positive for hBoV DNA. The median age of hBoV DNA-positive children was 1,8 years and the median hBoV load in NPA was 4.9×10^3 copies/ml. Coinfections with other respiratory viruses were detected in 39,1 % of the hBoV DNA-positive NPA. There was no difference of the hBoV load in NPA between children with or without known coinfection, but the load was significantly higher in children with bronchitis than in children with the diagnosis of febrile seizures. In follow-up studies, hBoV DNA shedding was detected for a maximum period of 4.5 months.

hBoV DNA was found in 1 of 10 serum samples and in 14 of 31 stool samples of children with hBoV DNA-positive NPA. The hBoV load in NPA was significantly higher for children with positive stool samples.

Phylogenetic analysis of hBoV confirmed the previously suggested clusters St1 and St2. The nucleotide and amino acid identity between the clusters was very high (≥ 99.6 % and ≥ 99.9 %, respectively). An association of the clusters with virological or clinical parameters was not apparent.

Using an IFA to detect IgG against hBoV VP2 antigen, the seroprevalence for hBoV in healthy adults was found to be 74 %. There was no association between age and seropositivity in the study population.

WUPyV DNA was analysed in 1232 NPA, which had been collected from 2002 to 2007, and was found in 5.2 % of these samples with a median WUPyV load of 9.5×10^2 copies/ml. Coinfections were found in 54.8 % of the WUPyV DNA-positive NPA. The median age of the WUPyV DNA-positive children was 3.0 years. The WUPyV load in NPA was neither

associated with the coinfection status nor with the clinical diagnoses. WUPyV DNA was found in 3 of 14 serum samples and in 2 of 14 stool samples of WUPyV DNA-positive children. The WUPyV load in NPA tended to be higher in viremic children.

Two different WUPyV clusters with high nucleotide-identity ($\geq 99\%$) were found by phylogenetic analysis. A high number (60.3 %) of nucleotide substitutions was non-synonymous, resulting in 46 amino acid mutations and 98.8 % amino acid identity. Of the amino acid mutations, 76 % were specific for the two clusters.

The IgG seroprevalence for WUPyV among healthy adults was 88 % as determined by IFA based on Sf9 cells expressing WUPyV VP1. As seen with hBoV, there was no association between age and seropositivity.

In conclusion, we investigated the genoprevalence of hBoV and WUPyV in children with ARD and the seroprevalence in healthy adults. The results of our studies were in agreement with other publications on the epidemiology and serology of hBoV and WUPyV. No obvious association between infection with hBoV or WUPyV and clinical diagnosis was apparent. The methods established and evaluated in this thesis can be applied for further studies to investigate the pathogenicity of hBoV and WUPyV.

Einleitung:

Virale Erreger von respiratorischen Infektionen

Infektionen der Atemwege zählen zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen. Die dabei auftretenden Krankheitsbilder können in Infekte der oberen Atemwege (IOA) und der unteren Atemwege (IUA) unterteilt werden. Zu den IOA zählen z. B. Schnupfen, Husten, Pharyngitis oder Nebenhöhlenentzündungen, während sich IUA z. B. als Bronchitis, Bronchiolitis oder Pneumonie manifestieren. Atemwegsinfektionen werden oft durch Viren ausgelöst. Zu den „klassischen“ respiratorischen Viren zählen u. a. Rhinoviren, das respiratorische Syncytial Virus (RSV), Influenzaviren A und B (Inf), Parainfluenzaviren 1 – 4 (PIV) und Adenoviren (AdV) (Tyrell, D. A. J., 1996). Die genannten Erreger sind durch Zellkultur anzüchtbar und wurden durch diese Methodik im Laufe des letzten Jahrhunderts entdeckt (Doerr, H. W., 2002).

In den vergangenen Jahren wurden mehrere bis dahin unbekannte Viren bei Patienten mit akuten Erkrankungen des respiratorischen Traktes entdeckt. Diese Viren konnten zum Teil durch Anzucht in Zellkultur und anschließende Sequenzanalyse klassifiziert werden, wie im Falle des humanen Metapneumovirus (van den Hoogen, B. G. et al., 2001), des SARS-assoziierten Coronavirus (Drosten, C. et al., 2003) und des Coronavirus NL63 (van der, Hoek L. et al., 2004). Im Falle von NL63 wurde z.B. eine Methodik verwendet, die sich der Restriktionsschnittstellen des viralen Genoms bedient. Nach reverser Transkription und Verdau der cDNA mit Restriktionsenzymen wurde die fragmentierte DNA mit bekannten Nukleotid-Sequenzen ligiert. Diese Nukleotid-Sequenzen am 3'- und 5'-Ende dienten dann als Startpunkt für die nachfolgende Amplifizierung und Sequenzierung (van der, Hoek L. et al., 2004). Diese Methode war jedoch auf große Mengen aus dem Überstand einer Zellkultur angewiesen und kann daher bei der Erforschung nicht kultivierbarer Viren nicht angewandt werden. Eine andere Möglichkeit war die Suche nach neuen Erregern bereits bekannter Virusgenera mittels konservierter Sequenzen, wie im Falle des Coronavirus HKU1 (Woo, P. C. et al., 2005). Die Voraussetzung, um neue Viren auf einem dieser beiden Wege nachzuweisen, ist jedoch eine Replikation des Virus in Zellkultur und/oder die Kenntnis verwandter Sequenzen, anhand derer Primer in konservierten Regionen hergestellt werden können. Die Limitationen, die sich hieraus ergeben, sind offensichtlich.

Im Jahre 2005 wurde eine andere Methodik von einer schwedischen Arbeitsgruppe um Tobias Allander beschrieben, die nicht länger auf Zellkultur oder konservierte Sequenzen angewiesen war (Allander, T. et al., 2005). Dabei wurden respiratorische Proben mehrerer Patienten

gepoolt und aus diesem Pool DNA bzw. RNA extrahiert, welche im Anschluss mittels Primern mit zufälliger Sequenzfolge und reverser Transkriptase bzw. DNA-Polymerase amplifiziert wurde. Die dadurch entstandenen DNA-Fragmente wurden nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese in Vektoren kloniert und in *E.coli* transformiert. DNA aus Einzelkolonien wurde mittels „rolling circle“-Amplifikation enzymatisch vermehrt und anschließend mit Vektor-spezifischen Primern sequenziert. Die Sequenzen wurden dann mit schon bekannten Sequenzen verglichen. Durch diese Hochdurchsatz-Sequenzierung konnten schließlich das humane Bocavirus (hBoV) (Allander, T. et al., 2005) und zwei Jahre später das Polyomavirus KI (KIPyV) (Allander, T. et al., 2007a) entdeckt und komplett sequenziert werden.

Die Methodik wurde von einer amerikanisch-australischen Arbeitsgruppe um Anne Gaynor aufgegriffen und führte zur Entdeckung des Polyomavirus WU (WUPyV) (Gaynor, A. M. et al., 2007).

In der vorliegenden Dissertation werden molekularbiologische und serologische Methoden zum Nachweis von Infektionen mit hBoV und WUPyV beschrieben.

Das humane Bocavirus

Das hBoV wurde aufgrund von Sequenz-Homologien der Familie der *Parvoviridae*, Genus Bocavirus zugeordnet (Allander, T. et al., 2005). Zu dem Genus Bocavirus zählten bis dahin die Tierpathogene Bovines Parvovirus (BPV) und Minute Virus of Canine (MVC). Das hBoV ist das erste Virus dieses Genus, welches beim Menschen nachgewiesen wurde.

Parvoviren sind unbehüllte linear einzelsträngige DNA-Viren mit einem Genom von ~5000 bp, welches im Falle der Bocaviren für 4 Gene in 3 Leserastern (ORF) codiert. Diese Gene codieren für die Nichtstrukturproteine NS1 und NP1 sowie die Kapsidproteine VP1 und

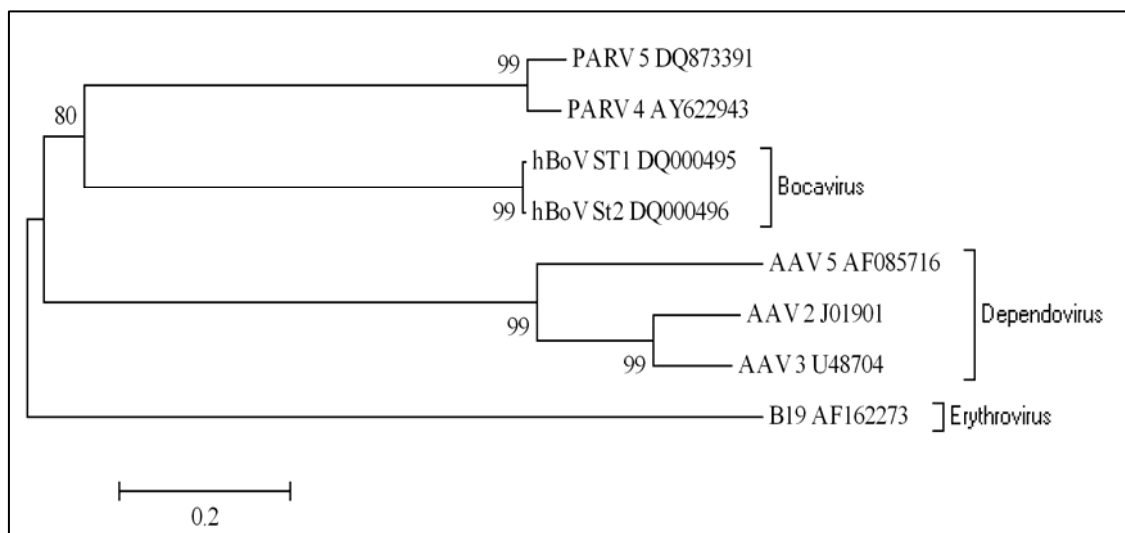


Abb. 1: Viren der Familie der Parvoviridae. Bootstrap-Werte nach interior branch test sind an den Knotenpunkten aufgeführt.

VP2. Vertreter der Parvoviren die den Menschen infizieren können, sind die Adeno-assoziierten Viren (AAV), Parvovirus B19 und die kürzlich beschriebenen Parvovirus 4 (PARV 4) und Parvovirus 5 (PARV5). Wie anhand Abbildung 1 gut zu erkennen, gehören die humanpathogenen Parvoviren unterschiedlichen Genera an, wobei PARV 4 und PARV 5 keinem bisher bekannten Genus zugeordnet werden konnten. AAV sind zur Replikation im Wirt auf eine Koinfektion mit Adeno-, Vaccinia, oder Herpesviren angewiesen. Trotz einer hohen Durchseuchungsrate konnte bis heute noch kein Krankheitsbild mit einer AAV-Infektion in Verbindung gebracht werden (Modrow, S., 2003). PARV 4 wurde erstmals 2004 beschrieben (Jones, M. S. et al., 2005) und wurde in der Plasmaprobe eines Patienten mit Hepatitis B Infektion nachgewiesen. PARV 5 wurde von der gleichen Arbeitsgruppe in gepoolten Plasmaproben entdeckt (Fryer, J. F. et al., 2006). Allerdings ist bis heute unklar, ob es sich bei PARV 4 und PARV 5 um krankheitsauslösende Viren handelt (Fryer, J. F. et al., 2007). Das am besten charakterisierte humanpathogene Virus der Familie der Parvoviren ist das Parvovirus B19. Die primäre Infektion mit Parvovirus B19 erfolgt meist im Alter von 6-19 Jahren (Heegaard, E. D. and Brown, K. E., 2002), typischerweise unter dem klinischen Bild der Ringelröteln. Es können jedoch auch asymptomatische Verläufe beobachtet werden. Infektionen während der Schwangerschaft können zu Spontanaborten oder zum Hydrops fetalis führen. In Deutschland konnte bei gesunden Erwachsenen eine Seroprävalenz von 72 % festgestellt werden (Rohrer, C. et al., 2008).

Die Funktionen der Proteine wurden im Genus der Bocaviren noch nicht beschrieben, allerdings lassen Sequenzhomologien zu anderen Vertretern der Parvoviren Rückschlüsse zu. Das NS1-Protein von Parvovirus B19 ist ein multifunktionelles Protein, welches über ein Kernlokalisierungssignal verfügt. Im Zellkern hat es unter anderem die Funktion einer ATP-abhängigen Helikase, welche vermutlich bei der Replikation von Parvovirus B19 benötigt wird. Ferner ist NS1 ein Transaktivator, welcher in Wechselwirkung mit Zellfaktoren den Parvovirus B19-spezifischen Promotor induziert und wahrscheinlich auch zelluläre Promotoren beeinflusst (Modrow, S., 2003). Das Kapsid von Parvovirus B19 besteht zu ~90 % aus VP2, wobei VP2 post-transkriptional durch Spleißen aus VP1-RNA entsteht. Die „unique region“ des VP1 ist an der Kapsid-Oberfläche exponiert und dient im Falle von Parvovirus B19 als Angriffspunkt für die neutralisierende Immunantwort (Modrow, S., 2003). Das Nichtstrukturprotein NP1 ist spezifisch für das Genus Bocavirus. Da die Funktion von NP1 bei BPV und MVC noch unbekannt ist, kann für hBoV keine Verbindung zu homologen Proteinen anderer Viren hergestellt werden.

Die tierpathogenen Vertreter des Genus Bocavirus werden mit respiratorischen und gastrointestinalen Krankheitsbildern bei Kälbern (BPV) und Welpen (MVC) in Verbindung gebracht (Durham, P. J. et al., 1985; Steinel, A. et al., 2001). In seltenen Fällen können Infektionen von tragenden Kühen (BPV) oder Hündinnen (MVC) zu einem Fruchtverlust führen (Carmichael, L. E. et al., 1991; Kirkbride, C. A., 1992).

Das Polyomavirus WU

WUPyV wurde durch eine australisch-amerikanische Kollaboration in der respiratorischen Probe eines an Pneumonie erkrankten 3 jährigen Kindes entdeckt und aufgrund von Sequenzhomologien der Familie der Polyomaviren als neue Spezies zugeordnet (Gaynor, A. M. et al., 2007).

Polyomaviren besitzen ein zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größe von ~ 5200 bp. Das Genom liegt im Virion als Superhelix vor und ist mit zellulären Histonen des Wirtes assoziiert. Die Gene lassen sich nach Expressionszeitpunkt in früh (T-Antigene) und spät (Strukturproteine VP1-VP3) exprimierte Gene unterteilen. Die Viruspartikel bestehen zum Grossteil aus dem Strukturprotein VP1, sind unbehüllt, ikosaedrisch und haben einen Durchmesser von ~45 nm (Modrow, S., 2003).

Bekannte humanpathogene Vertreter der Polyomaviren sind das BK- und das JC-Virus. Die primäre Infektion mit diesen Viren verläuft in der Regel asymptomatisch, kann allerdings auch einen leichten respiratorischen Infekt verursachen (Ahsan, N. and Shah, K. V., 2006). In verschiedenen Studien konnte eine Seroprävalenz bei Erwachsenen zwischen 65 – 90 % für BKV und 44 – 92 % für JCV nachgewiesen werden (Knowles, W. A., 2006). Beide Viren persistieren nach der Primärinfektion. Ihre DNA kann auch bei asymptomatischen Erwachsenen aus verschiedenen Organen, vornehmlich dem urogenitalen Trakt, isoliert werden. Ob diese persistierenden Infektionen latent sind oder eine geringe aber kontinuierliche Replikation stattfindet, ist noch unklar (Doerries, K., 2006). Bei beiden Viren kann es im Zuge einer Immunsuppression des Wirtes zu einer Reaktivierung oder erhöhten Replikation kommen. Diese kann im Falle des JC-Virus zu einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) führen (Khalili, K. et al., 2007), während das BK-Virus mit einer hämorrhagischen Zystitis assoziiert ist (Azzi, A. et al., 1999).

Untersuchung der klinischen Relevanz von neu entdeckten Viren

Die Entdeckung eines bis dahin unbekannten Erregers wirft stets viele Fragen auf. Um die Bedeutung eines neuen Erregers zu untersuchen, ist unter anderem die Häufigkeit des Auftretens von Interesse. Im Falle von respiratorischen Viren bietet sich dazu die

Untersuchung von respiratorischen Proben, z. B. Nasenrachensekreten (NRS), mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) an. Durch diese Studien können auch Erkenntnisse über die saisonale und geographische Verteilung der Erreger gewonnen werden.

Von entscheidender Bedeutung nach der Entdeckung neuer Erreger ist die Frage, ob es sich um pathogene oder apathogenen Erreger handelt. In der Vergangenheit wurden hierfür häufig die von Robert Koch im 19. Jahrhundert aufgestellten Postulate herangezogen. Danach muss ein krankheitsauslösender Erreger (i) ausschließlich in kranken Tieren/Menschen isoliert werden können und nicht im gesunden Wirt, (ii) der Erreger sollte in Reinkultur züchtbar sein und (iii) nach Infektion mit dieser Reinkultur sollte ein gesunder Wirt das typische Krankheitsbild aufweisen (Koch R., 1891). Diese Postulate haben im Hinblick auf Viren jedoch Limitationen. Durch die Kenntnis von persistierenden Viren, wie den Polyomaviren BK und JC, ist das erste Postulat bei Viren nicht uneingeschränkt anwendbar, da auch bei gesunden Tieren/Menschen die entsprechenden Viren nachgewiesen werden können. Eine Kultivierung des Erregers in Reinkultur, wie im zweiten Postulat gefordert, ist für Viren nicht möglich, da sie auf Wirtszellen angewiesen sind und durch die Anwesenheit von Zellen im Nährmedium das Postulat als nicht erfüllt betrachtet werden muss. Auch wenn Viren aus einer Zellkultur isoliert werden können und diese Viren zur Infektion des eigentlichen Wirtes herangezogen werden, ist diese Herangehensweise im Fall von ausschließlich humanpathogenen Erregern ethisch nicht vertretbar. Dass die Koch'schen Postulate nicht auf jeden Erreger anwendbar sind, wurde auch schon von Robert Koch selbst sowohl am Beispiel von *Vibrio cholerae*, welches auch aus Proben gesunder Menschen isoliert werden konnte, als auch am Beispiel von *Mycobacterium leprae*, welches in Reinkultur nicht kultivierbar ist, festgestellt (Fredericks, D. N. and Relman, D. A., 1996). Gerade die Schwierigkeiten, die Koch'schen Postulate auf Viren anzuwenden, führten im Jahr 1937 zu ergänzenden Empfehlungen von Thomas Rivers speziell für Viren. Danach muss ein bestimmtes Virus regelmäßig aus Patienten isoliert werden, die an einem bestimmten Krankheitsbild leiden, und der Beweis muss erbracht werden, dass das Virus weder zufällig noch durch Verfahrensfehler bei Patienten mit diesem Krankheitsbild gefunden wurde (Rivers, T. M., 1937). Aufgrund neuer molekularbiologischer Möglichkeiten wurden diese Empfehlungen von David Fredericks und David Relman erweitert. Dabei befassten sie sich in erster Linie mit dem Nachweis von viraler DNA/RNA aus Patienten (Fredericks, D. N. and Relman, D. A., 1996). Nach diesen Empfehlungen soll (i) virales Erbmaterial aus möglichst vielen Patienten mit einem bestimmten Krankheitsbild isoliert werden. (ii) Das Genom dieser Viren sollte bei gesunden Patienten gar nicht oder in deutlich geringerer Kopienzahl vorhanden sein. (iii) Im

Zuge der Genesung sollte die Menge isolierten Erbmaterials geringer werden, bei einem Rückfall sollte die Menge steigen. (iv) Sollte das Virus vor Beginn einer assoziierten Krankheit oder in besonders großen Mengen während der Krankheit detektiert werden, scheint ein Zusammenhang wahrscheinlicher. (v) Das vorliegende Krankheitsbild des untersuchten Virus sollte dem Krankheitsbild phylogenetisch verwandter Viren ähneln. (vi) Es sollten Untersuchungen angestrebt werden, die das Virus in betroffenen Organen auf zellulärer Ebene nachweisen. (vii) Die gesammelten Daten sollten reproduzierbar sein.

Für die Untersuchung der klinischen Relevanz neuer Erreger ist auch die Etablierung von Antikörpertesten von großer Bedeutung, da durch Antikörper-Untersuchungen Aussagen zum Zeitpunkt der Primärinfektion möglich sind. Neben dem Immunglobulin (Ig) M-Nachweis kann dabei eine IgG-Serokonversion oder ein Anstieg des IgG-Antikörpertiters auf eine primäre Infektion hinweisen, woraus sich eine Assoziation mit einem Krankheitsbild ergeben kann. Des Weiteren kann ein Antikörpernachweis zur Ermittlung der Seroprävalenz herangezogen werden. Dabei kann der Nachweis Virus-spezifischer IgG-Antikörper Aufschluss über einen zurückliegenden Kontakt mit dem Erreger geben.

Zielsetzung

Um einen Beitrag zur Erforschung der neu entdeckten respiratorischen Viren hBoV und WUPyV zu liefern, wurden Testverfahren zum Genomnachweis und zum Nachweis von Antikörpern etabliert. Mit diesen Methoden wurden zum einen NRS, Stuhl- und Serumproben von Kindern mit akuter respiratorischer Erkrankung (ARE) auf Virus-DNA und zum anderen Plasmaproben gesunder Erwachsener auf Virus-spezifische Antikörper getestet. Durch diese Untersuchungen konnte die Infektionshäufigkeit von hBoV und WUPyV bei Kindern mit respiratorischem Infekt und die Seroprävalenz bei Erwachsenen ermittelt werden.

Zur Untersuchung der Divergenz von hBoV und WUPyV wurde die Phylogenie der Viren durch die Sequenzierung sowohl variabler Teilabschnitte als auch des gesamten Genoms, von einzelnen Isolaten untersucht.

Ergebnisse:

Arbeiten zum humanen Bocavirus

Untersuchung der hBoV-Infektionshäufigkeit durch qualitative PCR (Publikation 1)

Um die Infektionshäufigkeit von hBoV in NRS von Kindern, die an einer ARE litten, zu ermitteln, wurde eine qualitative PCR zum Nachweis von hBoV-DNA etabliert und validiert. Zunächst wurde hierfür virale DNA mittels High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim) aus den Proben isoliert und im Anschluss mit hBoV-spezifischen Primern amplifiziert. Nachdem ein Patient positiv getestet worden war, wurde das entstandene Amplikon sequenziert und mit veröffentlichten hBoV-Sequenzen verglichen. Für die Verwendung als positive Kontrolle wurde ein Plasmid mit hBoV-Insert hergestellt. Dazu wurde das verifizierte hBoV-Amplikon in den Vektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert. Um das entstandene Plasmid pBoV als Amplifikationskontrolle verwenden zu können, wurde es quantifiziert und eine Verdünnungsreihe hergestellt. In allen PCR Läufen wurden dann die Verdünnungsstufen 50 bis 5 Kopien/Reaktion als Amplifikationskontrolle verwendet. Das Plasmid pBoV wurde ebenfalls für die Ermittlung der Nachweisgrenze (NWG) verwendet. Dabei ergab sich mittels Probitanalyse eine NWG von 12,3 Kopien/Reaktion (95 %-Konfidenzintervall: 9,1 – 22,2 Kopien/Reaktion).

Von den 835 untersuchten NRS konnte in 87 (10,3 %) hBoV-DNA nachgewiesen werden. Das mediane Alter der infizierten Kinder (1,8 Jahre) unterschied sich nicht signifikant vom Alter der gesamten Studienpopulation (1,6 Jahre; Mann-Whitney-Test). Allerdings konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem medianen Alter der hBoV-infizierten Kinder und dem medianen Alter der mit RSV (0,7 Jahre; $p < 0,0001$), Influenza A (2,4 Jahre; $p = 0,0031$) oder Adenoviren (2,7 Jahre; $p = 0,0046$) infizierten Kinder beobachtet werden.

Die Untersuchung der saisonalen Verteilung ergab, dass hBoV-Infektionen über das gesamte Jahr hinweg nachgewiesen werden konnten.

Ein großer Anteil ($n=34$; 39,1 %) der hBoV-positiven Patienten wies eine Koinfektion mit einem anderen respiratorischen Virus auf. Dabei wurden am häufigsten Koinfektionen mit RSV ($n=14$) und Influenza A ($n=9$) beobachtet.

Die Ermittlung der Koinfektionen beruhte auf Daten aus den Routine-Untersuchungen auf Antigen für respiratorische Viren, welche mit einem Immunfluoreszenztest (IFT) für AdV, Inf A + B, PIV 1 - 3 und RSV durchgeführt wurden. Da der Nachweis von Virus-Antigen weniger sensitiv ist als der Nachweis viraler DNA/RNA und die Proben nur auf ausgewählte

respiratorische Viren getestet wurden, ist die Anzahl der Koinfektionen bei hBoV-positiven Patienten womöglich noch höher.

Klinische Daten waren für 63 der 87 positiv auf hBoV-DNA getesteten Patienten verfügbar. Diese wiesen ein breites Spektrum von Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege auf, allerdings war kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen einem respiratorischen Krankheitsbild und hBoV-Infektion erkennbar. Der Anteil der Kinder mit Pneumonie war bei den hBoV-infizierten Kindern ohne nachgewiesene Koinfektion signifikant höher, als bei den Kindern mit Koinfektion ($p=0,044$; Fisher's Exakt Test).

Quantitative hBoV-real-time-PCR (Publikation 2)

Nach der Untersuchung der Infektionshäufigkeit mittels qualitativer PCR sollte eine quantitative real-time-PCR (qrt-PCR) weitere Erkenntnisse über hBoV-Infektionen liefern. Die Sequenzen der Primer und der Taqman-Sonde wurden aus konservierten Bereichen des hBoV-Genoms gewählt. Zur Ermittlung dieser Bereiche wurden die zuvor sequenzierten Amplikons der qualitativen PCR aus der NS-1-Region herangezogen. Nachdem entsprechende Sequenzen gefunden worden waren, wurden diese auf der Homepage des National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) mittels „Blast“ auf Sequenzhomologien zu bekannten Sequenzen getestet, um die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Amplifikationen zu minimieren. Dabei konnten relevante Übereinstimmungen von Primern und Sonde nur zu bis dahin publizierten hBoV-Sequenzen festgestellt werden. Im Anschluss wurden die optimale Primer- und Sondenkonzentration mit Hilfe des zuvor hergestellten pBoV-Plasmides ermittelt. Bei der anschließenden Validierung der hBoV-qrt-PCR konnte eine Amplifikationslinearität von $3,8 - 3,8 \times 10^8$ Kopien/Reaktion und eine NWG von 14,2 Kopien/Reaktion (Probitanalyse; 95 %-Konfidenzintervall 10,3 – 25,7 Kopien/Reaktion) für pBoV ermittelt werden. Um die Verlässlichkeit der qrt-PCR innerhalb eines Laufes zu überprüfen wurden die „threshold cycle“ (C_T)-Werte von 3 Proben mit unterschiedlichen pBoV-Konzentrationen jeweils im Dreifachansatz bestimmt und miteinander verglichen. Dadurch konnte ein mittlerer Intraassay-Variationskoeffizient von 2,6 % ermittelt werden. Zusätzlich wurde durch eine Laufkontrolle (5×10^5 Kopien/Reaktion) die Verlässlichkeit zwischen den einzelnen qrt-PCR Ansätzen verglichen. Der sich daraus ergebende Interassay-Variationskoeffizient der Viruslast betrug 15,2 %.

Um zusätzlich zu der oben genannten Blast-Analyse unspezifische Amplifikationen auszuschließen, wurde eine hBoV-qrt-PCR mit Proben, die zuvor positiv auf Parvovirus B19 und Adenovirus getestet worden waren, durchgeführt. In beiden Fällen kam es zu keiner Amplifikation.

Im Anschluss an die Validierung der hBoV-qrt-PCR wurden NRS von Kindern untersucht, die unter ARE litten und zuvor mit der qualitativen PCR auf hBoV-DNA getestet worden waren. Das Patientenkollektiv entsprach weitestgehend dem Kollektiv der Publikation 1. Von den 834 untersuchten NRS konnte bei 100 (12,0 %) mittels qrt-PCR hBoV-DNA nachgewiesen werden. Die mediane Viruslast betrug $4,9 \times 10^3$ Kopien/ml.

Da, wie schon bei der qualitativen hBoV-PCR beschrieben, bei einem großen Anteil der hBoV-positiven Patienten ein weiteres respiratorisches Virus entdeckt worden war ($n = 41$; 41 %), wurden die hBoV-DNA-Mengen im NRS in Abhängigkeit vom Koinfektionsstatus verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,759$; Mann-Whitney-Test) zwischen Proben mit und ohne Koninfektion beobachtet werden.

Bei der Analyse der hBoV-Last in Abhängigkeit vom Krankheitsbild konnte eine signifikant höhere Viruslast bei Kindern mit Bronchitis im Vergleich zu Kindern mit Fieberkrämpfen festgestellt werden ($p=0,0195$, Kruskal-Wallis). Die Viruslast-Mediane der weiteren Krankheitsgruppen (Bronchiolitis, obstruktive Bronchitis, Pneumonie und IOA) unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Um weitere Informationen über eine Infektion mit hBoV zu sammeln, wurden soweit verfügbar Serum- und Stuhlproben von Kindern, deren NRS zuvor positiv auf hBoV-DNA getestet worden war, mit der qrt-PCR untersucht. Dafür wurden zunächst Inhibitionsexperimente für die aus Stuhlproben isolierte virale DNA durchgeführt. Hierfür wurden zuvor hBoV-negativ getestete Stuhlproben mit einer definierten Kopienanzahl pBoV-DNA versetzt und die gemessene Menge nach Amplifikation mit der eingesetzten Menge verglichen. Dabei konnte keine relevante Inhibition beobachtet werden. Zur Untersuchung auf hBoV-DNA standen 10 Serum- und 31 Stuhlproben zur Verfügung. In einer (10 %) der Serumproben und in 14 (45,2 %) der Stuhlproben war hBoV-DNA nachweisbar. Dabei konnte eine signifikant höhere hBoV-Viruslast in den NRS von Patienten beobachtet werden, in deren Stuhlprobe ebenfalls hBoV-DNA nachgewiesen werden konnte ($p<0,0001$; Mann-Whitney-Test).

Verlaufsstudien bei Kindern mit hBoV-Infektion (Publikation 5)

Mit der etablierten hBoV-qrt-PCR wurden in dieser Arbeit Verlaufsstudien bei 6 hBoV-infizierten Kindern durchgeführt, von denen sequentielle Proben verfügbar waren. Dabei konnte hBoV-DNA über einen Zeitraum von bis zu 4,5 Monaten nachgewiesen werden. Bei 4 der untersuchten Fälle konnte eine hohe Viruslast (Median 6×10^8 Kopien/ml) bei der ersten Probenentnahme festgestellt werden, die zum Zeitpunkt weiterer Untersuchungen um mehrere Log-Stufen abgefallen war. Die beiden anderen Patienten wiesen zunächst eine niedrige

hBoV-Last auf, die im Verlauf der Probenahme anstieg und wieder abfiel. Während bei einem der Kinder zum Zeitpunkt des hBoV-DNA-Nachweises eine Koinfektion mit RSV vorlag, war das zweite zunächst nur hBoV-positiv und wies erst bei der zweiten Probenentnahme eine Koinfektion mit Inf A auf.

Phylogenetische Untersuchung von hBoV (Publikation 2)

Um die Phylogenie von hBoV zu untersuchen, wurde zunächst ein 968 bp langer Abschnitt des VP2-Genes, welches für das Kapsidprotein VP2 codiert, von 69 hBoV-positiven Patienten mit zwei überlappenden Primerpaaren (Anhang 1) sequenziert. Dieser Teilabschnitt von VP2 wurde aufgrund einer höheren Variabilität im Vergleich zu anderen Regionen des hBoV-Genoms ausgewählt (Allander, T. et al., 2005). Die phylogenetische Untersuchung der Sequenzen ergab zwei Cluster, Stockholm 1 (St1; n=17) und Stockholm 2 (St2; n=52), welche den zuvor veröffentlichten Sequenzen ST1 (DQ000495) und ST2 (DQ000496) (Allander, T. et al., 2005) zugewiesen werden konnten. Die Sequenzidentität innerhalb der Cluster betrug 99,4 % und zwischen den Clustern 98,8 %. Der Großteil der Nukleotid-Mutationen war synonym, wodurch sich eine Aminosäure (AS)-Identität von 99,7 % ergab. Eine Assoziation zwischen Krankheitsbild, Viruslast oder saisonaler Verteilung in Bezug auf die Cluster konnte nicht beobachtet werden. Um die Variabilität von hBoV in anderen Genomregionen zu untersuchen, wurden 7 hBoV-Stämme komplett sequenziert. Dazu wurden hBoV-Proben mit hoher Viruslast und größtmöglicher Divergenz im VP2-Gen herangezogen, aus denen das hBoV-Genom jeweils mit 12 überlappenden Fragmenten amplifiziert wurde (Primer siehe Anhang 1).

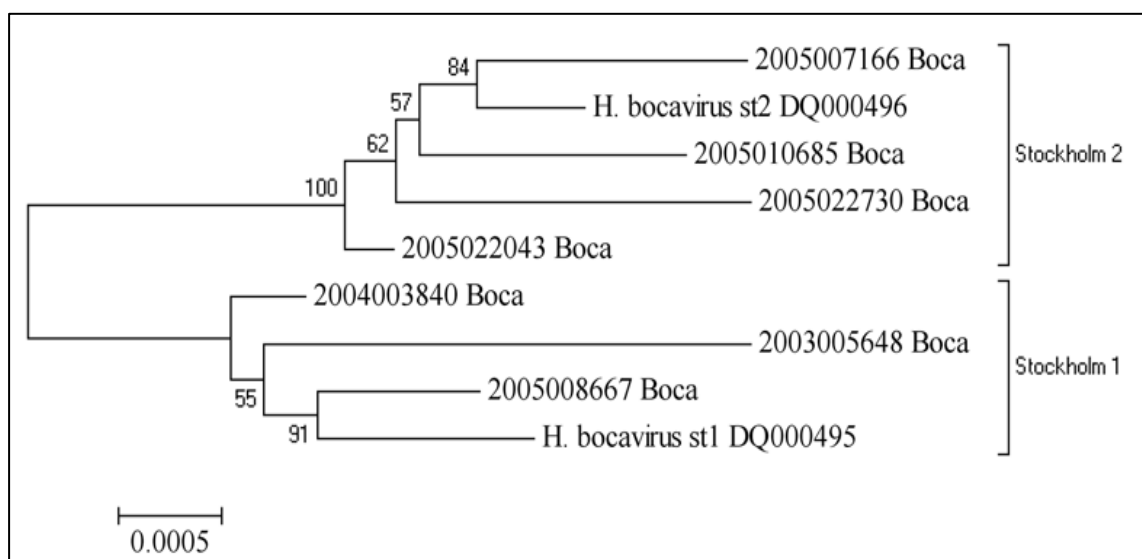


Abb. 2: Phylogenetische Analyse von sieben hBoV-Genomen (interior branch test). Bootstrap-Werte sind an den Knotenpunkten aufgeführt.

Die Fragmente wurden im Anschluss an die PCR mit dem BigDye Terminator Kit und dem ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) sequenziert und mit Hilfe von MEGA 4.0 (Tamura, K. et al., 2007) analysiert. Die Ergebnisse der Genomanalyse bestätigten die zuvor bei der Sequenzierung von VP2 beobachtete Clusterbildung (Abbildung 2). Der Vergleich aller Sequenzen, unabhängig von Clusterbildung, ergab eine Nukleotid-Identität von 99,6 % (innerhalb der Cluster jeweils 99,8%). Die Analyse der Leseraster von hBoV ergab für NS1 eine Nukleotid-Identität von 99,8 %. Die Mutationen waren jedoch ausschließlich synonym, so dass die AS-Identität 100 % betrug. Das NP1 von hBoV wies die höchste Nukleotid-Identität (99,9 %) auf. Ferner war keine Cluster-Bildung zu beobachten und da es sich ausschließlich um synonyme Mutationen handelte lag die AS-Identität bei ebenfalls 100 %. Der ORF VP1/VP2 hatte mit 99,3 % die niedrigste Nukleotid-Identität der untersuchten Leseraster. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten ORF lagen bei VP1/VP2 auch nichtsynonyme Mutationen (n=4) vor, wodurch eine AS-Identität von 99,8 % entstand. Von diesen 4 AS-Substitutionen lagen drei im Bereich der unique-region von VP1. Diese Substitutionen wiesen keine Cluster-spezifische Verteilung auf. Lediglich die AS-Substitution der Nukleotidpositionen 1768-1770 des VP1/VP2-ORF war Cluster-spezifisch (ST2: Serin; ST1: Threonin).

HBoV-Seroprävalenz bei gesunden Erwachsenen (Publikation 6)

Um die Seroprävalenz von hBoV zu untersuchen, wurde ein IFT entwickelt. Die dafür verwendeten Insektenzellen (SF9) wurden mit Baculoviren infiziert, die das hBoV-Kapsidgen VP2 enthielten. Das Gen wurde hierfür zunächst in den pENTR Vektor (Invitrogen) kloniert und anschließend in *E.coli* transformiert. Nach Überprüfung der korrekten Basenfolge und Orientierung des inserierten VP2-Gens durch Sequenzanalyse wurde das VP2-Gen durch homologe Rekombination in lineare baculovirale DNA überführt, die zur späteren Überprüfung der Proteinexpression, am 5'-Ende eine Gensequenz enthielt, die für ein V5-Epitop codiert. Dabei handelt es sich um ein 14 AS langes Epitop, das in den Nichtstrukturproteinen P und V des Affen-Paramyxovirus SV5 enthalten ist. Die das VP2-Gen von hBoV enthaltende Baculovirus-DNA wurde anschließend in SF9-Zellen transfiziert und die Expression von hBoV-VP2 mittels Western Blot kontrolliert. Dafür wurden Antikörper gegen das V5-Epitop verwendet, die zur Detektion einer Proteinbande mit einer Größe von ~66 kDa führten, was der errechneten Größe von VP2 entsprach. Die entstandenen rekombinanten Baculoviren (BacBOVP2) wurden dann zur weiteren Infektion von SF9-Zellen verwendet. Analog zu BacBOVP2 wurden rekombinante Baculoviren, die das

VP1-Gen von KIPyV (BacKIPyVP1) oder das VP1-Gen von WUPyV (BacWUPyVP1) enthielten, hergestellt. Um den IFT zu erproben, wurden mit BacBOVP2 infizierte SF9-Zellen auf Objektträgern fixiert und mit Seren von Kindern, deren NRS zuvor positiv auf hBoV-DNA getestet worden waren, inkubiert. Durch FITC-konjugierte Anti-human-IgG-Zweitantikörper konnten bei diesen Patienten an die BacBOVP2-SF9-Zellen gebundene humane IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Als negative Kontrolle dienten uninfizierte SF9-Zellen, bei welchen keine Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Zusätzlich wurde der IFT durch einen Absorptionsassay auf Spezifität überprüft. Dafür wurden Plasmaproben, die sowohl Antikörper gegen hBoV-VP2 als auch gegen die Kapsidproteine VP1 von KIPyV und WUPyV enthielten, mit Lysaten von SF9-Zellen inkubiert, die mit BacBOVP2, BacKIPyVP1 oder BacWUPyVP1 infiziert worden waren. Im Anschluss wurden dann die Antikörpertiter gegen hBoV-VP2, KIPyV-VP1 und WUPyV-VP1 bestimmt und mit dem Titer verglichen, der vor dem Absorptionsassay bestimmt worden war. Dabei konnte beobachtet werden, dass nach Absorption des Plasmas mit BacBOVP2-infizierten SF9-Zellen der IgG-Titer gegen hBoV-VP2 verringert wurde, während der IgG-Titer gegen KIPyV-VP1 und WUPyV-VP1 nahezu konstant blieb. Im Gegenzug blieb der IgG-Titer gegen hBoV-VP2 konstant, wenn das Plasma mit BacWUPyVP1- oder BacKIPyVP1-infizierten SF9-Zellen absorbiert worden war. Nach Etablierung des IFT wurden 100 Plasmen von gesunden Blutspendern (20-66 Jahre) auf IgG-Antikörper gegen das Kapsidprotein VP2 von hBoV untersucht. In 74 der untersuchten Proben konnte IgG gegen hBoV-VP2 nachgewiesen werden. Der Altersmedian (32 Jahre) der hBoV-IgG-positiven Blutspender unterschied sich nicht signifikant ($p=0,5141$, Mann-Whitney-Test) von dem des Gesamtkollektivs (31,5 Jahre). Auch das Geschlechterverhältnis (Gesamtkollektiv: 52 % männlich; Anti-hBoV-IgG-positive Spender: 50 % männlich) war nahezu identisch. Eine Aufteilung der positiven Spender in Altersgruppen wies ebenfalls keinen signifikanten Seroprävalenz-Unterschied auf ($p=0,4753$; χ^2 -Test).

Veröffentlichte Arbeiten zum humanen Bocavirus

Publikation 1:

Benedikt Weissbrich, Florian Neske, Jörg Schubert, Franz Tollmann, Katharina Blath, Kerstin Blessing and Hans Wolfgang Kreth (2006). “Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections”. **BMC Infectious Disease** 6 :109

Publikation 2:

Florian Neske, Kerstin Blessing, Franz Tollmann, Jörg Schubert, Axel Rethwilm, Hans Wolfgang Kreth, and Benedikt Weissbrich (2007). “Real-Time PCR for Diagnosis of Human Bocavirus Infections and Phylogenetic Analysis”. **Journal of Clinical Microbiology** 45: 2116-2122

Publikation 5:

Kerstin Blessing, Florian Neske, Ulla Herre, Hans-Wolfgang Kreth, Benedikt Weissbrich (in press). “Prolonged Detection of human bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of children with respiratory tract disease”. **Pediatric Infectious Disease Journal** accepted and in press

Publikation 6:

Florian Neske, Christiane Prifert, Jörg Schubert, Barabara Scheiner, Moritz Ewald, Andreas Opitz, Benedikt Weissbrich (submitted). “High prevalence of antibodies against polyomavirus WU, polyomavirus KI, and human bocavirus in German blood donors”. **BMC Infectious Disease**; submitted

Research article

Open Access

Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections

Benedikt Weissbrich*¹, Florian Neske¹, Jörg Schubert¹, Franz Tollmann¹, Katharina Blath^{1,2}, Kerstin Blessing² and Hans Wolfgang Kreth²

Address: ¹Institute of Virology and Immunobiology, University of Würzburg, Versbacher Str. 7, 97078 Würzburg, Germany and ²Children's Hospital, University of Würzburg, Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg, Germany

Email: Benedikt Weissbrich* - weissbrich@vim.uni-wuerzburg.de; Florian Neske - florian.neske@gmx.de; Jörg Schubert - schubert@vim.uni-wuerzburg.de; Franz Tollmann - tollmann@vim.uni-wuerzburg.de; Katharina Blath - blathk@web.de; Kerstin Blessing - blessing_k@kinderklinik.uni-wuerzburg.de; Hans Wolfgang Kreth - kreth@mail.uni-wuerzburg.de

* Corresponding author

Published: 11 July 2006

Received: 11 April 2006

BMC Infectious Diseases 2006, **6**:109 doi:10.1186/1471-2334-6-109

Accepted: 11 July 2006

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/109>

© 2006 Weissbrich et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: In a substantial proportion of respiratory tract diseases of suspected infectious origin, the etiology is unknown. Some of these cases may be caused by the recently described human bocavirus (hBoV). The aim of this study was to investigate the frequency and the potential clinical relevance of hBoV in pediatric patients.

Methods: We tested 835 nasopharyngeal aspirates (NPA) obtained between 2002 and 2005 from pediatric in-patients with acute respiratory tract diseases at the University of Würzburg, Germany, for the presence of hBoV DNA. The specificity of positive PCR reactions was confirmed by sequencing.

Results: hBoV DNA was found in 87 (10.3 %) of the NPAs. The median age of the infants and children with hBoV infection was 1.8 years (mean age 2.0 years; range 18 days – 8 years). Infections with hBoV were found year-round, though most occurred in the winter months. Coinfections were found in 34 (39.1 %) of the hBoV positive samples. RSV, influenza A, and adenoviruses were most frequently detected as coinfecting agents. Sequence determination of the PCR products in the NP-1 region revealed high identity (99 %) between the nucleotide sequences obtained in different years and in comparison to the Swedish viruses ST1 and ST2. An association of hBoV with a distinct respiratory tract manifestation was not apparent.

Conclusion: hBoV is frequently found in NPAs of hospitalized infants and children with acute respiratory tract diseases. Proving the clinical relevance of hBoV is challenging, because application of some of Koch's revised postulates is not possible. Because of the high rate of coinfections with hBoV and other respiratory tract pathogens, an association between hBoV and respiratory tract diseases remains unproven.

Background

Respiratory tract infections are a major cause of human morbidity and are caused by a broad spectrum of microbial agents. Viruses account for the largest number of respiratory tract infections. The so-called respiratory viruses include influenza virus A and B, parainfluenzae viruses, adenoviruses, respiratory syncytial virus (RSV), rhinoviruses, and coronaviruses. In recent years, several novel viruses have been discovered in patients with respiratory infections using molecular biology methods. These novel viruses include the human metapneumovirus and several coronaviruses (SARS, NL63, HKU1) [1,2]. The latest addition to this list was the human bocavirus (hBoV) described by Allander et al. [3]. Their screening method for unknown viral sequences in patient samples involved concentration of viral particles, nucleic acid isolation, random amplification of RNA and DNA, and finally sequencing and subsequent blasting of the amplified products. HBoV is most closely related to the minute virus of canines (MVC) and the Bovine Parvovirus (BPV), which have been classified in the genus *Bocavirus* within the *Parvoviridae* [4].

Classically, the postulates of Koch as modified by Rivers have been used to establish a causal relationship between viruses and a disease [5]. However, hBoV has not been propagated in cell culture, and there is no animal model so far. Therefore, proving the clinical relevance is challenging because application of some postulates of Koch and Rivers is not possible.

In the first description of hBoV, DNA was detected in 17 (3.1 %) of 540 Swedish children with lower respiratory tract disease. Three of the children were coinfecting with other viruses (two with RSV and one with adenovirus). Because 14 hBoV-positive samples were negative for other respiratory viruses by standard screening, it was reasoned that hBoV may cause respiratory tract disease. In a second report of hBoV in Australian children and adults, hBoV was detected in 18 (5.6 %) of 324 respiratory samples. In ten of these (55.6 %), a coinfection with RSV (n = 8), hMPV or adenoviruses was detected [6]. In a third study from Japan, hBoV DNA was found in 18 (5.7 %) of 318 respiratory specimens of children with lower respiratory tract disease [7]. Samples positive for other viruses (RSV, influenza virus A and B, hMPV) were excluded from the study. Analysis of double infections was therefore not possible. In two more recent studies from Canada and France, hBoV DNA was detected in 18 of 1209 (1.5 %) and nine of 262 (3.4 %) respiratory samples, respectively [8,9]. In the Canadian study specimens of children and adults were tested. Specimens positive for other respiratory viruses were excluded. The French study examined samples of children below five years of age. Three of the nine hBoV DNA positive children (33.3 %) were coinfecting with RSV.

In order to better understand the epidemiological pattern of hBoV infections and to analyze its clinical relevance, further studies on larger groups of patients are necessary. Therefore, we retrospectively tested nasopharyngeal aspirates of patients from the University of Würzburg Children's Hospital, Germany for the presence of hBoV DNA.

Methods

Samples

The samples tested for hBoV infection consisted of stored nasopharyngeal aspirates (NPA) that were sent by the University of Würzburg Children's hospital for screening of respiratory viruses from January 2002 to September 2005. On arrival in the viral diagnostic laboratory, the samples were routinely tested for the presence of respiratory virus antigens with an immunofluorescence assay (Respiratory Panel IFA Kit, Chemicon). The screening reagent of the kit detects antigens of adenoviruses, influenza viruses A and B, parainfluenza viruses 1 – 3, and RSV. NPAs showing positive reactions with the screening reagent were further studied by IFA using the seven single monoclonal antibodies contained in the screening reagent. Remaining NPA material was stored at -20°C until further testing for hBoV DNA. In addition to the samples from 2002 – 2005, a small number of samples (n = 17) from 1997 – 2001 were also available for retrospective testing. The study was carried out in compliance with the Helsinki declaration and was approved by the ethics committee of the medical faculty at the University of Würzburg.

hBoV PCR and sequencing

DNA was extracted from 200 µl of the NPA samples using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the instructions of the manufacturer. The elution volume was 50 µl. Amplification of hBoV DNA was performed with the NP-1 primers BoV188F (GAGCTCTGTAAGTACTATTAC) and BoV542R (CTCTGTGTTGACTGAATACAG) described by Allander [3] using the HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany). PCR reactions were carried out in a 50 µl volume consisting of 5 µl extracted DNA, 1× Qiagen HotStar buffer, dNTPs at a final concentration of 200 µM each, 200 pmol of each primer, and 1.5 U of Taq Polymerase. The cycling conditions were 50 cycles (94°C 30 s, 53°C 40 s and 1 min at 72°C) after a preheating step of 10 min at 95°C.

After amplification, PCR products were visualized by staining with ethidium bromide on agarose gels. A PCR reaction was considered as positive when a band of the expected size (354 base pairs) was visible. To confirm the sequence specificity, all PCR products from positive reactions were sequenced completely in both directions using

Big Dye terminator chemistry and the ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

General laboratory procedures to prevent PCR contamination were strictly adhered to. One negative control was extracted and amplified for every five NPA samples. All negative controls were found to be negative for hBoV DNA. A plasmid containing the PCR product cloned in the vector pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen) was used as positive control. The sensitivity of the hBoV assay was approximately 10 copies per reaction.

Results

From January 2002 to September 2005, 901 nasopharyngeal aspirates (NPA) of 786 hospitalized infants and children with febrile respiratory tract diseases were received for viral diagnostic evaluation. The median age of the patients was 1.6 years (mean age 3.4 years; range 12 days – 16 years), and 59 % were boys. The seasonal distribution of all samples is shown in Figure 1. Because of insufficient volume of the stored material, 66 samples had to be excluded from the retrospective testing of hBoV DNA. The median age and the seasonal distribution of the hospitalization were not significantly different between the patients with and without sufficient NPA sample volume.

By routine immunofluorescence testing for antigen of respiratory viruses, a positive diagnosis was obtained for 357 (39.5 %) of the NPA samples. RSV (n = 158; 17.4 %) and influenza A virus (n = 98; 10.9 %) were most frequently found. Further details are shown in Table 1. Coinfections with two or more viruses were detected in 7 of the cases using the antigen assay.

Of the 835 NPAs tested for hBoV DNA, 87 (10.3%) samples were found to be positive by PCR and subsequent sequencing. The male to female ratio of the hBoV positive infants and children (59.8 % boys) was similar to the ratio in the population tested. Their median age was 1.8 years (mean 2.0 years; range 18 days – 8 years). The age distribution of the hBoV positive patients and of the RSV, adenovirus and influenza A virus positive children for comparison is shown in Figure 2. Median ages were significantly different for these four infectious agents, except for the comparison between influenza A and adenovirus infections (Table 2). While infections with RSV peaked during the first six months of life (median 0.7 years), most hBoV infections (n = 52; 59.8 %) occurred at the age of 1 – 3 years. Infections with influenza A virus were more evenly distributed over a wider age range (median 2.7 years).

Infections with hBoV were found year-round, though most occurred in the winter months (Figure 1). The shape of the curves of the total number of NPA samples received

and of the hBoV positive samples appeared to be almost in parallel. There were no significant differences between the yearly frequencies of hBoV positive results between 2002 and 2005 (Table 3). In 17 samples that were available from before 2002, HBoV was retrospectively found in 3 samples, two from 1998 and one from 2001.

In 34 (39.1 %) of the hBoV positive infants and children, coinfections with other respiratory viruses were present, most frequently with RSV (n = 14) followed by influenza A (n = 9). The percentage distribution of the coinfecting agents among the hBoV positive samples was similar to the distribution of these agents in the total population (Table 1).

Sequence determination of the hBoV PCR products (NP-1 region of the genome) revealed high identity (99 %) between the nucleotide sequences obtained in different years and in comparison to the Swedish viruses ST1 and ST2.

Clinical data were available for 63 of the 87 hBoV positive NPAs. The patients suffered from upper and/or lower respiratory tract diseases (Table 4). Associations between all hBoV infections and distinct clinical manifestations were not apparent. Because of the retrospective nature of the study and because clinical data for the hBoV negative samples were not obtained, a statistical analysis of this aspect was not possible. When the clinical diagnoses of the children with and without coinfections with other respiratory pathogens were compared, pneumonia was found more often in the group of children without coinfections (Table 4). This association was borderline significant ($p = 0.044$ by Fisher's exact test).

Discussion

We found hBoV DNA in 10.3 % of NPA samples obtained from infants and children with respiratory tract diseases during the years 2002 to 2005 in the region of northern Bavaria in Germany. This is the highest frequency reported so far. To our knowledge, there have been five previous reports on hBoV infections, the original report from Sweden with a frequency of 3.1 %, and reports from Australia, Japan, Canada and France with frequencies of 5.6 %, 5.7 %, 1.5 %, and 3.4 %, respectively. In our study, hBoV infections were almost as frequently found as infections with influenza A virus, the second most common respiratory infection, and they were considerably more frequent than infections with influenza B, parainfluenzae, and adenoviruses. However, in contrast to the PCR method used for hBoV detection, the other respiratory viruses in our study were examined by IFA. When comparing the detection frequencies, this difference in detection methods has to be taken into consideration. In general, PCR assays are more sensitive than antigen detection

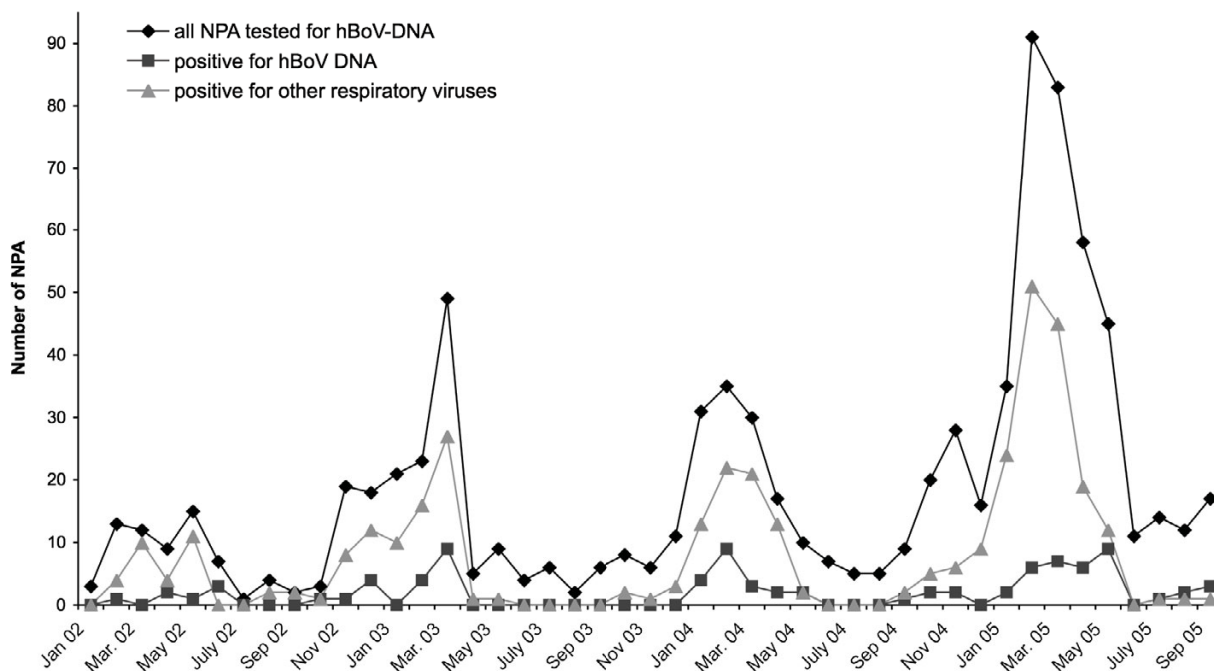


Figure 1
Temporal distribution of hBoV infections. Temporal distribution of the hBoV DNA positive NPAs compared with the total number of NPAs received and with the total number of positive results by immunofluorescence staining for antigen of respiratory viruses (RSV, influenza A/B, parainfluenza 1/2/3, adenoviruses).

Table 1: Frequency of detection of respiratory viruses and of hBoV in NPA samples

	Total population n	Positive results n	Males
Results of IFA testing for viral antigen	901		59.0 %
Total positive results by IFA	901	357 (39.5 %)	55.5 %
• RSV	901	158 (17.4 %)	52.5 %
• Influenza A	901	98 (10.9 %)	57.1 %
• Adenovirus	901	53 (5.9 %)	62.3 %
• Parainfluenza 1/2/3	901	39 (4.3 %)	48.7 %
• Influenza B	901	16 (1.8 %)	50.0 %
• Coinfections	901	7 (0.8 %)	14.3 %
Results of hBoV PCR	835	87 (10.3 %)	59.8 %
hBoV positive with coinfections	87	34 (39.1 %)	58.8 %
• with RSV	87	14 (16.1 %)	
• with influenza A	87	9 (10.3 %)	
• with adenovirus	87	9 (10.3 %)	
• with parainfluenza 1/2/3	87	1 (1.1 %)	
• with influenza B	87	1 (1.1 %)	

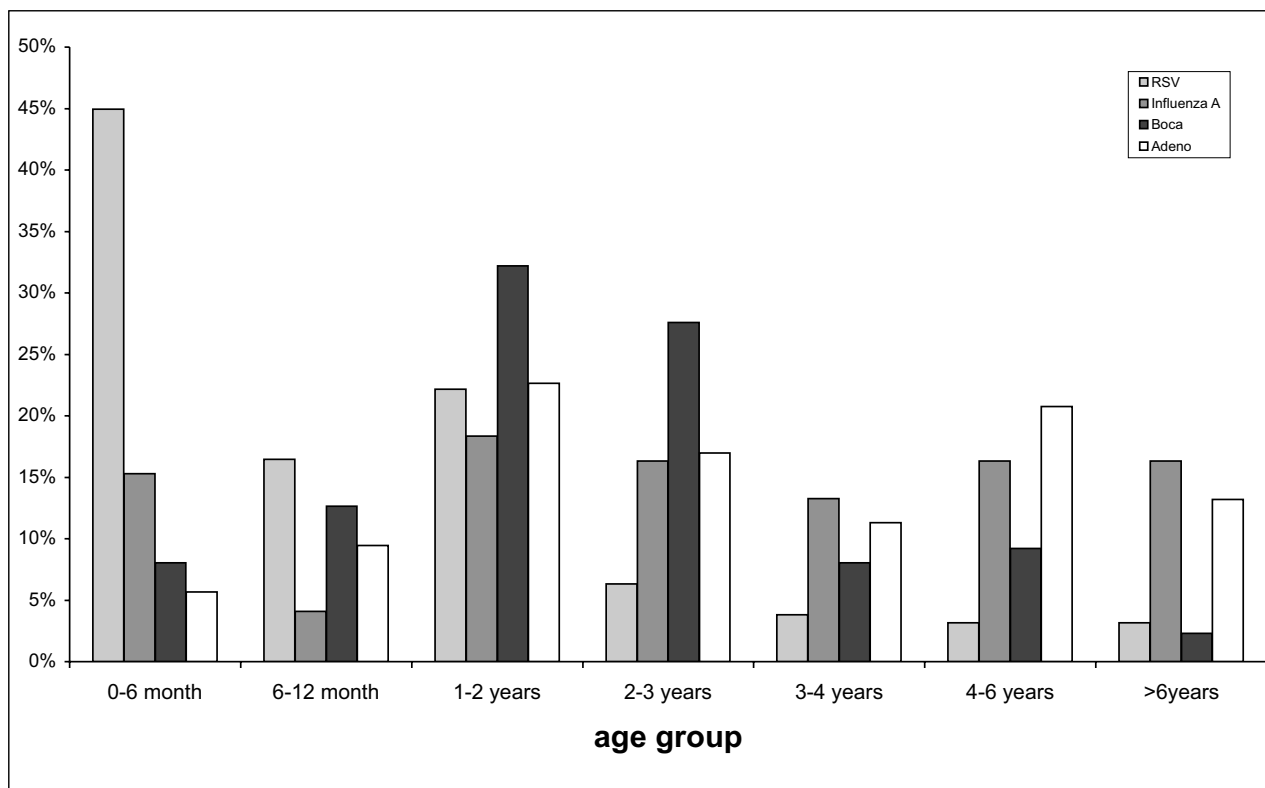


Figure 2
Age distribution of hBoV infections. Age distribution of hBoV infected children compared with the age distribution of children infected with RSV, influenza A, or adenoviruses.

methods [10]. Therefore, it is likely that the true prevalence of the respiratory viruses that were analyzed by IFA is actually higher than here reported.

There are several possible explanations for the higher frequency of hBoV infections observed in our study compared to the previous reports. Firstly, the difference may be due to an increased sensitivity of our PCR assay. In all previous studies as well as in ours, single round hot-start PCRs have been employed to detect hBoV DNA. However, the assays vary in the number of PCR cycles performed (35 cycles [3,7-9]; 45 cycles [6]; 50 cycles (present study)).

Depending on the assay optimization, 35 cycles may not be sufficient to detect weakly positive samples. In addition, data on the assay sensitivity were not provided in either of the previous studies. Using a plasmid control, we were able to show that our assay regularly detects approximately 10 copies of hBoV DNA per reaction. In order to obtain information on the amount of hBoV DNA present in the NPAs and in other secretions, a real-time PCR assay is currently under development.

A second potential reason for differing infection frequencies between studies may be due to regional and temporal

Table 2: Median age of patients with viral respiratory tract infections

Infection with	n	Median age	p-values ¹ for groupwise comparison		
			RSV	Adeno	Influenza A
hBoV	87	1.8	p < 0.0001	p = 0.0046	p = 0.0031
RSV	158	0.7		p < 0.0001	p < 0.0001
Adenovirus	53	2.7			p = 0.8
Influenzavirus A	98	2.4			

¹by Mann-Whitney-test

Table 3: Seasonal frequency of hBoV infections

Period ¹	NPA samples tested n	hBoV positive NPAs n (%)
Jan 02 – June 02	59	7 (11.9%)
July 02 – June 03	159	19 (11.9%)
July 03 – June 04	169	19 (11.2%)
July 04 – June 05	405	36 (8.9%)
July 05 – Sep 05	43	6 (14.0%)

¹Observation periods were chosen from summer to summer whenever possible in order to include the complete winter season

differences in the incidence of hBoV infection. In contrast to the previous reports, which have studied samples from only one or two winter seasons, the NPAs in our studies have been collected during four consecutive years. In general, seasonal differences of sample acquisition may account for varying incidence numbers. In our study, for example, proportions of influenza A, parainfluenza 3, and adenovirus infections were considerably different between winter seasons (data not shown). However, this was not the case for hBoV infections. In four consecutive winter seasons, we observed a similar frequency of approximately 10 %. Therefore, seasonal variation is unlikely to account for the observed high frequency of hBoV infections in our study population. So far, hBoV has been detected in Sweden, Australia, Japan, Canada, France, and Germany, and it appears that hBoV has a worldwide distribution. It remains to be determined how incidence numbers are influenced by regional aspects.

Thirdly, the higher frequency observed in our study may be related to different patient populations. Children hospitalized for respiratory tract diseases were included in all studies published so far [3,6-9]. Two studies additionally examined adults and outpatients [6,8]. While three studies as well as ours included patients with upper and/or lower respiratory tract disease [6,8,9], two studies focused on patients with lower respiratory tract diseases [3,7].

Thus, it is difficult to compare patient populations in the hBoV studies.

In agreement with the previous reports [3,6-9], sequencing of the PCR products in the NP-1 region revealed a nucleotide identity of more than 99 % between different samples. This was also true for the two hBoV DNA positive samples from 1998. Although much more sequence information on hBoV will be required, the data available so far indicate that hBoV may be a highly conserved virus.

The age distribution of hBoV infections found in our study is similar to previous reports [3,6-9]. Most hBoV infections occurred between 6 months and 3 years of age. This distribution is compatible with protection from infection by maternal antibodies in the first year of life. Future studies of the seroprevalence of hBoV antibodies in different age groups will shed light on this issue.

Analysis of a potential association between hBoV infection and clinical manifestations is limited by the retrospective nature of our study, by the high number of double infections, and by the fact that clinical information was obtained only for hBoV positive patients. However, it seems that there is no obvious association between hBoV infection and a distinct clinical manifestation. Instead, a broad spectrum of both upper and lower respi-

Table 4: Clinical manifestations in 63 hBoV DNA positive infants and children with and without coinfections¹

Diagnosis at discharge from hospital	n with coinfection	n without coinfection	total n (%)
Upper respiratory tract disease (rhinitis, otitis media, tonsillitis, pharyngitis, laryngotracheitis, apnoic spells)	12	13	25 (39.7 %)
Lower respiratory tract disease (total)	8	24	32 (50.8 %)
• bronchitis	3	7	10 (15.9 %)
• wheezing bronchitis	4	5	9 (14.3 %)
• bronchiolitis	0	2	2 (3.2 %)
• pneumonia	1	10 ²	11 (17.5 %)
Febrile seizures	3	3	6 (9.5 %)

¹Clinical information was available for 63 of the 87 hBoV DNA positive samples
²p = 0.044 by Fisher's exact test

ratory tract diseases was observed. When clinical diagnoses of hBoV DNA positive patients with and without coinfections were compared, pneumonia was found more frequently in children without coinfection. However, this association of borderline significance ($p = 0.044$) should be regarded with caution because of small numbers. If pneumonia was caused by hBoV infection, it is unclear how a coinfection could result in a less frequent manifestation of this disease.

The assumption in the first description of hBoV, that this virus might be an etiologic agent of respiratory tract disease, was based on the fact that hBoV infections were found significantly more often in samples negative for other respiratory viruses. However, with coinfection rates ranging from 33.3 % to 55.6 %, these findings were neither confirmed by the other studies that analyzed coinfections [6] nor by us. The true number of coinfections in our study is probably even higher than the reported 39.1 %, because antigen-based methods were used for screening of respiratory viruses other than hBoV, and because several respiratory pathogens such as coronaviruses, rhinoviruses, enteroviruses and the human metapneumovirus were not tested for. On the basis of the considerable number of coinfections, one might argue that hBoV is an aggravating factor of respiratory diseases, an innocent bystander that is just detected by chance, or a persisting virus that is reactivated by the inflammatory process.

Thus, it is uncertain at present, if hBoV is indeed an etiologic agent of respiratory tract (or other) diseases. Several viruses detected by molecular biology methods in recent years are still in search for a relevant clinical disease [11,12]. If hBoV has to be added to this list remains to be determined.

Conclusion

hBoV is frequently found in NPAs of hospitalized children with acute respiratory tract diseases. Proving the clinical relevance of hBoV is challenging, because application of some postulates of Koch is not possible. Because of the high rate of coinfections with hBoV and other respiratory pathogens, an association between hBoV and respiratory tract diseases remains unproven.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

BW and HWK designed and coordinated the study. FN performed the hBoV DNA testing. HWK, KBlessing and KBalth collected clinical data. BW, JS and FT collected virological data. All authors participated in the data anal-

ysis. BW and FN drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank the technicians of the viral diagnostic lab for skillful and dedicated assistance and Axel Rethwilm and Kirsty McPherson for helpful comments on the manuscript.

References

1. Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus AD: **Newer respiratory virus infections: human metapneumovirus, avian influenza virus, and human coronaviruses.** *Curr Opin Infect Dis* 2005, **18(2)**:141-146.
2. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY: **Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia.** *J Virol* 2005, **79(2)**:884-895.
3. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B: **Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102(36)**:12891-12896.
4. Tattersall P, Bergoin M, Bloom ME, Brown KE, Linden RM, Muzyczka N, Parrish CR, Tijsses P: **Family Parvoviridae.** In *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses* Edited by: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. London, United Kingdom, Elsevier Academic Press; 2005:353-369.
5. Rivers TM: **Viruses and Koch's Postulates.** *J Bacteriol* 1937, **33(1)**:1-12.
6. Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM: **Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children.** *J Clin Virol* 2006, **35(1)**:99-102.
7. Ma X, Endo R, Ishiguro N, Ebihara T, Ishiko H, Ariga T, Kikuta H: **Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections.** *J Clin Microbiol* 2006, **44(3)**:1132-1134.
8. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y: **Human Bocavirus infection, Canada.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12(5)**:848-850.
9. Foulongne V, Rodiere M, Segondy M: **Human Bocavirus in children.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12(5)**:862-863.
10. Herrmann B, Larsson C, Zwegberg BW: **Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA).** *J Clin Microbiol* 2001, **39(1)**:134-138.
11. Hino S: **TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome.** *Rev Med Virol* 2002, **12(3)**:151-158.
12. Stapleton JT: **GB virus type C/Hepatitis G virus.** *Semin Liver Dis* 2003, **23(2)**:137-148.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/109/prepub>

Real-Time PCR for Diagnosis of Human Bocavirus Infections and Phylogenetic Analysis[∇]

Florian Neske,¹ Kerstin Blessing,² Franz Tollmann,¹ Jörg Schubert,¹ Axel Rethwilm,¹
Hans Wolfgang Kreth,² and Benedikt Weissbrich^{1*}

University of Würzburg, Institute of Virology and Immunobiology, Versbacher Str. 7, 97078 Würzburg, Germany,¹ and
University of Würzburg, Children's Hospital, Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg, Germany²

Received 4 January 2007/Returned for modification 19 March 2007/Accepted 20 April 2007

The human bocavirus (hBoV) was first described in 2005 in respiratory tract samples. The clinical relevance of hBoV is still unclear. The aim of our study was to establish a real-time PCR assay for the detection and quantification of hBoV DNA, to apply the real-time assay for the analysis of stool and serum samples for the presence of hBoV DNA, and to perform a phylogenetic analysis of the hBoV positive samples. A total of 834 nasopharyngeal aspirates (NPA), 10 serum samples, and 31 stool samples of children with acute respiratory diseases were retrospectively tested. For phylogenetic analysis, 968 bp of the VP2 gene were sequenced from 69 hBoV-positive NPA samples. The qualitative results of the real-time hBoV PCR were in good agreement with a conventional hBoV PCR. We found that 12% of the NPA were positive for hBoV DNA. The median viral load in the NPA was 4.9×10^3 copies/ml (range, 2.7×10^0 to 1.5×10^{11} copies/ml). There was no difference of the hBoV load in NPA between children with or without known coinfection, but the load was significantly higher in children with bronchitis than in children with the diagnosis of febrile seizures. hBoV DNA was found in 1 of 10 serum samples and in 14 of 31 stool samples. hBoV sequence identity was >99% in the VP2 region. In conclusion, hBoV DNA can be found in NPA samples at very high titers. In addition to being found in the respiratory tract, hBoV was found in stool samples. The clinical relevance of these findings remains to be determined.

Respiratory tract infections are caused by a broad spectrum of microbial agents, mostly viruses. The classical spectrum of respiratory viruses includes influenza virus A and B, parainfluenza viruses, adenoviruses, respiratory syncytial virus (RSV), rhinoviruses, and coronaviruses. In recent years, the use of molecular biology methods led to the discovery of the human metapneumovirus, several coronaviruses (SARS, NL63, and HKU1), and the human bocavirus (hBoV) in respiratory tract specimens (1, 7, 25). hBoV is the first known human pathogen in the genus *Bocavirus* within *Parvoviridae* (21).

Since its first description in 3.1% of 540 Swedish children with lower respiratory tract disease (1), hBoV has been reported worldwide with frequencies ranging from 1.5 to 18.3% in respiratory samples, mostly from children (2, 3, 5, 9, 10, 14, 18, 24). hBoV has been found in patients with a broad variety of both upper and lower respiratory tract diseases and, in several studies, a large number of coinfections with other respiratory pathogens have been reported (1, 5, 6, 9, 15, 18, 24). Thus, at present it is still unclear whether hBoV is a relevant respiratory pathogen or whether it is only an innocent bystander.

The data available thus far on hBoV phylogeny indicate that there is only limited genetic variation between different hBoV strains. Sequences of PCR products located in the NP-1 region have generally shown nucleotide identity of >98% (1–3, 6, 9, 11, 14, 15, 18). However, sequence heterogeneity in the VP1/VP2 region appears to be greater than in the NP-1 region (1,

11). Therefore, a detailed analysis of hBoV phylogeny in the VP1/VP2 region should provide further knowledge on hBoV DNA variation.

The initial studies on hBoV infections have used conventional single-round PCR for hBoV detection, frequently according to the method originally described by Allander et al. (1). In order to facilitate hBoV DNA analysis and to quantify hBoV DNA in clinical samples, we designed a real-time PCR assay. In the present study, we describe the evaluation of the hBoV real-time PCR and its application for the detection of hBoV DNA in nasopharyngeal aspirates (NPA). In addition, we studied stool and serum samples of hBoV-infected children with the real-time assay in order to investigate which body compartments are affected by hBoV infection in addition to the respiratory tract. Furthermore, we sequenced the VP2 gene of hBoV-positive samples with the aim of analyzing the molecular phylogeny of hBoV infections.

MATERIALS AND METHODS

Samples. The samples tested for hBoV infection consisted of unselected stored NPA that were originally received between April 1998 and September 2005 from the Children's Hospital of the University of Würzburg for screening of respiratory viruses. All samples had been tested for the presence of antigens of adenoviruses, influenza viruses A and B, parainfluenza viruses 1 to 3, and RSV by immunofluorescence assay and for the presence of hBoV DNA by a qualitative hBoV PCR as described previously (24). In addition, archived stool and serum samples of children with positive hBoV DNA in NPA samples were also tested if they were obtained no longer than 16 days before or after the NPA. All samples had been stored at -20°C or below until hBoV testing. The study was carried out in compliance with the Helsinki declaration and was approved by the ethics committee of the medical faculty at the University of Würzburg.

Qualitative hBoV PCR. DNA was extracted from 200 μl of the NPA and serum samples using the HighPure viral nucleic acid kit (Roche, Mannheim, Germany) and from 140 μl of stool suspensions using the QIAamp viral RNA minikit (QIAGEN, Hilden, Germany). As shown previously, the viral RNA minikit can

* Corresponding author. Mailing address: Institute of Virology and Immunobiology, University of Würzburg, Versbacher Str. 7, D-97078 Würzburg, Germany. Phone: 49 931 201 49962. Fax: 49 931 201 49561. E-mail: weissbrich@vim.uni-wuerzburg.de.

[∇] Published ahead of print on 2 May 2007.

TABLE 1. Primer and probes used for the amplification of hBoV

Primer or probe ^a	Sequence (5'–3')	Gene	Position ^b	Polarity	Purpose
BoV188F ^a	GAGCTCTGTAAGTACTATTAC	NP-1	2351–2371	+	Qualitative PCR
BoV542R ^a	CTCTGTGTTGACTGAATACAG	NP-1	2704–2684	–	Qualitative PCR
BoV2391s	GCACAGCCACGTGACGAA	NP-1	2391–2408	+	Real-time PCR
BoV2411s-TM	6FAM-TGAGCTCAGGGAATATGAAAGACAAGCATCG-TMR ^c	NP-1	2411–2441	+	Real-time PCR
BoV2466a	TGGACTCCCTTTTCTTTTGTAGGA	NP-1	2466–2443	–	Real-time PCR
BoV3885s	ACAATGACCTCACAGCTGGCGT	VP-2	3885–3906	+	Phylogenetic analysis
BoV4287s	CAGCCAGCACAGGCAGAATT	VP-2	4287–4306	–	Phylogenetic analysis
BoV4456a	TCCAAATCCTGCAGCAGCTGTG	VP-2	4456–4435	+	Phylogenetic analysis
BoV4939a	TGCAGTATGCTTCTTTCTGGACG	VP-2	4939–4916	–	Phylogenetic analysis

^a Primer described by Allander et al. (1).

^b According to GenBank accession number DQ000495.

^c With 6-carboxyfluorescein (6FAM) as a fluorescent marker and TAMRA (TMR) as a fluorescent quencher.

be used for the simultaneous extraction of RNA and DNA (16, 23). In exceptional cases when the volume of the archived samples was otherwise insufficient, less than the stated starting material was used for the extraction procedures. Both kits were used according to the instructions of the manufacturers. The elution volume of the extractions was 50 μ l in case of the NPA and serum samples and 60 μ l for the stool samples.

Amplification of hBoV DNA by conventional qualitative PCR was performed with the NP-1 primers BoV188F and BoV542R (Table 1) (1). Reaction conditions and cycling parameters have been described previously (24). Briefly, the PCR was carried out using HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN), and the cycling conditions were 50 cycles (94°C for 30 s, 53°C for 40 s, and 1 min for 72°C) after a preheating step of 10 min at 95°C. Positive PCRs by agarose gel electrophoresis were sequenced for the confirmation of sequence identity. The lower limit of detection with 95% probability was determined to be 11.7 copies/reaction (95% confidence interval, 8.5 to 21.7 copies/reaction) by probit analysis.

Real-time hBoV PCR. Primers and probe for the real-time PCR were selected by Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) from the region of the NP-1 gene that was used for the qualitative PCR. Sequencing of 83 hBoV-positive samples as well as data from the literature (1) had revealed high sequence conservation in this region. The sequences of the primers (BoV2391s and BoV2466a) and of the dual-labeled probe (BoV2411s-TM) used for the real-time PCR are presented in Table 1. Blasting of primers and probe against GenBank to exclude unspecific binding did not reveal any significant homologies with other organisms.

The real-time PCR was carried out in a final volume of 20 μ l consisting of 5 μ l of extracted DNA, primers, and probe at a final concentration of 200 nM each, and 1 \times Quantitect probe master mix (QIAGEN). Amplification was performed on an ABI7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The cycling conditions were 50 cycles with 30 s at 95°C and 60 s at 60°C after a preheating step of 15 min at 95°C.

The plasmid pBoV1 containing the PCR product of the qualitative PCR in the vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used as a positive control and for the standard curve. Viral loads were calculated from the threshold cycle (C_T) values of the individual samples with respect to the standard curve. To minimize background fluorescence, the baseline was set two cycles below the first logarithmic amplification cycle.

General laboratory procedures to prevent PCR contamination were strictly adhered to. One negative control was extracted and amplified for every five NPA samples. All negative controls were found to be negative for hBoV DNA.

Phylogenetic analysis of the VP2 gene. Positive hBoV samples were amplified with the two overlapping primer pairs BoV3885s-BoV4456a and BoV4287s-BoV4939a (Table 1). The PCR was carried out using HotStarTaq DNA polymerase (QIAGEN) with the following cycling conditions: 95°C for 12 min, followed by 52 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 30 s, with a final elongation step at 72°C for 7 min. Positive PCRs were sequenced in both directions using BigDye terminator 3.1 chemistry and the ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). The sequences were aligned by CLUSTAL W, and a topology tree was constructed with MEGA version 3.1 (12) by using the Kimura two-parameter estimation to generate the nucleotide distance matrix. To evaluate the phylogenetic relevance, bootstrapping analysis with 1,000 replicates was performed by the neighbor-joining method and the p-distance parameter.

Statistical analysis. Statistical analysis was carried out by using GraphPad Prism version 3.0c for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA) and SPSS version 13.01 for windows (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Validation of the quantitative real-time PCR. In order to validate the quantitative real-time PCR, the linearity of the assay, the lower limit of detection, intra-assay and interassay variation, and the specificity of the assay were all investigated. The curve was linear over the range from 3.8×10^0 to at least 3.8×10^8 copies/reaction. For standard curves of 17 independent runs, the mean value of the slope was -3.56 with a standard deviation of 0.1. The mean of the coefficient of correlation was 0.993, with a standard deviation of 0.006.

The lower limit of detection was determined by using probit analysis. It was based on three independent runs with a total of 24 replicates at the dilutions 37.5, 18.8, 15.0, 9.4, 7.5, 3.8, 3.0, 1.5, 0.8, and 0.4 copies/reaction. A concentration of 14 copies/reaction (95% confidence interval, 10 to 26 copies/reaction) was detectable with 95% probability (data not shown). This corresponds to a lower limit of detection of 700 copies per ml of starting material (serum or NPA).

The reliability of the real-time PCR was assessed by analyzing the intra-assay and interassay variation (Table 2). The intra-assay coefficient of variation of the C_T values for three replicates was 2.6% or lower for standard concentrations of 3.8×10^8 to 3.8×10^3 . The interassay coefficient of variation of a run control (nominal concentration, 3.8×10^5) that was regularly included in each run was 15.21% (data not shown).

To test the primers and probe for unspecific binding, samples known to be positive for parvovirus B19 and adenovirus DNA were tested in the hBoV real-time PCR assay. All samples were negative in the hBoV assay.

TABLE 2. Intra-assay variation of the hBoV real-time PCR assay for different concentrations of the plasmid pBoV1

No. of copies/reaction	C_T					
	Value for replicate:			Mean	SD	CV (%) ^a
	1	2	3			
3.8 E + 08	12.82	12.37	12.19	12.46	0.32	2.60
3.8 E + 07	15.94	15.90	15.93	15.92	0.02	0.13
3.8 E + 06	19.19	19.17	19.08	19.15	0.06	0.31
3.8 E + 05	22.60	22.62	22.62	22.61	0.01	0.05
3.8 E + 04	26.02	25.97	26.03	26.01	0.03	0.12
3.8 E + 03	29.41	29.47	29.20	29.36	0.14	0.48

^a CV, coefficient of variation.

TABLE 3. Comparison of qualitative and real-time PCR for hBoV DNA

Real-time PCR result	Qualitative PCR result ^a		
	Positive	Negative	Total
Positive	87 (84)	13 (20)	100 (104)
Negative	3 (6)	731 (724)	734 (730)
Total	90 (90)	744 (744)	834 (834)

^a Values indicate the number of final results obtained after retesting discordant samples. For details, see the text. The numbers in parentheses indicate the results from the initial testing.

Quantitative real-time PCR of NPA. For clinical evaluation of the hBoV real-time PCR, 11 samples from the period of 1998 to 2001 and 823 samples from 2002 to September 2005 NPA that had previously been tested by the conventional qualitative hBoV DNA (24) were retested with the real-time assay. A total of 84 samples were positive, and 724 samples were negative with both assays (Table 3). Discordant results in initial testing were obtained for 26 samples. All discordant samples were retested twice with both assays. An initially discordant sample was regarded as positive for the qualitative or real-time PCR assay, if at least two of the three results obtained with the assay were positive. After retesting, 16 samples remained with discordant results. In order to resolve the discrepancies, the discordant samples were further tested using the two primer pairs designed for the phylogenetic analysis VP2. In all samples positive only by real-time PCR, hBoV DNA was amplified by at least one additional primer pair, thus confirming the positive real-time PCR result. One of the three samples positive only by conventional PCR was confirmed by the additional primer pairs. Overall, the frequency of hBoV detection in our patient population increased from 10.8 to 12.0% with the real-time PCR assay. However, the proportions of positive results obtained with the two methods were not significantly different ($P = 0.44$ [chi-square test]).

The median value of the viral load of all hBoV-positive NPA samples in the real-time PCR assay was 4.9×10^3 copies/ml (range, 2.7×10^0 to 1.5×10^{11} copies/ml). The median viral load of the samples that were positive only in the real-time PCR was 1.4×10^2 copies/ml, which was significantly lower than the median viral load of the samples that were positive in both assays ($P < 0.0001$ [Mann-Whitney test]).

Because it was found previously that a large number of hBoV DNA-positive children were coinfecting with other respiratory pathogens [RSV, adenovirus, influenza virus A/B, parainfluenza virus 1/2/3(24)], viral loads in NPA samples of children with coinfections were compared to viral loads of children without detectable coinfection. Of the children positive for hBoV DNA with the real-time PCR assay, 41% ($n = 41$) were found to be coinfecting with RSV ($n = 16$), adenoviruses ($n = 13$), influenza A virus ($n = 9$), parainfluenza viruses ($n = 4$), or influenza B virus ($n = 1$), including two triple infections of RSV, parainfluenza virus 3, and hBoV. The hBoV loads in the NPA samples of these children and in the NPA samples of children without coinfection are presented in Fig. 1. Median values between both groups were not significantly different (median with coinfection = 4.3×10^3 copies/ml; median

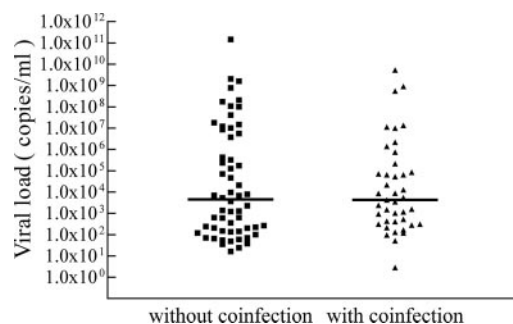


FIG. 1. Viral load in NPA of children with or without respiratory coinfections. In addition to hBoV DNA, all samples were tested for antigens of RSV, influenza virus A/B, adenoviruses, and parainfluenza viruses 1 to 3 by immunofluorescence assay. Median values are indicated by horizontal bars.

without coinfection = 4.5×10^3 copies/ml; $P = 0.759$ [Mann-Whitney test]).

In order to examine possible indications for an association of hBoV with clinical disease, the viral loads in NPA samples were compared with respect to the final clinical diagnosis (Fig. 2). A broad range of viral loads was observed in most of the disease groups. The median values of the hBoV loads were significantly different between the NPA of children with bronchitis and febrile seizures ($P = 0.0195$ by Kruskal-Wallis analysis with Dunn's post test). The lowest median of viral loads was found in children with febrile seizures, whereas the highest median was observed in children with bronchiolitis. However, the number of hBoV DNA-positive children with bronchiolitis was small ($n = 2$). Coinfections were not identified in these two children.

hBoV PCR of serum and stool samples. For some of the patients with hBoV-positive NPA samples, archived stool and serum samples from the same hospitalization episode were available. These samples were also tested by hBoV real-time PCR. One of ten serum samples was weakly positive for hBoV DNA (<700 copies/ml). The serum sample was received on the same day as the hBoV-positive NPA sample. Of 31 stool sam-

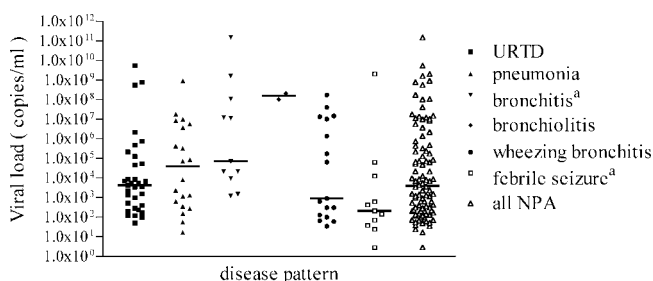


FIG. 2. Bocavirus load in NPA according to the clinical diagnosis. The median values (horizontal bars) were 4.3×10^3 copies/ml for upper respiratory tract disease (URTD), 4.0×10^4 copies/ml for pneumonia, 7.1×10^4 copies/ml for bronchitis, 1.6×10^8 copies/ml for bronchiolitis, 2.1×10^2 copies/ml for febrile seizures, 9.3×10^2 copies/ml for wheezing bronchitis, and 4×10^3 copies/ml for all NPA. The bocavirus load difference between the NPA of children with bronchitis and febrile seizures was statistically significant as determined by Kruskal-Wallis analysis and Dunn's post test (indicated by superscript a; $P = 0.0195$).

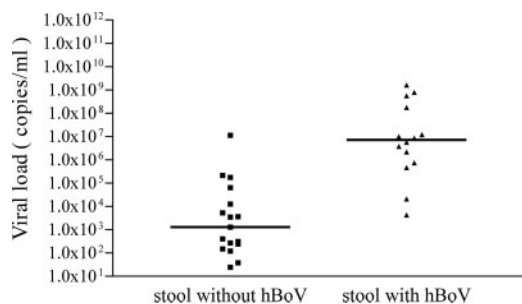


FIG. 3. Comparison of hBoV loads in NPA according to the hBoV status of stool samples from the same patients. Median values as indicated by horizontal bars were significantly different between the two groups ($P < 0.001$ [Mann-Whitney test]).

ples tested, 14 (45.2%) were found to be positive for hBoV DNA. Inhibition of the hBoV-negative stool samples was excluded by spiking experiments with hBoV plasmid DNA (data not shown). In order to determine factors associated with the presence of hBoV DNA in stool samples, the hBoV load in NPA was analyzed according to the hBoV status of the stool samples (Fig. 3). The median viral load of hBoV in NPA was significantly higher in children with hBoV-positive stool samples than in children with negative hBoV DNA stool samples (7.2×10^6 copies/ml versus 1.3×10^3 copies/ml; $P < 0.001$ [Mann-Whitney test]). An association of the hBoV DNA detection in stool samples and the time span between the acquisition of the NPA and stool samples was not apparent (data not shown).

Phylogenetic analysis of hBoV-positive samples. In order to investigate the divergence of hBoV genomes, we sequenced 968 bp of the VP2 gene (nucleotides 465 to 1432) from 69 hBoV-positive NPA samples. Overall, there was high nucleotide identity of $>99\%$ between all hBoV sequences. Nevertheless, the phylogenetic analysis resulted in two clusters of sequences with a bootstrap value of 99% (Fig. 4). Overall, 34 of the 968 nucleotide positions were variable, with 93% transitions and 7% transversions. Most of the nucleotide variations were conservative. Thus, at the amino acid level, there was 99.7% sequence identity. No apparent association was observed between phylogenetic clustering and seasonal distribution or disease manifestation (data not shown).

DISCUSSION

Following the first description of the hBoV by Allander et al. (1), several reports have confirmed the presence of hBoV infections in patient populations from different continents, suggesting that hBoV is a virus of worldwide distribution (3, 6, 8, 10, 18, 19, 24). The initial studies on hBoV infections have used conventional PCR methods with agarose gel electrophoresis. In order to improve the diagnostic tools for hBoV detection, we have established a real-time PCR method. In our validation experiments, this assay proved to be sensitive, specific, and reliable for hBoV DNA amplification, and quantification was possible over a broad linear range. In comparison to the conventional PCR method used previously (24), the sensitivities determined by probit analysis of both assays were very similar. When NPA samples of children with respiratory tract

diseases were retested with the real-time assay, slightly more samples than with the conventional PCR method were positive, and the frequency of hBoV detection in our patient population increased from 10.8 to 12.0%. However, this difference was not significant. Because the amplified PCR fragment in the real-time PCR is shorter than in the conventional PCR (76 bp versus 354 bp), the real-time PCR may appear more sensitive when extracted DNA from the patient samples is fragmented.

One other study using real-time PCR and probe detection for hBoV amplification has been published thus far (13). Lu et al. established two real-time PCR assays with primers and probes located in the NS1 and in the NP-1 region. Sensitivity, amplification efficiency, and reproducibility were similar to the data obtained with our assay. A total of 1,178 throat swab samples from Thai patients with pneumonia were analyzed with their assay. Most of the samples contained only low copy numbers of hBoV DNA as judged by the C_T values. However, a thorough quantitative analysis and a comparison of different disease groups was not performed by Lu et al. (13).

The frequency of hBoV infections in our population remains one of the highest reported thus far and is similar to the 11.3% positive samples in a study from Korea (5). Several other studies have described frequencies ranging from 1.5 to 18.3% (2, 3, 5, 9, 10, 14, 18, 24). Differences in the positivity rate for hBoV DNA may be accounted for by different patient characteristics and seasonal and geographical variation. In addition, the results may be influenced by the sensitivity of the hBoV PCR assays used. Because information about this aspect has been provided only in two studies (13, 15), it is not possible at present to estimate how much the reported detection frequencies for hBoV DNA may be affected by assay sensitivity.

Real-time PCR provides the possibility of quantification of DNA copies per reaction with reference to a standard curve. In contrast to serum or plasma, calculation of a viral load in the original patient sample is only of limited value for NPA because of technical variations in the sample acquisition procedure. For example, the volume of the NPA on arrival in the lab ranged approximately from 0.5 and 10 ml. Although this should be borne in mind, the observed viral loads in patient samples differed by a factor of 10^8 , a range much larger than could be accounted for by variation in NPA volumes obtained.

Surprisingly, the median values of the bocavirus loads in NPA of children with or without known coinfection with other viral pathogens were almost identical. This is in contrast to the situation with coronavirus NL63. In children who were only infected with NL63, the viral load for NL63 was significantly higher than in children who were coinfecting with NL63 and other viruses (22). With the limitation that additional coinfections remained undetected in our study because antigen-based methods were used for screening of respiratory viruses other than hBoV, and because several respiratory pathogens such as coronaviruses, rhinoviruses, enteroviruses, and the human metapneumovirus were not tested for, our data do not indicate that hBoV replication is influenced by the presence of other respiratory viruses. Also, the finding of comparatively low viral loads in NPA of more than half of the children without coinfection does not support the assumption that hBoV causes respiratory disease in these children.

Thus, whether hBoV is associated with clinical manifestations or is merely an innocent bystander is still an unresolved



FIG. 4. Phylogenetic analysis of the VP2 gene. Phylogenetic analysis of hBoV VP2 gene sequences of Germany, Sweden (st1 DQ000495; st2 DQ000496), China (CZ643 DQ457413), and the United States (CRD2 DQ340570). The topology tree was constructed in MEGA3.1. Kimura two-parameter estimation was used to generate the nucleotide distance matrix. The phylogenetic relevance was analyzed by bootstrapping ($n = 1,000$) and is indicated in nodal confidence values. Only values above 60 are displayed. The scale gives the percent nucleotide substitution with respect to branch length.

Downloaded from jcm.asm.org at PAUL EHRLICH INST BUNDESAMT on July 6, 2009

question. Based on the hypothesis that high viral loads may be an indication of pathogenic relevance, we compared the hBoV load in NPA according to the final diagnosis. A broad range of viral loads, including values of 10^8 copies/ml and higher, was observed for children with upper respiratory tract disease, pneumonia, bronchitis, and wheezing bronchitis. In contrast, in children with febrile seizures and without prominent respiratory findings the highest viral load was only about 10^5 copies/ml, and the median of 2.1×10^3 copies/ml was the lowest of all groups. High viral loads were observed in the two children with bronchiolitis. However, because of the small number these results should be interpreted with much caution until more data from children with bronchiolitis are available. Nevertheless, an association between hBoV and bronchiolitis based on qualitative PCR findings has been indicated in other studies (2, 5, 9, 17).

Because hBoV is distantly related to parvovirus B19, a virus highly viremic for several weeks after primary infection, we analyzed serum samples of hBoV-infected children for the presence of hBoV DNA. Only one of ten samples was weakly positive. However, detection of hBoV in NPA samples is not proof of a primary infection, and therefore, we may have missed a viremic phase with the serum samples examined in the present study. Serological studies to detect hBoV-specific immunoglobulin M and immunoglobulin G seroconversion will be necessary to determine the time point of primary hBoV infection. Once this information is available, elucidation of the question of whether hBoV is generally viremic or not will become possible.

hBoV is most closely related to the other two viruses in the genus *Bocavirus*, the minute virus of canines (MVC) and the bovine parvovirus (BPV). MVC and BPV are known to cause gastrointestinal infections in dogs and calves, respectively (4, 20). Therefore, we also examined available stool samples of children with hBoV-positive NPA. In contrast to the serum results, the stool samples were frequently positive for hBoV DNA (14 of 31 samples). This finding may be explained by replication of hBoV in gastrointestinal epithelium. The observation that the hBoV load in the NPA samples of the children with hBoV-positive stool samples was significantly higher than the hBoV load in the children with hBoV-negative stool samples, leads to an alternative explanation for the presence of hBoV DNA in stool samples. hBoV may be swallowed during respiratory tract infection and subsequently excreted in the feces without further replication steps in the gastrointestinal tract. Whether the hBoV DNA detected in stool samples is derived from infectious or from degraded virus particles and if hBoV may be a cause of diarrhea, remains to be determined once cell culture and animal model systems for hBoV become available.

Phylogenetic analysis of the hBoV-positive NPA samples in our study population confirmed previous findings that hBoV is highly conserved. Although this finding may be biased by the fact that most studies published thus far have used PCR screening methods based on the NP-1 sequence, which is highly conserved, there is currently no evidence that more than one hBoV genotype exists. In contrast, the sequence variation both on the nucleotide and amino acid level is considerably greater for parvovirus B19. Thus, it may be speculated that hBoV has entered the human population more recently than

parvovirus B19. Alternatively, the diverse degrees of variation may be due to different replication strategies.

In conclusion, we have successfully established and used a real-time PCR assay for the detection of hBoV DNA. Application of this assay for quantitative analysis has shown that hBoV DNA can be found in NPA samples at very high titers. In addition to the respiratory tract, hBoV was also found in stool samples. However, the clinical relevance of hBoV infections remains uncertain both for the respiratory and for the gastrointestinal tract.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the technicians of the viral diagnostic lab for skillful and dedicated assistance and Kirsty McPherson for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Allander, T., M. T. Tammi, M. Eriksson, A. Bjerkner, A. Tiveljung-Lindell, and B. Andersson. 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:12891–12896.
2. Arnold, J. C., K. K. Singh, S. A. Spector, and M. H. Sawyer. 2006. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin. Infect. Dis.* **43**:283–288.
3. Bastien, N., K. Brandt, K. Dust, D. Ward, and Y. Li. 2006. Human bocavirus infection, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:848–850.
4. Binn, L. N., E. C. Lazar, G. A. Eddy, and M. Kajima. 1970. Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect. Immun.* **1**:503–508.
5. Choi, E. H., H. J. Lee, S. J. Kim, B. W. Eun, N. H. Kim, J. A. Lee, J. H. Lee, E. K. Song, S. H. Kim, J. Y. Park, and J. Y. Sung. 2006. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000–2005. *Clin. Infect. Dis.* **43**:585–592.
6. Chung, J. Y., T. H. Han, C. K. Kim, and S. W. Kim. 2006. Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1254–1256.
7. Fouchier, R. A., G. F. Rimmelzwaan, T. Kuiken, and A. D. Osterhaus. 2005. Newer respiratory virus infections: human metapneumovirus, avian influenza virus, and human coronaviruses. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**:141–146.
8. Foulongne, V., Y. Olejnik, V. Perez, S. Elaerts, M. Rodiere, and M. Segondy. 2006. Human bocavirus in French children. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1251–1253.
9. Foulongne, V., M. Rodiere, and M. Segondy. 2006. Human bocavirus in children. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:862–863.
10. Kaplan, N. M., W. Dove, A. F. Abu-Zeid, H. E. Shamoan, S. A. Abd-Eldayem, and C. A. Hart. 2006. Human bocavirus infection among children, Jordan. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1418–1420.
11. Kesebir, D., M. Vazquez, C. Weibel, E. D. Shapiro, D. Ferguson, M. L. Landry, and J. S. Kahn. 2006. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J. Infect. Dis.* **194**:1276–1282.
12. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* **5**:150–163.
13. Lu, X., M. Chittaganpitch, S. J. Olsen, I. M. Mackay, T. P. Sloots, A. M. Fry, and D. D. Erdman. 2006. Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3231–3235.
14. Ma, X., R. Endo, N. Ishiguro, T. Ebihara, H. Ishiko, T. Ariga, and H. Kikuta. 2006. Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1132–1134.
15. Manning, A., V. Russell, K. Eastick, G. H. Leadbetter, N. Hallam, K. Templeton, and P. Simmonds. 2006. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J. Infect. Dis.* **194**:1283–1290.
16. Rohayem, J., S. Berger, T. Juretzek, O. Herchenroder, M. Mogel, M. Poppe, J. Henker, and A. Rethwilm. 2004. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect norovirus, astrovirus, and adenovirus in clinical stool samples. *J. Virol. Methods* **118**:49–59.
17. Simon, A., P. Groneck, B. Kupfer, R. Kaiser, G. Plum, R. L. Tillmann, A. Muller, and O. Schildgen. 2007. Detection of bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of a child with bronchiolitis. *J. Infect.* **54**:e125–127.
18. Sloots, T. P., P. McErlean, D. J. Speicher, K. E. Arden, M. D. Nissen, and I. M. Mackay. 2006. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J. Clin. Virol.* **35**:99–102.
19. Smuts, H., and D. Hardie. 2006. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1457–1458.
20. Storz, J., J. J. Leary, J. H. Carlson, and R. C. Bates. 1978. Parvoviruses associated with diarrhea in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **173**:624–627.

21. **Tattersall, P., M. Bergoin, M. E. Bloom, K. E. Brown, R. M. Linden, N. Muzyczka, C. R. Parrish, and P. Tijsses.** 2005. Family *Parvoviridae*, p. 353–369. In C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (ed.), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London, United Kingdom.
22. **van der Hoek, L., K. Sure, G. Ihorst, A. Stang, K. Pyrc, M. F. Jebbink, G. Petersen, J. Forster, B. Berkhout, and K. Uberla.** 2005. Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med.* **2**:e240.
23. **Weissbrich, B., F. Harms, and V. ter Meulen.** 1995. Detection of enterovirus RNA and herpesvirus DNA in CSF by multiplex PCR. *QIAGEN News* **2**:4–5.
24. **Weissbrich, B., F. Neske, J. Schubert, F. Tollmann, K. Blath, K. Blessing, and H. W. Kreth.** 2006. Frequent detection of Bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect. Dis.* **6**:109.
25. **Woo, P. C., S. K. Lau, C. M. Chu, K. H. Chan, H. W. Tsoi, Y. Huang, B. H. Wong, R. W. Poon, J. J. Cai, W. K. Luk, L. L. Poon, S. S. Wong, Y. Guan, J. S. Peiris, and K. Y. Yuen.** 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* **79**:884–895.

PROLONGED DETECTION OF HUMAN BOCAVIRUS DNA IN NASOPHARYNGEAL ASPIRATES OF CHILDREN WITH RESPIRATORY TRACT DISEASE

Kerstin Blessing, MD,* Florian Neske, Dipl. Biol.,† Ulla Herre, MD,† Hans-Wolfgang Kreth, MD,* and Benedikt Weissbrich, MD†

Abstract: Increasing evidence suggests that the recently identified human bocavirus (hBoV) is a cause of acute respiratory illness. However, the duration of hBoV shedding from the respiratory tract as demonstrated by positive hBoV polymerase chain reaction is unclear. We describe the virologic and clinical characteristics of 6 immunocompetent children with hBoV persistence in the respiratory tract for up to 4.5 months.

Key Words: human bocavirus, respiratory infection, persistence, viral load

Accepted for publication April 2, 2009.

From the *Children's Hospital, University of Würzburg, Würzburg, Germany; and †Institute of Virology and Immunobiology, University of Würzburg, Würzburg, Germany.

Address for correspondence: Benedikt Weissbrich, MD, University of Würzburg, Institute of Virology and Immunobiology, Versbacher Str 7, 97078 Würzburg, Germany. E-mail: weissbrich@vim.uni-wuerzburg.de.

Copyright © 2009 by Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/INF.0b013e3181a854ae

The human bocavirus (hBoV), a novel member of the *Parvoviridae*, was recently identified by molecular screening methods in respiratory tract samples of Swedish children.¹ hBoV is a virus of worldwide distribution and its DNA has been found by polymerase chain reaction in 1.5% to 19% of respiratory secretions from children with acute respiratory tract diseases.² Elucidation of the clinical relevance of hBoV has been difficult because of a high coinfection rate of hBoV DNA positive samples with other respiratory viruses.² Furthermore, there are no cell culture systems or animal models for hBoV. Based on the combination of a high hBoV load in nasopharyngeal samples ($>10^4$ copies/mL) and concomitant hBoV DNA detection in sera, a model has been proposed in which hBoV is associated with acute respiratory tract diseases but persists in the respiratory tract for a longer period of time than other respiratory viruses after primary infection.³ Recently, serological evidence of primary hBoV infection has been demonstrated in children with acute respiratory tract diseases.^{4,5} Although the combined evidence suggests that at least a proportion of positive hBoV DNA findings in respiratory tract samples is indicative of hBoV disease associated with primary infection, the clinical significance of low amounts of hBoV DNA in nasopharyngeal samples is unclear. In a child with acute lymphoblastic leukemia, hBoV DNA was detected over a period of 6 months during 5 consecutive febrile episodes.⁶ However, data on the duration of hBoV DNA shedding in immunocompetent children are largely unavailable.

To study this aspect, we identified children in whom hBoV DNA was repeatedly detected in nasopharyngeal aspirates (NPA) during successive episodes of acute respiratory tract diseases. Here, we describe the virologic and clinical characteristics of these patients. They were part of a cohort of children in whom detection of hBoV DNA by conventional and quantitative real-time polymerase chain reaction has been described previously.^{7,8} The study was approved by the ethics committee of the medical faculty at the University of Würzburg.

CASE REPORTS

Case 1. Case 1 describes a 1-year-old boy who was admitted to the hospital in February 2003 with high fever and signs of respiratory

tract infection. Pneumonia was diagnosed by chest radiography. Antigen screening for respiratory viruses (influenza virus A/B, parainfluenza virus 1/2/3, respiratory syncytial virus [RSV], adenoviruses) by immunofluorescence assay was negative. Three weeks after discharge, he was rehospitalized with symptoms of high fever, cough, diarrhea, dehydration, and otitis media. Bronchiolitis was diagnosed and treated symptomatically. Influenza virus A antigen was identified in NPA. hBoV DNA was detected retrospectively in stored NPA obtained during both episodes of hospitalization (Table 1).

Case 2. His twin brother (case 2) was hospitalized with clinical symptoms including fever, cough, tachypnea, and dehydration one week after the first admission of his sibling. Pneumonia was also diagnosed. Together with his twin brother, he was readmitted 2 weeks later with high fever, cough, rhinitis, and dehydration. Influenza virus A antigen was positive by immunofluorescence assay, and hBoV DNA was detected retrospectively in stored NPA from both episodes of hospitalization.

Case 3. Case 3 describes a 2-month-old girl who was admitted with symptoms of cough, vomiting and fever. On the following day, she was transferred to the intensive care unit because of severe dyspnea, hypercapnia, and increasing oxygen demand. Her diagnosis was bronchiolitis. Oxygen was administered for 4 days. RSV antigen was detected in NPA. Five weeks later, she was again hospitalized because of bronchiolitis. Antigen screening for respiratory viruses was negative. Retrospective analysis of stored NPA obtained during the 2 episodes of hospitalization was positive for hBoV DNA.

Case 4. Case 4 describes a 2-year-old girl with Sturge-Weber syndrome, severe epilepsy, and recurrent respiratory tract infections. She was hospitalized in January, February, and March 2005 for repeated episodes of pneumonia of suspected viral origin. In February 2005, she developed severe respiratory failure and required mechanical ventilation for one week. Immunofluorescence screening for respiratory viruses was negative in January and March 2005, but positive for RSV antigen in February 2005. Five NPA samples collected during the 3 hospital stays were retrospectively tested for hBoV DNA. Two samples from January 2005 were negative, whereas hBoV DNA was detected in 3 samples in February and March.

Case 5. Case 5 describes a 1.7-year-old boy who was hospitalized 7 times between October 2006 and May 2007 because of respiratory tract infections. Immunofluorescence screening for respiratory viruses was only positive for influenza A antigen in February 2007. When retrospectively tested for hBoV DNA, 5 samples obtained between December 2006 and May 2007 were positive.

Case 6. Case 6 describes an 8-month-old girl, who was hospitalized with a clinical history of respiratory tract infection for 3 weeks with symptoms of cough, wheezing, and tachypnea. Pneumonia was diagnosed. Screening for viral antigens in NPA was negative. Two weeks after discharge from hospital, she was readmitted with fever, cough, and wheezing. Chest radiography showed infiltrates. NPA analysis was positive for RSV antigen. hBoV DNA was retrospectively detected in both NPA.

DISCUSSION

We describe prolonged hBoV DNA shedding in follow-up NPA samples from 6 infants and children. In one patient (case 5), hBoV DNA was slowly cleared during a period of 4.5 months. All patients were immunocompetent. Our findings are in agreement with a recent prospective study in Danish children.⁹ Based on the model suggested by Allander et al.,³ primary hBoV infection at the disease episode of initial hBoV detection seems likely in cases 1, 2, 4, and 5, because the initial hBoV loads in NPA were high

TABLE 1. Clinical and Diagnostic Findings of Patients With Prolonged Detection of hBoV DNA in Nasopharyngeal Aspirates

Case	Age Gender	Underlying Disease	Hospitalization	Length of Hospital Stay (d)	Diagnosis	Interval Between Samples* (d)	hBoV Load [†] (Copies/mL)	Antigen Screening [‡]
1 [§]	1 yr, m	None	February 2003	12	Pneumonia	0	1.2 E+7	Neg.
			March 2003	6	Bronchiolitis	32	2.2 E+4	Influenza A
2 [§]	1 yr, m	None	February 2003	7	Pneumonia	0	1.6 E+9	Neg.
			March 2003	6	Bronchiolitis	25	5.5 E+3	Influenza A
3	2 mo, f	None	March 2004	10	Bronchiolitis	0	Pos. <700	RSV
			April 2004	9	Bronchiolitis	48	4.4 E+5	Neg.
4	2 yr, f	Sturge-Weber-syndrome, severe epilepsy	January 2005	8	Pneumonia	-18	Neg.	Neg.
			February 2005	33	Pneumonia	0	9.2 E+8	RSV
5	1.7 yr, m	None	Mach 2005	5	Pneumonia	15	1.3 E+3	Neg.
			October 2006	6	Bronchiolitis	29	Pos. <700	Neg.
			December 2006	4	Pneumonia	-71	Neg.	Neg.
			January 2007	9	Pneumonia	0	2.8 E+8	Neg.
			February 2007	7	Pneumonia	25	2.5 E+3	Neg.
			March 2007	7	Pneumonia	53	5.9 E+2	Influenza A
			May 2007	7	Bronchitis	78	9.1 E+3	Neg.
			May 2007	7	Bronchiolitis	135	1.5 E+3	Neg.
6	8 mo, f	None	May 2007	6	Bronchiolitis	142	Neg.	Neg.
			January 2007	7	Pneumonia	0	8.8 E+2	Neg.
			January 2007	5	Pneumonia	10	1.0 E+6	RSV
			April 2007	3	Laryngotracheitis	98	2.1 E+3	Neg.

*Where available, hBoV DNA negative samples collected before and after the hBoV DNA positive period are also documented. The date of the first detection of hBoV DNA was defined as time point 0.

[†]Pos. <700" denotes positive samples below the lower limit of quantification (700 copies/mL).

[‡]Antigen screening by immunofluorescence assay includes: influenza virus A/B, parainfluenza virus 1/2/3, respiratory syncytial virus (RSV), adenoviruses.

[§]Case 1 and 2 are twin brothers.

(>10,000 copies/mL). The clinical relevance of persistent detection of hBoV DNA in respiratory tract samples in the course of several weeks and months is unclear. The observations in our patients could be explained by several hypotheses. These include persistent hBoV infection as a predisposing or aggravating factor of acute respiratory tract infection with other viral agents, hBoV reactivation induced by other infections, or hBoV as an "innocent bystander" that is detected by chance.

Moreover, we cannot completely exclude reinfection as the cause of repetitive detection of hBoV DNA in NPA. To study this issue, we sequenced the hBoV VP2 region in 11 of the 17 hBoV DNA positive NPA[§] and found 100% sequence identity within samples from individual patients. This finding is compatible with persistent infection or reactivation. However, because of the high sequence conservation (>98%) of all hBoV strains described to date, full sequence identity does not entirely rule out reinfection. The sequence identity between patients in this study was >98.9%.

Our results clearly show that qualitative hBoV DNA detection in single NPA samples is not sufficient to implicate hBoV as the causative agent of acute respiratory tract disease. This is in contrast to most other respiratory viruses, where positive results by direct detection methods in the context of acute respiratory tract disease are generally considered adequate proof of a causal relationship. Serologic assays to diagnose primary infection, detection of hBoV viremia, or high viral loads in respiratory tract samples may be more useful predictors of hBoV-associated clinical disease than only qualitative detection of hBoV DNA in respiratory tract samples.

Our data indicate that hBoV persistence for at least several weeks are not uncommon. Further studies are necessary to elucidate the duration, the target site, and the clinical relevance of hBoV persistence.

REFERENCES

- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:12891-12896.
- Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol*. 2008;41:29-33.
- Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis*. 2007;44:904-910.
- Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, et al. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3218-3223.
- Kantola K, Hedman L, Allander T, et al. Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin Infect Dis*. 2008;46:540-546.
- Koskenvuo M, Mottonen M, Waris M, et al. Human bocavirus in children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Pediatr*. 2008;167:1011-1015.
- Weissbrich B, Neske F, Schubert J, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis*. 2006;6:109.
- Neske F, Blessing K, Tollmann F, et al. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2116-2122.
- von Linstow ML, Høgh M, Høgh B. Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: results from a prospective birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:897-902.

1 **High prevalence of antibodies against polyomavirus WU,**
2 **polyomavirus KI, and human bocavirus in German blood**
3 **donors**

4
5 Florian Neske¹, Christiane Prifert¹, Barbara Scheiner¹, Moritz Ewald¹, Jörg Schubert¹,
6 Andreas Opitz², Benedikt Weissbrich^{1§}

7
8 ¹Institute of Virology and Immunobiology, University of Würzburg,
9 Versbacher Str. 7, 97078 Würzburg, Germany

10 ²Institute of Transfusion Medicine and Hemotherapy, University Clinic Würzburg, Josef-
11 Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg, Germany

12
13 §Corresponding author

14
15 Email addresses:

16 FN: nesfl@pei.de

17 CP: c_prifert@gmx.de

18 BS: scheiner@vim.uni-wuerzburg.de

19 ME: ewald@vim.uni-wuerzburg.de

20 JS: schubert@vim.uni-wuerzburg.de

21 AO: Opitz_A@klinik.uni-wuerzburg.de

22 BW: weissbrich@vim.uni-wuerzburg.de

23

24

25

25 **Abstract**

26 **Background:**

27 DNA of the polyomaviruses WU (WUPyV) and KI (KIPyV) and of human bocavirus (hBoV)
28 has been detected with varying frequency in respiratory tract samples of children. However,
29 only little is known about the humoral immune response against these viruses. Our aim was to
30 establish virus-specific serological assays and to determine the prevalence of immunoglobulin
31 G (IgG) against these three viruses in the general population.

32 **Methods:**

33 The capsid proteins VP1 of WUPyV and KIPyV and VP2 of hBoV were cloned into
34 baculovirus vectors and expressed in Sf9 insect cells. IgG antibodies against WUPyV VP1,
35 KIPyV VP1, and hBoV VP2 were determined by immunofluorescence assays in 100 plasma
36 samples of blood donors.

37 **Results:**

38 The median age of the blood donors was 31 years (range 20 - 66 yrs), 52 % were male. 89 %
39 of the samples were positive for WUPyV IgG (median age 31 yrs, 49.4 % male), 67 % were
40 positive for KIPyV IgG (median age 32 yrs, 46.3 % male), and 76 % were positive for hBoV
41 IgG (median age 32 yrs, 51.3 % male). For WUPyV and hBoV, there were no significant
42 differences of the seropositivity rates with respect to age groups or gender. For KIPyV, the
43 seropositivity rate increased significantly from 59 % in the age group 20 – 29 years to 100 %
44 in the age group > 50 years.

45 **Conclusions:**

46 High prevalences of antibodies against WUPyV, KIPyV, and hBoV were found in plasma
47 samples of healthy adults. The results indicate that primary infection with these viruses occurs
48 during childhood or youth. For KIPyV, the seropositivity appears to increase further during
49 adulthood.

50

50 **Background**

51 Infections of the respiratory tract are a major cause of human morbidity. They are most often
52 caused by respiratory viruses, which include the well-known pathogens respiratory syncytial
53 virus, influenza viruses A and B, adenoviruses, parainfluenza viruses, rhinoviruses, and
54 coronaviruses. In recent years, a number of unknown viruses have been identified in the
55 respiratory tract by molecular methods, including the human metapneumovirus, several
56 corona viruses, the human bocavirus (hBoV), and most recently the polyomaviruses WU
57 (WUPyV) and KI (KIPyV) [1-4].

58 Initial studies on WUPyV and KIPyV have looked at genome detection rates using
59 polymerase chain reaction (PCR) methods. The genoprevalences for WUPyV and KIPyV in
60 respiratory samples from children with acute respiratory tract diseases were found to range
61 from 1.1 to 7.0 % [4-10] and 0.9 to 2.7 % [3, 6-8, 11], respectively. However, WUPyV and
62 KIPyV DNA were found at similar frequencies in control groups without respiratory tract
63 disease [5, 8, 11]. Therefore, the clinical relevance of WUPyV and KIPyV infections is
64 currently unclear. In contrast to PCR assays, serological assays for antibody detection against
65 hBoV are more complex to establish. However, determining immunoglobulin (Ig) M and IgG
66 antibodies in appropriate serum or plasma samples allows to define the point in time of
67 primary infection as well as exposure rates. One study describing the seroepidemiology of
68 polyomaviruses including WUPyV and KIPyV in adults has recently been published [12].
69 hBoV is a virus of worldwide distribution. Its DNA has been found in 1.5 % to 19 % of
70 respiratory secretions from children with acute respiratory tract diseases using PCR [13].
71 Elucidation of the clinical relevance of hBoV has been difficult because of a high co-infection
72 rate of hBoV DNA positive samples with other respiratory viruses. Based on the combination
73 of a high hBoV load in nasopharyngeal samples ($> 10^4$ copies/ml) and concomitant hBoV
74 DNA detection in sera, a model has been proposed in which hBoV is associated with acute
75 respiratory tract diseases but persists in the respiratory tract for a longer period of time than
76 other respiratory viruses after primary infection [14]. Recent serological studies have
77 demonstrated evidence of primary hBoV infection in children with acute respiratory tract
78 diseases, strongly indicating that hBoV is indeed a respiratory pathogen [15, 16]. In
79 seroprevalence studies from Japan, the United States, China, and Germany the proportions of
80 hBoV IgG-positive samples increased with age during infancy until reaching levels of > 80 %
81 at the age of > 4 years [15, 17-19].

82 In order to expand the epidemiological knowledge about hBoV, WUPyV, and KIPyV, we
83 expressed capsid proteins in the baculovirus system and established an immunofluorescence
84 assay (IFA) for the detection of IgG antibodies against these three viruses. We used this
85 system to determine the prevalence of antibodies against hBoV, WUPyV, and KIPyV in
86 healthy adults.

87 **Methods**

88 **Blood donor samples**

89 The specimens tested for WUPyV, KIPyV, and hBoV serology consisted of 100 consecutive
90 plasma samples of healthy blood donors received in 2006 from the Institute of Transfusion
91 Medicine and Hemotherapy at the University Clinic of Würzburg. The samples were screened
92 routinely for infectious diseases. Remaining material was stored at -20°C and was tested in an
93 anonymised fashion. Informed consent of the blood donors was obtained.

94 **Protein expression**

95 The VP2 gene of hBoV was amplified from a nasopharyngeal aspirate using the primers
96 BoV3446s and BoV5113a and Pfu Polymerase (Fermentas, St. Leon Rot, Germany) resulting
97 in a 1667 bp PCR product (Table 1). Similarly, the VP1 genes of WUPyV and KIPyV were
98 amplified from nasopharyngeal aspirates with the primer pairs WU1673s/WU2782a and
99 KI1501s/KI2727a resulting in amplicons of 1109 bp and 1226 bp, respectively (Table 1).
100 Sequences were submitted to GenBank with the accession numbers FJ560720 (hBoV),
101 EU711057 (WUPyV), and FJ647575 (KIPyV). For production of the recombinant
102 baculoviruses BacWUVP1, BacKIVP1, and BacBOVP2 the LR recombination system
103 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used according to the recommendations of the
104 manufacturer. Briefly, the amplicons were inserted by TOPO cloning into the pENTR vector
105 (Invitrogen) and subsequently transformed in chemically competent *E.coli* TOP10 cells
106 (Invitrogen). The resulting plasmids pBOVP2, pWUVP1, and pKIVP1 were extracted from
107 overnight culture with the QIAprepSpin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and
108 sequenced by standard techniques to confirm orientation and sequence identity of the plasmid
109 insert. The plasmid inserts were then transferred into baculoviral DNA by homologous
110 recombination based on Gateway technology and the BaculoDirect system (Invitrogen). The
111 resulting recombinant baculovirus DNA was directly transfected to adherent Sf9 cells in one
112 well of a six-well-plate using celfectin[®] reagent (Invitrogen). The cells were kept in TC-100
113 growth medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10 % fetal calf serum, 100
114 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B, and 100 µM ganciclovir

115 as selective reagent. After five days, the cell culture supernatant was collected and used to
116 infect fresh Sf9 cells. This procedure was repeated twice, resulting in the supernatant of
117 passage 4 (P4), which was finally collected and stored at 4°C for further use.

118 Protein expression was confirmed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel
119 electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting. To this end, Sf9 cells at approximately
120 80 % confluence were inoculated with recombinant virus of P4. The cells were observed daily
121 until at least 80 % of the cells displayed a cytopathic effect, which typically happened after
122 seven days. Subsequently, the cell culture supernatant was collected and centrifuged with
123 3400 g at 4°C for 5 min to remove cells and large debris. The samples were separated by 10
124 % SDS-PAGE and blotted on a nitrocellulose membrane by standard procedures. After
125 blocking, immunodetection was performed with HRP-conjugated mouse-anti-V5-antibody
126 (Invitrogen) at a concentration of 188 ng/ml. Bands were visualised by SuperSignal West Pico
127 chemiluminescence substrate (Pierce, Rockford, USA). Uninfected Sf9 cells were used as
128 negative control.

129 **Immunofluorescence assay**

130 Sf9 cells were inoculated with recombinant baculoviruses and observed daily until
131 approximately 80 % of the cells displayed a cytopathic effect. The cells were harvested and
132 centrifuged for 5 min at 1000 g. The supernatant was discarded and the cell pellet was washed
133 three times in phosphate buffered saline (PBS). The Sf9 cells were spotted on glass slides, air
134 dried, fixed with cold acetone and stored at -20°C until use. Slides with uninfected Sf9 cells
135 were prepared in the same manner and were used for control staining to detect anticellular
136 antibodies. One spot each with Sf9 cells expressing WUPyV VP1, KIPyV VP1, or hBoV VP2
137 and one spot with uninfected Sf9 cells were incubated with a 1:10 dilution of each plasma
138 sample for 2 h at 37°C. Subsequently, the slides were washed twice for 5 min with PBS
139 containing 0.1 % Tween 20 followed by a short rinse in PBS without Tween 20. Next, the
140 slides were incubated with a 1:40 dilution of fluoresceine-conjugated goat-anti-human-IgG
141 (Invitrogen) and a 1:80 dilution of evans blue (Mast Diagnostik, Reinfeld, Germany) for 1 h
142 at 37°C. After another washing step as described above, coverslips were mounted for
143 immunofluorescence microscopy. The slides were independently read by two experienced
144 investigators. Plasma samples, which exhibited a vesicular fluorescence adjacent to the
145 membrane of Sf9 cells, were recorded as antibody positive, if no staining of the control cells
146 was detected.

147 **Absorption test**

148 For the absorption test, three plasma samples were selected that were positive for antibodies
149 against WUPyV, KIPyV, and hBoV. Sf9 cells infected with each of the recombinant

150 baculoviruses (BacWUVP1, BacKIVP1, BacBoVP2) were harvested from small flasks and
151 resuspended in 500 µl PBS. The suspensions were sonicated for 10 s on ice with a sonicator
152 (Branson Sonifier 250). Each of the three plasma samples was diluted 1:5 in each of the cell
153 lysates. After a 6 h of incubation on ice, the samples were centrifuged at 1400 g for 5 min and
154 the supernatants were diluted in PBS to a final sample concentration of 1:10. Twofold dilution
155 series ranging from 1:10 to 1:1280 of the absorbed and unabsorbed plasma samples were
156 tested in parallel by IFA as described above.

157 **Statistical analysis**

158 Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism version 3.0c for Mac (GraphPad
159 Software, San Diego, USA) and SPSS version 16 for windows (SPSS, Chicago, USA).

160 **Results**

161 Capsid proteins of WUPyV, KIPyV, and hBoV were expressed by infection of Sf9 cells with
162 the recombinant baculoviruses BacWUVP1, BacKIVP1, and BacBOVP2. As antibodies
163 against these proteins are not yet available, the correct size of the expressed proteins was
164 confirmed by SDS-PAGE and immunoblotting using an anti-V5 antibody. The V5-epitope is
165 located upstream of the inserted gene in the baculovirus DNA. A band of the expected size
166 (~46 kDa for WUPyV and KIPyV VP1; ~66 kDa for hBoV VP2) was observed for all
167 recombinant baculoviruses, whereas no band was observed in the uninfected control (Figure
168 1).

169 In order to determine the frequency of past exposure with WUPyV, KIPyV, and hBoV in
170 healthy adults, 100 blood donor plasma samples were tested for the presence of IgG against
171 WUPyV VP1, KIPyV VP1, and hBoV VP2 using an IFA based on Sf9 cells infected with the
172 recombinant baculoviruses (Figure 2). The median age of the blood donors was 31.5 years
173 (range 20.4 – 66.3 years) and 52 % were male. In order to confirm the specificity of positive
174 IFA results, three plasma samples were further studied in an absorption assay. Antibody titers
175 were determined before and after absorption with lysates of Sf9 cells infected with
176 recombinant baculoviruses. A significant titer decrease was only observed after absorption
177 with the matching Sf9 cell lysate (Table 2). There was no indication of antibody cross-
178 reaction between Sf9 cells infected with BacWUVP1, BacKIVP1, and BacBOVP2.

179 Of all plasma samples, 89 % were positive for anti-WUPyV VP1 IgG, 67 % were positive for
180 anti-KIPyV VP1 IgG, and 76 % were positive for anti-hBoV VP2 IgG. Neither the median
181 age nor the gender distribution of the antibody positive samples were significantly different
182 from the total population for any of the three viruses tested (Mann-Whitney test and Fisher's

183 exact test, respectively; Table 3). For WUPyV and hBoV, there were no significant
184 differences of the seropositivity rates with respect to age groups. For KIPyV, the
185 seropositivity rate increased significantly from 58,7 % in the age group 20 – 30 years to 100%
186 in the age group > 50 years ($p=0.026$; chi-square test for trend; Figure 3).
187 Table 4 shows the number of samples grouped by individual results for WUPyV, KIPyV, and
188 hBoV IgG. One percent of the samples were negative for all three viruses and 50 % were
189 positive for all three viruses. No obvious cross-reaction between the three antibody
190 specificities was apparent.

191 **Discussion**

192 Using IFA based on insect cells expressing capsid proteins of WUPyV, KIPyV, and hBoV,
193 we studied the seroprevalence of these viruses in plasma samples of healthy adults. We found
194 high rates of positive IgG antibodies against all three viruses: 89 % for WUPyV, 67 % for
195 KIPyV, and 76 % for hBoV. Our data on seroprevalence for WUPyV and KIPyV are
196 somewhat higher than reported in a recent study from the United States, which found
197 seroprevalences of 54.1 % to 55.3 % for KIPyV and 67.4 % to 70.9 % for WUPyV in the age
198 groups from 21 to 70 years of North American blood donors [12]. In contrast to our findings,
199 a rising prevalence for KIPyV IgG in adults was not observed. Further studies are necessary
200 in order to determine whether there may be regional differences in the KIPyV epidemiology.
201 Taken together, the data of Kean et al. and of our study indicate that WUPyV and KIPyV
202 have a widespread distribution similar to the well-known polyomaviruses BKV and JCV.
203 Also in agreement with BKV and JCV epidemiology, primary exposure seems to occur
204 mainly in childhood and youth. Primary BKV infection has been reported to occur mainly in
205 the first decade of life leading to a seroprevalence of 65 % to 90 % at the age of 10 (reviewed
206 in [20]). The JCV seroprevalence in adults has been found between 44 % and 97%. Whereas
207 some studies reported a time frame for primary JCV infection similar to BKV infections,
208 others showed a continuing rise of the JCV seroprevalence during adulthood (reviewed by
209 [20]).
210 VP1 is the major capsid protein of polyomaviruses. Several studies on BKV and JCV
211 serology have used this protein successfully in enzyme immunoassays, immunoblots, or IFA
212 [21-24]. Therefore, we decided to use expression of VP1 proteins to establish IFAs for the
213 detection of WUPyV and KIPyV IgG. In the study by Kean et al., WUPyV and KIPyV
214 antibodies were determined by an enzyme immunoassay based on bacterially expressed VP1
215 capsomeres [12].

216 Validation of these IFA was limited by the lack of defined serum samples that could be used
217 to determine assay sensitivity and specificity. By testing selected study samples before and
218 after absorption with lysates of Sf9 cells that were infected with different recombinant
219 baculoviruses, we were able to exclude general cross reactivity between WUPyV and KIPyV.
220 Furthermore, we excluded anticellular reactivity of the plasma samples by performing an IFA
221 with uninfected Sf9 cells. Therefore, we are confident that our serological data are reliable.
222 Comparison of different serological methods and antigen preparations as well as sample
223 exchange will be useful to further validate the assays for WUPyV and KIPyV antibody
224 determination.

225 As to hBoV, the adult seroprevalence of 76 % in our study is slightly lower than in previous
226 studies from Japan, the United States, and Germany, which reported hBoV IgG antibody
227 prevalence of 94 %, 86 %, and 94 %, respectively [15, 17, 19]. However, the total number of
228 adult samples tested was small in two of these reports (34, 7, and 299, respectively). Whether
229 methodological issues may account for the observed differences should be addressed by
230 future studies.

231 We chose the hBoV VP2 gene for recombinant expression on the basis of current knowledge
232 about immunodominant antigens of parvovirus B19, which belongs to the same virus family
233 as hBoV. Previous studies on hBoV serology have used IFA based on VP1-expressing insect
234 cells [15], enzyme immunoassay based on VP2 purified from insect cells [17, 18],
235 immunoblot based on VP2 and the unique region of VP1 expressed in *E. coli* [16], and
236 enzyme immunoassay based on VP2 virus-like particles [19]. In the study of Kantola et al., a
237 higher immunoreactivity was demonstrated for hBoV VP2 than for the unique part of hBoV
238 VP1. Overall, the VP2 protein seems to be suitable for use in serological assays. However, a
239 comparison of the VP1 and VP2 protein has not yet been performed.

240 Limitations of the hBoV IFA validation are similar to the limitations described for the
241 WUPyV and KIPyV IFA. Results of a control IFA using uninfected Sf9 cells and of pre-
242 absorption experiments suggest that the positive hBoV IgG results are specific.

243 In this seroepidemiological study, only IgG antibodies were determined. Evidently, the IFAs
244 used in this study may easily be modified for the determination of IgM antibodies. IgG and
245 IgM serology applied on appropriate sample collections will allow to determine the point in
246 time of primary infection. Information on this issue is important in order to establish the
247 clinical relevance of WUPyV, KIPyV, and hBoV.

248 **Conclusions**

249 Antibodies against hBoV, WUPyV, and KIPyV were found at high rates in sera of healthy
250 adults. These results indicate that primary infections with these viruses occur during
251 childhood. For KIPyV, the seropositivity appears to increase further during adulthood.

252

253

253 **Competing interests**

254 The authors declare that they have no competing interests.

255 **Authors' contributions**

256 BW and FN designed and coordinated the study. FN and ME produced the recombinant
257 baculoviruses. FN, CP, BS, ME, and JS established and performed the IFA testing. AO
258 collected the blood donor samples. All authors participated in the data analysis. BW and FN
259 drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

260 **Acknowledgements**

261 We thank the technicians of the viral diagnostic lab for skillful and dedicated assistance.

262

263

263 **References**

264

- 265 1. Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus AD: **Newer respiratory virus**
266 **infections: human metapneumovirus, avian influenza virus, and human**
267 **coronaviruses.** *Curr Opin Infect Dis* 2005, **18**(2):141-146.
- 268 2. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B:
269 **Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract**
270 **samples.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(36):12891-12896.
- 271 3. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA,
272 Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B: **Identification of a third human**
273 **polyomavirus.** *J Virol* 2007, **81**(8):4130-4136.
- 274 4. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC,
275 Storch GA, Sloots TP, Wang D: **Identification of a novel polyomavirus from**
276 **patients with acute respiratory tract infections.** *PLoS pathogens* 2007, **3**(5):e64.
- 277 5. Abed Y, Wang D, Boivin G: **WU polyomavirus in children, Canada.** *Emerg Infect*
278 *Dis* 2007, **13**(12):1939-1941.
- 279 6. Abedi Kiasari B, Vallely PJ, Corless CE, Al-Hammadi M, Klapper PE: **Age-related**
280 **pattern of KI and WU polyomavirus infection.** *J Clin Virol* 2008, **43**(1):123-125.
- 281 7. Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Jacob K, Bletchly C, Wang D, Nissen MD,
282 Sloots TP: **Presence of the newly discovered human polyomaviruses KI and WU**
283 **in Australian patients with acute respiratory tract infection.** *J Clin Virol* 2008,
284 **41**(2):63-68.
- 285 8. Han TH, Chung JY, Koo JW, Kim SW, Hwang ES: **WU polyomavirus in children**
286 **with acute lower respiratory tract infections, South Korea.** *Emerg Infect Dis* 2007,
287 **13**(11):1766-1768.
- 288 9. Le BM, Demertzis LM, Wu G, Tibbets RJ, Buller R, Arens MQ, Gaynor AM, Storch
289 GA, Wang D: **Clinical and epidemiologic characterization of WU polyomavirus**
290 **infection, St. Louis, Missouri.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**(12):1936-1938.
- 291 10. Neske F, Blessing K, Ullrich F, Pröttel A, Kreth HW, Weissbrich B: **WU**
292 **Polyomavirus Infection in Children, Germany.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(4):680-
293 681.

- 294 11. Norja P, Ubbilos I, Templeton K, Simmonds P: **No evidence for an association**
295 **between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease.** *J*
296 *Clin Virol* 2007, **40**(4):307-311.
- 297 12. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL: **Seroepidemiology of human**
298 **polyomaviruses.** *PLoS pathogens* 2009, **5**(3):e1000363.
- 299 13. Allander T: **Human bocavirus.** *J Clin Virol* 2008, **41**(1):29-33.
- 300 14. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, Vuorinen T,
301 Waris M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A *et al*: **Human bocavirus and acute**
302 **wheezing in children.** *Clin Infect Dis* 2007, **44**(7):904-910.
- 303 15. Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, Teramoto S, Shirkoohi R, Ma X, Ebihara T, Ishiko H,
304 Ariga T: **Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan.** *J*
305 *Clin Microbiol* 2007, **45**(10):3218-3223.
- 306 16. Kantola K, Hedman L, Allander T, Jartti T, Lehtinen P, Ruuskanen O, Hedman K,
307 Soderlund-Venermo M: **Serodiagnosis of human bocavirus infection.** *Clin Infect*
308 *Dis* 2008, **46**(4):540-546.
- 309 17. Kahn JS, Kesebir D, Cotmore SF, D'Abramo A, Jr., Cosby C, Weibel C, Tattersall P:
310 **Seroepidemiology of human bocavirus defined using recombinant virus-like**
311 **particles.** *J Infect Dis* 2008, **198**(1):41-50.
- 312 18. Lin F, Guan W, Cheng F, Yang N, Pintel D, Qiu J: **ELISAs using human bocavirus**
313 **VP2 virus-like particles for detection of antibodies against HBoV.** *J Virol Methods*
314 2008, **149**(1):110-117.
- 315 19. Lindner J, Karalar L, Zehentmeier S, Plentz A, Pfister H, Struff W, Kertai M, Segerer
316 H, Modrow S: **Humoral immune response against human bocavirus VP2 virus-**
317 **like particles.** *Viral immunology* 2008, **21**(4):443-449.
- 318 20. Knowles WA: **Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK**
319 **virus (BKV) and JC virus (JCV).** *Advances in experimental medicine and biology*
320 2006, **577**:19-45.
- 321 21. Hamilton RS, Gravell M, Major EO: **Comparison of antibody titers determined by**
322 **hemagglutination inhibition and enzyme immunoassay for JC virus and BK**
323 **virus.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**(1):105-109.
- 324 22. Viscidi RP, Rollison DE, Viscidi E, Clayman B, Rubalcaba E, Daniel R, Major EO,
325 Shah KV: **Serological cross-reactivities between antibodies to simian virus 40, BK**
326 **virus, and JC virus assessed by virus-like-particle-based enzyme immunoassays.**
327 *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2003, **10**(2):278-285.

- 328 23. Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J: **Seroepidemiology of the**
329 **human polyomaviruses.** *J Gen Virol* 2003, **84**(Pt 6):1499-1504.
- 330 24. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH:
331 **Prevalence of Polyomavirus BK and JC Infection and Replication in 400 Healthy**
332 **Blood Donors.** *J Infect Dis* 2009.
- 333
- 334
- 335

335 **Figures**

336 **Figure 1 - Confirmation of expression of recombinant proteins**

337 Sf9 cells were infected with recombinant baculoviruses BacWUVP1, BacKIVP1, and
338 BacBoVP2. Uninfected Sf9 cells served as negative control. After SDS-PAGE and
339 immunoblot, proteins were visualised by staining with anti-V5 antibody. The expected protein
340 sizes are ~46 kDa (WUPyV and KIPyV VP1) and ~66 kDa (hBoV VP2).

341

342 **Figure 2 – IFA for the detection of IgG antibodies against WUPyV VP1, KIPyV VP1, and** 343 **hBoV VP2**

344 Sf9 cells infected with recombinant baculoviruses were incubated with plasma samples of
345 healthy blood donors. Bound antibodies were visualised with FITC-labelled anti-human IgG.
346 Representative examples of positive and negative plasma samples are shown for each of the
347 three antigens.

348

349 **Figure 3 – Age distribution of virus-specific IgG antibodies**

350 The seroprevalence for WUPyV and hBoV did not differ significantly between age groups
351 ($p=0.855$ and $p=0.175$, respectively). For KIPyV, a significant rise of seroprevalence rates
352 was observed with increasing age ($p=0.026$).

353

354

355 **Tables**

356

357 **Table 1 – Primers used for the Amplification of WUPyV VP1, KIPyV VP1, and hBoV VP2**

358

Primer	Sequence (5' – 3') ^a	Gene	Position ^b	Virus
WU1673s-TOPO	<u>CACCGCCTGCACAGCAAAGC</u>	VP1	1673-1688	WUPyV
WU2782a	ACATTATCCTTGTGTGTTTAGTATTGGGCC	VP1	2782-2753	WUPyV
KI1501s-TOPO	<u>CACCAGCTGCACCCCGTGT</u>	VP1	1501-1519	KIPyV
KI2727a	CCTTACTGAGTTTGCCACTATGCA	VP1	2727-2704	KIPyV
BoV3446s-TOPO	<u>CACCTCTGACACTGACATTCAAGAC</u>	VP2	3446-3466	hBoV
BoV5113a	AGGAGGAACTTGTAAGCAGAAAGC	VP2	5113-5091	hBoV

359

360 ^a Nucleotides added for directional cloning are underlined.

361 ^b Positions according to GenBank accession number EU711057 (WUPyV), NC_009238 (KIPyV), and DQ000496 (hBoV).

362

363 **Table 2 – Antibody titers before and after absorption with lysates of virus capsid**
 364 **protein expressing Sf9 cells**

365

366

Plasma sample and antibody	Titers prior to absorption	Antibody titers after absorption with lysates of Sf9 cells expressing ^a		
		WUPyV VP1	KIPyV VP1	hBoV VP2
Patient 1				
Anti-WUPyV	1:80	1:20	1:80	1:40
Anti-KIPyV	1:80	1:80	1:20	1:80
Anti-hBoV	1:160	1:160	1:160	1:10
Patient 2				
Anti-WUPyV	1:40	1:10	1:20	1:20
Anti-KIPyV	1:320	1:320	1:40	1:320
Anti-hBoV	1:320	1:640	1:640	1:40
Patient 3				
Anti-WUPyV	1:160	1:40	1:160	1:80
Anti-KIPyV	1:160	1:80	1:20	1:160
Anti-hBoV	1:320	1:320	1:320	1:10

367

368 ^a Antibody titers obtained with homologous Sf9 cell lysates are shown in bold.

369

370

370 **Table 3 – IgG seroprevalence for hBoV VP2, WUPyV VP1, and KIPyV VP1 in 100**
 371 **healthy blood donors**

372

group	n	Median age in years	Male
All samples	100	31.5	52 %
WUPyV IgG positive	89	31.2	49 %
KIPyV IgG positive	67	32.1	46 %
hBoV IgG positive	76	31.8	51 %

373

374

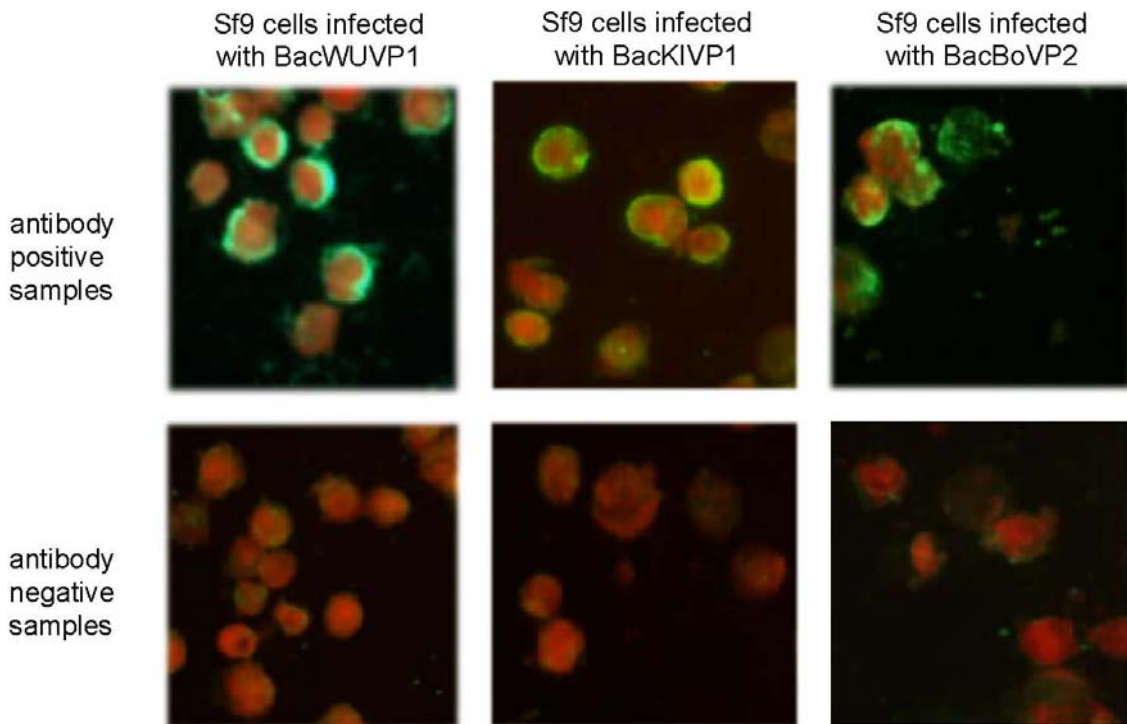
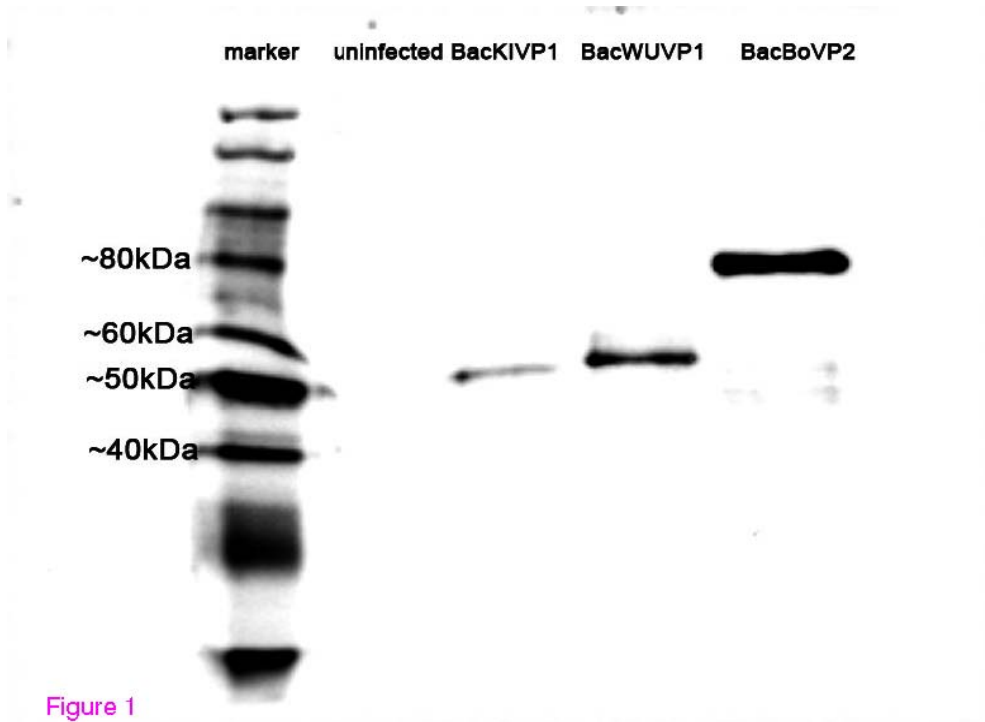
374 **Table 4 – Results of WUPyV, KIPyV, and hBoV IgG IFA of individual samples**

375

Results of WUPyV and KIPyV IgG IFA	Result of hBoV IgG IFA (n)		Total (n)
	Negative	Positive	
WUPyV and KIPyV negative	1	3	4
WUPyV negative, KIPyV positive	1	6	7
WUPyV positive, KIPyV negative	12	17	29
WUPyV and KIPyV positive	10	50	60
Total	24	76	100

376

377



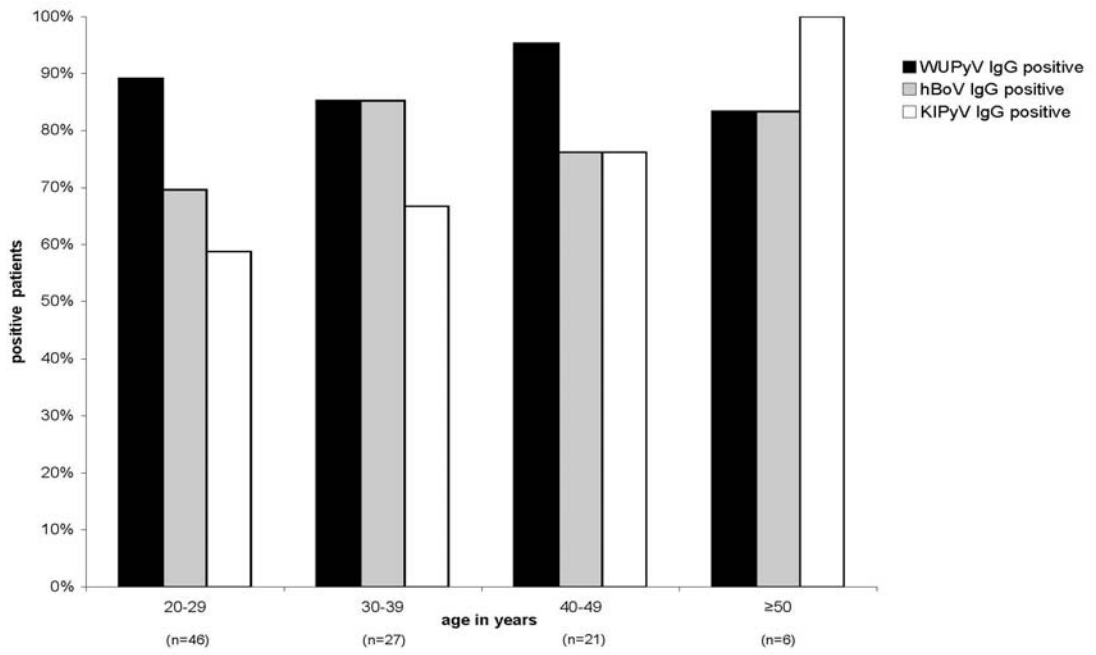


Figure 3

Arbeiten zum humanen Polyomavirus WU

Untersuchung der WUPyV-Infektionshäufigkeit durch qualitative PCR (Publikation 3)

Zur Untersuchung der Häufigkeit von Infektionen mit WUPyV bei Kindern mit ARE wurden 1277 NRS mittels WUPyV-spezifischer qualitativer PCR getestet. Nach erfolgreicher Amplifikation eines WUPyV-Stammes wurde das Amplikon sequenziert und mit der WUPyV-Sequenz der Erstbeschreiber verglichen. Analog zur Vorgehensweise bei der Herstellung des Plasmides pBoV bei hBoV wurde dieses Amplikon zur Herstellung eines Kontrollplasmides (pWUV) verwendet. Im Anschluss wurde durch Probitanalyse eine NWG von 8,8 Kopien/Reaktion (95 % Konfidenzintervall 4,1 – 21,6 Kopien/Reaktion) für die WUPyV-PCR ermittelt. In folgenden PCR-Läufen zur Ermittlung der Häufigkeit von Infektionen mit WUPyV wurde pWUV mit den drei Verdünnungstufen 5×10^2 – 5 Kopien/Reaktion als Amplifikationskontrolle verwendet.

Von den 1277 untersuchten Proben konnte in 62 (4,9 %) WUPyV-DNA nachgewiesen werden. Das mediane Alter der WUPyV-infizierten Kinder unterschied sich mit 3,0 Jahren signifikant vom medianen Alter (1,6 Jahre) der Gesamtpopulation ($p=0,0006$; Mann-Whitney-Test). Ferner waren nur 3,2 % der WUPyV-infizierten Kinder >6 Jahre, in der Gesamtpopulation 15,7 %. Eine Untersuchung zur saisonalen Verteilung von WUPyV ergab, dass WUPyV-DNA über das ganze Jahr verteilt in NRS nachgewiesen werden konnte.

Bei 34 (54,8 %) der WUPyV-positiv getesteten Proben konnte ein zusätzlicher respiratorischer Erreger detektiert werden. Dabei traten Koinfektionen mit AdV ($n=10$) und Inf A ($n=10$) am häufigsten auf, gefolgt von hBoV ($n=9$) und RSV ($n=5$).

Von 57 der 62 WUPyV-positiven Patienten waren klinische Daten verfügbar, bei welchen ein breites Spektrum an Infekten der oberen und unteren Atemwege beobachtet wurde. Eine Assoziation zwischen einer WUPyV-Infektion und einem bestimmten Krankheitsbild war nicht erkennbar.

Quantitative WUPyV-real-time-PCR (Publikation 4)

Um WUPyV-Infektionen schneller detektieren zu können und um neue Erkenntnisse in Bezug auf die DNA-Menge bei WUPyV-Infektionen zu erhalten, wurde eine WUPyV-spezifische qrt-PCR etabliert. Zur Herstellung von Primern und Sonde wurden konservierte Bereiche des large T-Gens herangezogen, die zuvor durch Sequenzierung der durch die qualitative PCR gewonnenen Fragmente bestimmt worden waren. Ein NCBI-Blast ergab keine relevanten Sequenz-Homologien. Im Anschluss wurde die optimale Primer- und Sondenkonzentration

mit dem zuvor hergestellten Plasmid pWUV ermittelt. Die anschließende Validierung wurde analog zur der Validierung der qrt-PCR von hBoV durchgeführt. Dabei konnten eine Linearität von $5 \times 10^8 - 5$ Kopien/Reaktion und eine NWG von 7,1 Kopien/Reaktion (95 % Konfidenz-Intervall: 4,8 – 20,4 Kopien/Reaktion) nachgewiesen werden. Die Überprüfung der Amplifikationsverlässlichkeit ergab für den Bereich von $5 \times 10^5 - 5$ Kopien/Reaktion einen mittleren Variationskoeffizienten von 1,3 % innerhalb eines Laufes (Intraassay). Der Interassay-Variationskoeffizient für eine Laufkontrolle der Konzentration 5×10^5 Kopien/Reaktion betrug 15,1 % über alle durchgeführten Läufe.

Um unspezifische Amplifikation auszuschließen wurden Proben getestet, die Polyomavirus BK-, JC-, oder KI-DNA enthielten. Ferner wurden auch hBoV- und AdV-positive Proben getestet. Bei keiner der Kontrollproben kam es durch die WUPyV-qrt-PCR zu einer Amplifikation.

Nach erfolgreicher Validierung der qrt-PCR, wurden 1232 NRS von Kindern getestet, die an einer ARE litten und zuvor durch eine qualitative PCR auf WUPyV-DNA untersucht worden waren. Von 45 der 1277 zuvor getesteten Proben stand nicht mehr genügend Material zur Verfügung. Bei 64 (5,2 %) der Proben konnte mittels qrt-PCR WUPyV-DNA detektiert werden. Die mediane Viruslast betrug $9,5 \times 10^2$ Kopien/ml.

Bei 32 (50 %) der mittels qrt-PCR positiv getesteten Proben konnte zusätzlich eine Koinfektion mit einem anderen respiratorischen Virus festgestellt werden. Eine Analyse der WUPyV-DNA Menge in Bezug auf Koinfektionsstatus ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,64$; Mann-Whitney-Test) zwischen Einzel- und Mehrfachinfektionen. Es konnte ebenfalls keine Assoziation zwischen WUPyV-DNA-Menge und Krankheitsbildern (Bronchitis, Bronchiolitis, Fieberkrämpfe, IOA, obstruktive Bronchitis und Pneumonie) festgestellt werden ($p=0,96$; Kruskal-Wallis-Test).

Um weitere Einsicht in WUPyV-Infektionen zu erhalten wurden 14 Serum- und 14 Stuhlproben von Patienten, deren NRS zuvor positiv auf WUPyV-DNA getestet worden waren, mittels qrt-PCR auf WUPyV-DNA untersucht. Bei 3 (21,4 %) der Serum- und 2 (14,3 %) der Stuhlproben konnte WUPyV-DNA nachgewiesen werden. Der Median der WUPyV-Last in NRS von Patienten, in deren Serumprobe WUPyV-DNA nachgewiesen werden konnte, war dabei höher als bei Patienten, deren Serum negativ getestet worden war ($7,5 \times 10^9$ vs. $5,0 \times 10^2$ Kopien/ml; $p = 0,09$; Mann Whitney Test). Ein ähnliches Bild konnte auch im Falle von positiven Stuhlproben beobachtet werden (7×10^{10} vs. $9,4 \times 10^2$ Kopien/ml). Allerdings war die Anzahl der WUPyV-positiven Stuhlproben zu gering, um eine statistische Auswertung vornehmen zu können. Interessanterweise konnte bei dem Patienten

mit der höchsten WUPyV-Last im NRS ($3,4 \times 10^{10}$ Kopien/ml) des gesamten Kollektives sowohl im Serum als auch im Stuhl WUPyV-DNA nachgewiesen werden. Das einjährige Kind litt an einem Infekt der oberen Atemwege mit Fieberkrämpfen und es lag keine Koinfektion vor.

Phylogenetische Untersuchung von WUPyV (unpubliziert)

Zur Untersuchung der Phylogenie von WUPyV wurde zunächst die nicht-codierende Region des WUPyV-Genoms (Nukleotid 5173 - 573) von 52 WUPyV-positiven Patienten mit 2 überlappenden WUPyV spezifischen Primerpaaren (Anhang 1) amplifiziert, sequenziert und die Sequenzen mit MEGA 4.0 (Tamura, K. et al., 2007) analysiert. Bei dem resultierenden Stammbaum konnte eine hohe Nukleotid-Identität (99,4 %) und zwei Cluster (45 Isolate in Cluster 1 und 7 Isolate in Cluster 2) mit einem Bootstrapwert von 99 % ermittelt werden. Die Nukleotid-Identität zwischen den Clustern betrug 98,4 % und innerhalb der Cluster 99,8 % (Cluster 1) und 99,6 % (Cluster 2).

Um die Clusterbildung näher zu untersuchen, wurde das Genom von 5 WUPyV-Stämmen mit 12 WUPyV-spezifischen Primerpaaren (Anhang 2) amplifiziert. Die entstehenden, überlappenden Fragmente wurden mit dem BigDye Terminator Kit und dem ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) sequenziert und mit Hilfe von MEGA 4.0 (Tamura, K. et al., 2007) ausgewertet. Es wurden 3 WUPyV-Proben des Clusters 1 und 2 des Clusters 2 sequenziert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Proben eine hohe Menge an WUPyV-DNA enthielten und größtmögliche Divergenz in der nicht codierenden Region aufwiesen. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, wurden die Cluster durch die komplette Sequenzierung bestätigt. Dabei betrug die Nukleotid-Identität zwischen den Clustern 98,8 % und innerhalb der Cluster 99,9 % (Cluster 1) und 99,8 % (Cluster 2).

Die Genome der 5 Isolate wiesen 73 variable Positionen mit 52 % Transitionen auf. Eine Untersuchung der codierenden Bereiche ergab eine Identität von 99,3 % auf Nukleotid-Ebene und von 98,8 % auf AS-Ebene, was in einem hohen Anteil (60,3 %) an nicht-synonymen Mutationen begründet ist.

Die Clusterbildung konnte bei allen 5 Genen beobachtet werden, wobei die Nukleotid-Identität zwischen den Clustern von 98,2 % (VP1) bis 99,1 % (large T-Gen) und die AS-Identität von 96,4 % (VP3) bis 99,5 % (large T-Gen) reichte. Die Rate an nicht-synonymen Mutationen lag zwischen 25 % (large T-Antigen) und 77 % (VP3) und resultierte in 46 variablen Positionen. Dabei betrug der Anteil an Cluster-spezifischen Mutationen 76 % (n=35). Der auffälligste Unterschied zwischen den Clustern war eine Mutation des VP2/VP3 Stopcodons (Nukleotide 1819-1821) in Cluster 2. Durch diese

Mutation wurde das TAA (Stopcodon) zu TCA (Serin) verändert. Nach diesem Codon folgt in beiden Clustern AGT (Serin) und ein alternatives Stopcodon. Die Kapsidproteine VP2 und VP3 des Clusters 2 sind folglich 2 Aminosäuren (2xSerin) länger als in Cluster 1. Das alternative Stopcodon war in allen untersuchten Sequenzen konserviert. Ein Zusammenhang von WUPyV-Last oder Krankheitsbild mit den phylogenetischen Clustern ergab sich nicht.

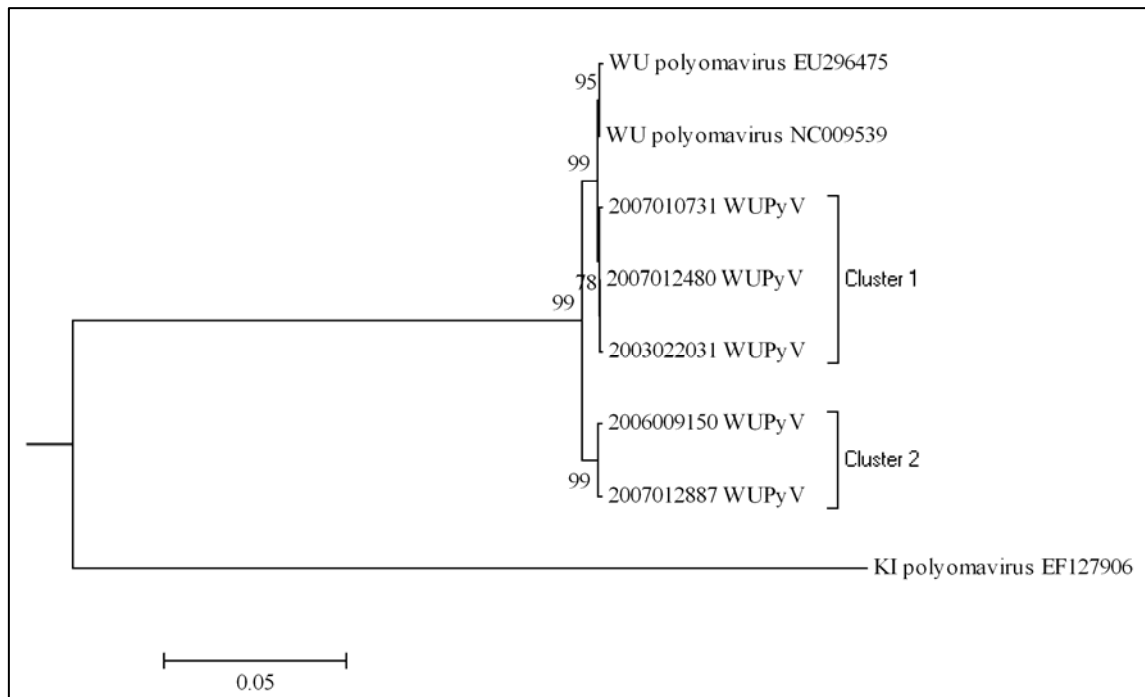


Abbildung 3: Phylogenetische Analyse von 5 WUPyV-Genomen (interior branch test) im Vergleich mit einer chinesischen (EU296475) und australischen (NC 009539) WUPyV-Sequenz sowie einer KIPyV-Sequenz (EF127906). Bootstrap Werte sind an den Knotenpunkten aufgeführt.

WUPyV-Seroprävalenz bei gesunden Erwachsenen (Publikation 6)

Zur Untersuchung der Seroprävalenz von WUPyV bei gesunden Erwachsenen wurde ein IFT mit SF9-Insektzellen etabliert. Die Insektzellen wurden mit Baculoviren infiziert, die das WUPyV-Kapsidgen VP1 enthielten. Die Herstellung der rekombinanten Baculoviren erfolgte analog zu der Herstellung von BacBOVP2 mittels Gateway-Technologie (Invitrogen). Die entstandene Baculovirus-DNA BacWUVP1 wurde in SF9-Zellen transfiziert und nach 4 Virus-Passagen die Expression von VP1 in den SF9-Zellen durch einen Western-blot mittels Anti-V5-Antikörpern überprüft. Die detektierte Bande stimmte mit der errechneten Größe von WUPyV-VP1 (~46 kDa) überein. Im IFT wurden zunächst Seren von Kindern, deren NRS zuvor positiv auf WUPyV-DNA getestet worden war, auf WUPyV-IgG-Antikörper untersucht. Dabei reagierten 8 von 10 Proben positiv. Als negative Kontrolle dienten uninfizierte SF9-Zellen. Wie schon für den hBoV-IFT beschrieben, wurde beim WUPyV-IFT ebenfalls ein Absorptionstest durchgeführt. Auch in diesem Fall fiel der Antikörpertiter gegen WUPyV-VP1 ab, wenn das Plasma zuvor mit BacWUVP1-infizierten Zellen absorbiert

wurde, und blieb konstant, wenn das Serum erst mit BacKIVP1- oder BacBoVP2-infizierten Zellen absorbiert worden war.

Nach Etablierung des IFT wurden 100 Plasmen gesunder Erwachsener auf Anti-WUPyV-VP1-IgG untersucht. Dabei konnte in 88 Proben IgG-Antikörper gegen WUPyV-VP1 nachgewiesen werden. Das mediane Alter der WUPyV-IgG positiven Spender (31,2 Jahre) unterschied sich nicht signifikant ($p=0,7184$; Mann-Whitney-Test) vom Alter der Gesamtstudienpopulation (31,5 Jahre). Das Geschlechterverhältnis war bei WUPyV-IgG-positiven Spender (50 % männlich) ähnlich wie in der Gesamtpopulation (52 % männlich). Ferner konnte kein signifikanter Unterschied bei WUPyV-VP1-IgG-positiven Spendern in Abhängigkeit von der Altersgruppe festgestellt werden ($p=0,8732$; χ^2 -Test).

Veröffentlichte Arbeiten zum humanen Polyomavirus WU

Publikation 3:

Florian Neske, Kerstin Blessing, Franziska Ullrich, Anika Pröttel, Hans Wolfgang Kreth, and Benedikt Weissbrich (2008). “WU Polyomavirus Infection in Children, Germany”. **Emerging Infectious Disease** 4: 680-681

Publikation 4:

Florian Neske, Kerstin Blessing, Anika Pröttel, Franziska Ullrich, Hans Wolfgang Kreth, Benedikt Weissbrich (2009). “Detection of WU polyomavirus DNA in nasopharyngeal samples, serum and stool by real-time”. **Journal of Clinical Virology** 44: 115-118

Publikation 6 (siehe Seite 34 -51)

Florian Neske, Christiane Prifert, Jörg Schubert, Barabara Scheiner, Moritz Ewald, Andreas Opitz, Benedikt Weissbrich (submitted). “High prevalence of antibodies against polyomavirus WU, polyomavirus KI, and human bocavirus in German blood donors”. **BMC Infectious Disease**; submitted

WU Polyomavirus Infection in Children, Germany

To the Editor: The human polyomaviruses JC and BK are known to cause persisting infections, which are usually asymptomatic in immunocompetent patients but may lead to severe disease in those who are immunosuppressed (1). Recently, 2 novel viruses of the family *Polyomaviridae* were detected in respiratory samples and named KI (2) and WU polyomavirus (WUPyV) (3). To investigate the frequency of WUPyV infections in Germany, we examined nasopharyngeal samples from hospitalized children with acute respiratory diseases for WUPyV DNA.

The samples tested for WUPyV infection consisted of stored nasopharyngeal aspirates (NPA) of hospitalized children at the Children's Hospital, University of Würzburg. The samples had been received for routine screening of respiratory viruses from January 2002 through September 2005 and from January 2007 through July 2007. All samples were routinely tested for antigens of adenoviruses, influenza viruses A (fluA) and B, parainfluenza viruses 1–3, and respiratory syncytial virus (RSV) by indirect immunofluorescence assays (Chemicon, Temecula, CA, USA). Remaining NPA material was stored at -20°C . DNA was extracted from the samples by using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Germany) and stored at -70°C for further testing. All samples were also tested for human bocavirus (hBoV) DNA by PCR (4).

WUPyV PCR was performed by using the primer pair AG0048 and AG0049 described by Gaynor et al. (3). PCRs were conducted in a 50- μL volume consisting of 5- μL extracted DNA, 1 \times Qiagen HotStar buffer (QIAGEN, Hilden, Germany), dNTPs at final concentrations of 200 $\mu\text{mol/L}$ each, 200 pmol of each primer, and 1.5

U of HotStarTaq polymerase. The cycling conditions were 50 cycles (94°C for 30 s, 53°C for 40 s, and 72°C for 1 min) after a preheating step of 10 min at 95°C . All PCR products of positive reactions by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining were sequenced completely in both directions for confirmation of sequence specificity. One negative control was extracted and amplified for every 5 NPA samples. A plasmid containing the cloned PCR product was used as positive control. The sensitivity of the WUPyV PCR was 8.8 copies per reaction as determined by probit analysis, which corresponds to 440 copies per mL of sample. The study was approved by the ethics committee of the medical faculty at the University of Würzburg.

During the study period, 1,326 NPA of hospitalized children with febrile respiratory tract diseases were received for viral diagnostic evaluation. The median age of the patients was 1.6 years (mean age 3.2 years; range 7 days–22 years), and 58.4% were boys. DNA of 1,277 NPA from 1,085 children was available for retrospective testing. Of these, 62 (4.9%) samples

from 59 children were positive by WUPyV PCR and subsequent sequencing. The median age of the WUPyV-positive children was 3.0 years (mean 2.9 years; range 4 months–6.3 years) (Figure), and 57% were boys. Of the children with WUPyV-positive NPA, 3.2% were >6 years of age, although children in this age group constituted 15.7% of the total population. Infections with WUPyV were found year round, but most occurred in the winter months. Yearly frequencies (July–June) of WUPyV-positive results varied from 3.2% to 8.5% during the observation period. These variations were not statistically significant. In 34 (54.8%) of the WUPyV-positive samples, co-infections with other respiratory viruses were detected, most frequently with adenovirus ($n = 10$) and fluA ($n = 10$), followed by hBoV ($n = 9$) and RSV ($n = 5$). The co-infections included 4 triple infections (2 fluA/hBoV/WUPyV, 1 adenovirus/hBoV/WUPyV, and 1 RSV/hBoV/WUPyV). Clinical data were available for 57 of the 62 WUPyV-positive NPA. A broad spectrum of both upper (45.6%) and lower (54.4%) respiratory tract diseases was observed. The latter included

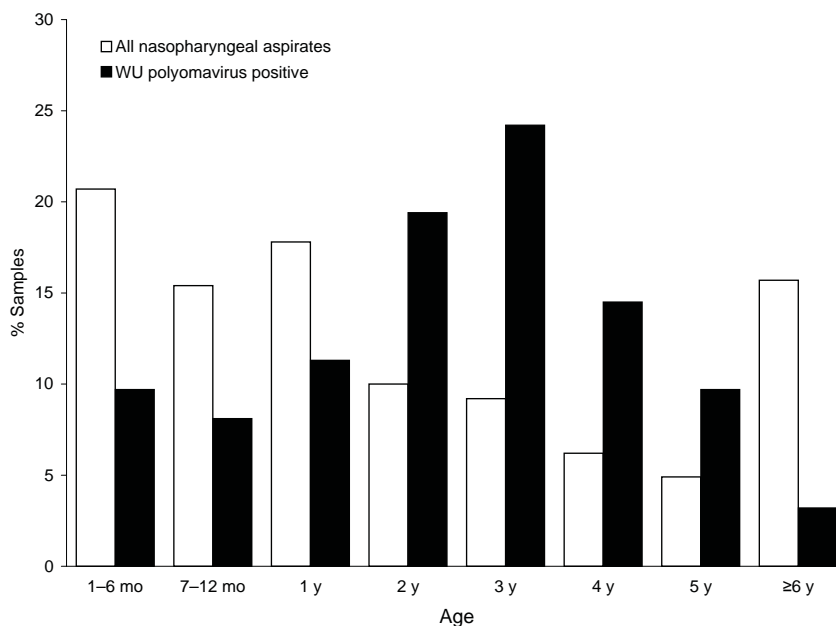


Figure. Age distribution of children with WU polyomavirus DNA-positive nasopharyngeal aspirates compared with the age distribution of the total study population.

bronchitis, wheezing bronchitis, and pneumonia.

In the context of the previous reports of WUPyV detection in Australia and North America (3), our data suggest a worldwide distribution of WUPyV. Most of the WUPyV-positive children were <4 years of age, and WUPyV DNA was rarely found in children >6 years of age. This age distribution is compatible with WUPyV infection occurring in day nurseries and kindergartens. In keeping with the findings of Gaynor et al. (3), we observed a high number of co-infections. The true number of co-infections in our study is probably higher than the reported 53.2% because we did not test for several respiratory pathogens, such as coronaviruses, rhinoviruses, enteroviruses, and the human metapneumovirus. Hypotheses to account for the detection of WUPyV in respiratory samples include the following: WUPyV is a persisting asymptomatic virus that is detected by chance, WUPyV is a persisting virus that is reactivated by an inflammatory process, or WUPyV is a predisposing or aggravating factor of respiratory diseases. Further studies are necessary to determine whether WUPyV is a human pathogen.

Acknowledgments

We thank the team of the viral diagnostic laboratory for skillful and dedicated assistance.

Florian Neske,* Kerstin Blessing,† Franziska Ullrich,† Anika Pröttel,*† Hans Wolfgang Kreth,† and Benedikt Weissbrich*

*University of Würzburg, Würzburg, Germany; and †University Hospital of Würzburg, Würzburg, Germany

References

1. Ahsan N, Shah KV. Polyomaviruses and human diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2006;577:1–18.

2. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol.* 2007;81:4130–6.
3. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* 2007;3:e64.
4. Weissbrich B, Neske F, Schubert J, Tollmann F, Blath K, Blessing K, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis.* 2006;6:109.

Address for correspondence: Benedikt Weissbrich, Institute of Virology and Immunobiology, University of Würzburg, Versbacher Str 7, 97078 Würzburg, Germany; email: weissbrich@vim.uni-wuerzburg.de

Hepatitis E, Central African Republic

To the Editor: Outbreaks of hepatitis E virus (HEV) have been documented in many geographic regions and nonindustrialized countries (1–3); they have been primarily associated with fecal contamination of drinking water (4). In the Central African Republic (CAR), economic indicators (CAR ranks 172/177 countries on the 2006 United Nations Development Program Human Development Index), political instability, geographic situation, a deteriorating health network, and a very poor epidemiologic surveillance system all contribute to the country's epidemic susceptibility.

In July 2002, Ministry of Health (MoH) and Médecins sans Frontières (MSF) teams working in the Begoua Commune Health Center, north of CAR's capital Bangui, reported an increased number of patients from the Yembi I neighborhood who were showing signs of jaundice and extreme fatigue.

Patients suspected of having hepatitis E were defined as those with clinical jaundice (yellow discoloration of the sclera) and symptoms of malaise, anorexia, abdominal pain, arthralgia, and fever. Confirmed cases were those in which patients' serum samples were positive for HEV immunoglobulin (Ig) M or IgG.

Initially, 16 pairs of serum and stool samples were collected from jaundiced patients. Fecal samples were stored at –20°C and sent to the National Reference Center of Enterically Transmitted Hepatitis, Hospital Val de Grâce (Paris, France) for HEV marker testing; serum samples were tested at the Bangui Pasteur Institute for yellow fever (YF) IgM by MAC-ELISA.

The HEV epidemic was confirmed by the detection of HEV markers: HEV IgG (Enzyme Immuno Assay, HEV, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), HEV IgM (Abbott Laboratories), amplification of RNA (5), and the absence of YF IgM. The HEV genome was detected in 4 of the fecal samples. Genotyping and sequencing showed that one of these was genotype 1, prevalent in Africa; the others were related to genotype 2 (Mexico-like) (GenBank accession nos. DQ151640, DQ151640) (5,6).

Data suggest that the epidemic began in the Yembi I neighborhood, then spread to the rest of the Begoua commune and finally to Bangui or surrounding areas (Figure). Of 715 suspected HEV case-patients recorded in the MSF hospital between July 22 and October 25, 2002, 552 (77%) lived in the Begoua commune (271 in the Yembi I neighborhood). The attack rate for the Begoua commune (20,080 inhabitants) was 2.7%. Of 351 suspected case-patients serologically tested for IgG and IgM anti-HEV antibodies, 222 (63%) had IgM antibodies, including 5/16 pregnant women (2.3% of all confirmed cases). Most patients reported jaundice (97.5%) and choluria (95.1%); other reported symptoms



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Detection of WU polyomavirus DNA by real-time PCR in nasopharyngeal aspirates, serum, and stool samples

Florian Neske^a, Kerstin Blessing^b, Anika Pröttel^{a,b}, Franziska Ullrich^{a,b}, Hans Wolfgang Kreth^b, Benedikt Weissbrich^{a,*}

^a Institute of Virology and Immunobiology, University of Würzburg, Versbacher Str. 7, 97078 Würzburg, Germany

^b Children's Hospital, University of Würzburg, Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2008

Received in revised form

28 November 2008

Accepted 2 December 2008

Keywords:

WU polyomavirus

Respiratory tract infection

Epidemiology

Viral coinfections

Real-time PCR

ABSTRACT

Background: The human WU polyomavirus (WUPyV) has been recently described as a novel virus in respiratory tract samples.

Objective: To investigate the viral load of WUPyV in nasopharyngeal aspirates (NPAs), stool, and serum samples of pediatric patients with acute respiratory tract diseases.

Study design: We established a real-time PCR for WUPyV DNA and tested NPA obtained between 2002 and 2007 from pediatric in-patients with acute respiratory tract diseases. In addition, 14 stool and 14 serum samples of children with WUPyV DNA positive NPA were analysed.

Results: WUPyV DNA was found in 5.2% of 1232 NPA. The median viral load in the NPA was 950 copies/ml (maximum 3.4E10 copies/ml). The WUPyV load in NPA was neither associated with the coinfection status nor with the clinical diagnoses. WUPyV DNA was found in 3 of 14 serum samples and in 2 of 14 stool samples. The WUPyV load in NPA tended to be higher in viremic children.

Conclusion: WUPyV DNA was found in NPA, serum, and stool of hospitalised children with acute respiratory tract diseases. Further studies are necessary to determine whether WUPyV is a human pathogen.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Respiratory tract infections are a leading cause of human morbidity and are mainly caused by viruses. Molecular methods have enabled the detection of a number of unknown viruses in respiratory tract samples such as several coronaviruses as well as the human bocavirus (hBoV).^{1–3} Most recently, two novel viruses of the family polyomaviridae were detected in respiratory samples and named KI polyomavirus⁴ and WU polyomavirus (WUPyV).⁵ Two human polyomaviruses were known before, the JC and BK polyomavirus. These viruses cause persisting infections, which are usually asymptomatic in immunocompetent individuals but may lead to severe disease under immunosuppression.⁶

In the first description of WUPyV, DNA was detected in 37 (3.0%) of 1245 samples from Australian children with acute respiratory tract infection and in 6 of 890 respiratory samples

obtained from adults and children in the United States.⁵ Most of the WUPyV DNA positive patients (86%) were younger than 4 years of age. Strikingly, coinfections were detected in 72% of the patients. Meanwhile, similar findings of WUPyV detection have been reported from South Korea, Canada, Scotland, the United States, and Germany with prevalence rates ranging from 1.6% to 7%.^{7–11} Because WUPyV DNA was also detected in samples of a control group without respiratory symptoms, the clinical relevance of positive WUPyV DNA results in respiratory samples has been questioned.¹¹ Rather, positive WUPyV DNA results in the respiratory tract may constitute an incidental detection of a persistent virus. However, further investigations are necessary to clarify this issue.

The initial studies on WUPyV infections have mostly used conventional single-round PCR for WUPyV detection. In order to facilitate WUPyV DNA analysis and to quantify WUPyV DNA in clinical samples, we designed a real-time PCR assay. Quantification of WUPyV DNA may be important with respect to the pathogenic relevance of positive WUPyV DNA results, as has been suggested for hBoV.¹² In the present study, we describe the evaluation of the WUPyV real-time PCR and its application for the detection of WUPyV DNA in nasopharyngeal aspirates (NPAs). In addition, we studied stool and serum samples of children with WUPyV DNA positive NPA.

Abbreviations: Ct, threshold cycle; hBoV, human bocavirus; NPA, nasopharyngeal aspirate; RSV, respiratory syncytial virus; WUPyV, WU polyomavirus.

* Corresponding author. Tel.: +49 931 201 49962; fax: +49 931 201 49561.

E-mail address: weissbrich@vim.uni-wuerzburg.de (B. Weissbrich).

2. Materials and methods

2.1. Samples

The specimens tested for WUPyV infection consisted of unselected stored NPA that were received from January 2002 through September 2005 and from January 2007 through July 2007 from the Children's Hospital of the University of Würzburg for screening of respiratory viruses. The aspirates were collected using a catheter tube and an aspiration trap. After suction the tube was rinsed with sterile saline. All samples had been tested for the presence of antigens of adenovirus, influenza A and B virus, parainfluenza viruses 1–3, and respiratory syncytial virus (RSV) by immunofluorescence assay and for the presence of hBoV DNA as described previously.¹³ In addition, archived stool and serum samples of children with positive WUPyV DNA in NPA were tested if they were obtained no longer than 14 days before or after the NPA. All samples had been stored at -20°C or below until DNA extraction. The study was approved by the ethics committee of the medical faculty of the University of Würzburg.

2.2. Real-time WUPyV PCR

DNA was extracted from 200 μl of the NPA and serum samples using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Germany) and from 140 μl of stool suspensions using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), which is known to purify both RNA and DNA.¹⁴ Both kits were used according to the instructions of the manufacturers. The elution volume of the extractions was 50 μl in case of the NPA and serum samples and 60 μl for the stool samples. Less than the stated starting material was used for the extraction procedures in exceptional cases, if the volume of the archived samples was otherwise insufficient. One negative control was extracted and amplified for every five patient samples. Extracted nucleic acids were stored at -70°C until PCR testing.

Primers and probe for the real-time PCR were selected by Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) from the C-terminal region of the large T-antigen that was used for a qualitative WUPyV PCR previously.¹⁰ Sequencing of 62 WUPyV positive samples had revealed high sequence conservation in this region. Blasting of primers and probe against GenBank to exclude unspecific binding did not reveal any significant homologies with other organisms. The real-time PCR was carried out in a final volume of 20 μl consisting of 5 μl of extracted DNA, primers WU2958s (CCTGTTAGTGATTTTCACCATGTA) and WU2865a (TGTCAGCAAATTCAGTAAGGCCTATATAT) at a final concentration of 400 nM, the probe WU2925s-TM (6FAM-AAAGTTGTGTAATTGGAAGAAGACTGTTAGACA-TAMRA) at a final concentration of 100 nM, and 1 \times Quantitect probe master mix (Qiagen). Amplification was performed on an ABI7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The cycling conditions were 50 cycles with 30 s at 95°C and 60 s at 60°C after a preheating step of 15 min at 95°C .

A plasmid containing the PCR product obtained with the primers AG0048 and AG0049⁵ cloned into the vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used as positive control and for the standard curve. Viral loads were calculated from the threshold cycle (Ct) values of the individual samples with respect to the standard curve. General laboratory procedures to prevent PCR contamination were strictly adhered to.

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by using GraphPad Prism Version 3.0c for Mac (GraphPad Software, San Diego, USA) and SPSS Version 15 for windows (SPSS, Chicago, USA).

3. Results

3.1. Validation of the quantitative real-time PCR

In order to validate the quantitative real-time PCR, the linearity of the assay, the lower limit of detection, the intra-assay and interassay variation, and the specificity were investigated. The amplification curve was linear over the range from 5 to at least 5×10^8 copies/reaction. For standard curves of 28 independent runs, the mean value of the slope was -3.53 with a standard deviation of 0.1. The mean of the coefficient of correlation was 0.992 with a standard deviation of 0.014. The lower limit of detection was determined by probit analysis based on a total of 24 replicates in three independent runs of a twofold dilution series. A concentration of 7.1 copies/reaction (95% confidence interval: 4.8–20.4 copies/reaction) was detectable with 95% probability (data not shown). This corresponds to 360 copies/ml of starting material (serum or NPA). The reliability of the real-time PCR was assessed by analyzing the intra-assay and interassay variation. The intra-assay coefficient of variation of the Ct values for three replicates was 1.32% or lower for standard concentrations of $5\text{--}5 \times 10^5$ copies/reaction (data not shown). The interassay coefficient of variation of a run control (nominal concentration, 5×10^5), which was regularly included in each run, was 15.1% (data not shown). To test the primers and probe for unspecific binding, samples known to be positive for JC, BK, and KI polyomavirus, hBoV DNA and, adenovirus DNA were tested in the WUPyV real-time PCR assay. All samples were negative in the WUPyV assay.

3.2. Quantitative detection of WUPyV DNA in NPA

For clinical evaluation of the WUPyV real-time PCR, 1232 samples from 1134 children that had previously been tested by conventional qualitative WUPyV PCR¹⁰ were retested with the real-time assay. After analysis of discrepant results between the qualitative and the real-time PCR assay by repeat-testing and by additional PCR assays in different genome regions, two samples remained that were positive only in the real-time assay (110 and 140 copies/ml) and one sample that was positive only in the qualitative assay. Overall, the frequency of WUPyV DNA detection in our study population was 5.2% with the real-time PCR assay. The median viral load of all WUPyV positive NPA was 9.5×10^2 copies/ml. The maximum value was 3.4×10^{10} copies/ml. Twenty-two (34.4%) of the positive samples had viral loads below the 95% limit of detection (360 copies/ml). A comparison of WUPyV loads with respect to the clinical diagnosis did not reveal any significant differences ($p=0.98$ by Kruskal–Wallis test; Fig. 1). In 32 (50%) of the WUPyV positive NPA, evidence of infection with other respiratory viruses was detected. The median WUPyV loads of the

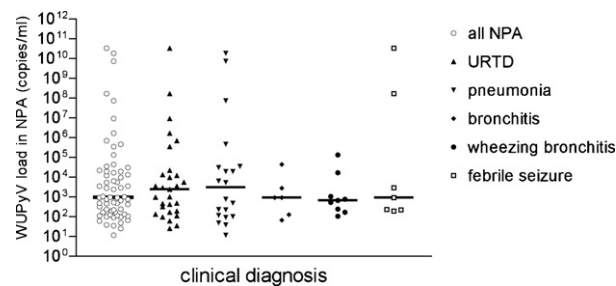


Fig. 1. Viral load of WUPyV in NPA according to the clinical diagnosis. The median values (horizontal bars) were 9.3×10^2 copies/ml for all NPA, 2.5×10^3 copies/ml for upper respiratory tract disease (URTD), 3.0×10^3 copies/ml for pneumonia, 9.3×10^2 copies/ml for bronchitis, 6.8×10^2 copies/ml for wheezing bronchitis, and 9.3×10^2 copies/ml for febrile seizure.

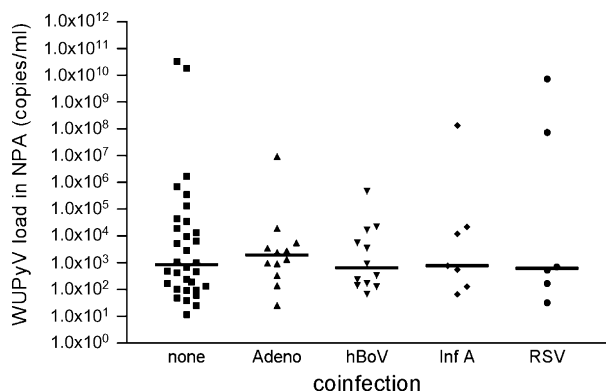


Fig. 2. WUPyV load in NPA of children with and without respiratory coinfections. In addition to WUPyV DNA, all samples were tested for antigen of RSV, influenza A/B virus, adenovirus, and parainfluenza viruses 1–3 by immunofluorescence assay and for hBoV DNA by PCR. Coinfecting agents found more than five times are displayed. Horizontal bars indicate median values.

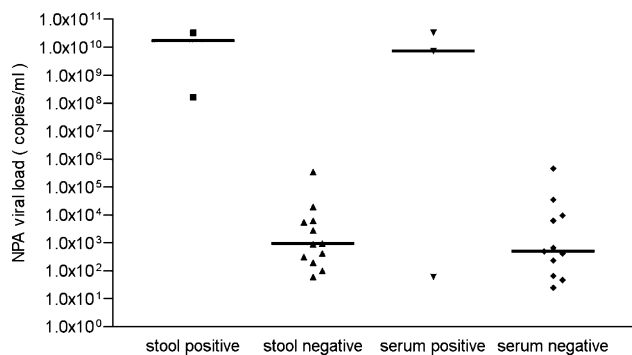


Fig. 3. Comparison of WUPyV loads in NPA according to WUPyV status of stool and serum samples of the same patient. Median values are indicated by horizontal bars.

samples with and without evidence of coinfection were almost identical for any coinfecting agent that was found more than five times ($p = 0.99$ by Kruskal–Wallis test; Fig. 2).

3.3. Detection of WUPyV DNA in serum and stool samples

For some of the children with WUPyV positive NPA, archived stool and serum samples from the same hospitalisation period were available. These samples were also tested by WUPyV real-time PCR. Three (21.4%) of 14 serum samples and two (14.3%) of 14 stool samples were positive for WUPyV DNA. Inhibition of the WUPyV-negative stool samples was excluded by spiking experiments with WUPyV plasmid DNA (data not shown). The median WUPyV load in NPA tended to be higher in children with positive serum samples (7.5×10^9 copies/ml versus 5.0×10^2 copies/ml; $p = 0.09$ by Mann–Whitney test) or positive stool samples (1.7×10^{10} copies/ml versus 9.4×10^2 copies/ml; numbers too small for calculation of p -value; Fig. 3). Interestingly, the patient with the highest WUPyV viral load (3.4×10^{10} copies/ml) of all tested NPA was positive for WUPyV DNA in stool and serum.

4. Discussion

In order to improve the diagnostic tools for WUPyV detection, we have established a real-time PCR method. In our validation experiments, this assay proved to be sensitive, specific, and reliable for WUPyV DNA amplification. Quantification was possible over a broad linear range. We found WUPyV DNA in 5.2% of NPA obtained from infants and children with respiratory tract diseases during the

years 2002–2005 and 2007 in the region of northern Bavaria in Germany. PCR inhibition by NPA was not assessed as part of this study, but data from our routine diagnostic lab demonstrate that inhibition occurs in less than 1% of NPA (unpublished observation). Two other studies using real-time PCR and probe detection for WUPyV amplification have been published thus far.^{9,15} However, detailed descriptions of analytical assay characteristics and quantitative data of clinical samples were not provided.

There are some striking features of the quantitative WUPyV DNA results in our study. While very high viral loads of greater than 10^9 copies/ml were found in a small proportion (4.7%) of the WUPyV DNA positive NPA, the majority of these samples (51.6%) contained only low viral loads of less than 1000 copies/ml. Although the significance of viral load results in NPA is limited to some extent because of technical variations in the acquisition procedure (e.g. the volume of the NPA on arrival in the lab ranged approximately from 1 to 10 ml), the observed viral loads in patient samples differed by a factor of 10^8 , a range much larger than could be accounted for by variation in NPA volumes obtained. In analogy to hBoV,¹⁶ the observed WUPyV load distribution is compatible with primary WUPyV infection associated with high viral loads in few of the children and incidental detection of low copy numbers of persistent virus in most of the children.

For two of the three children with very high viral load in NPA, serum samples from the same disease episode were available for retrospective testing. WUPyV viremia was found in both of these children. Again in analogy to the findings described for hBoV,¹⁶ this may be an indication of the clinical relevance of WUPyV in a subset of the children. Serological studies to determine the time point of primary WUPyV infection will be necessary to further elucidate this issue.

Based on the hypothesis that high viral loads may have pathogenic relevance, we compared the WUPyV load in NPA according to the clinical diagnosis. Significant differences of the median viral load were not observed between the different disease groups. However, this analysis is limited by the retrospective nature of our study, by the high number of coinfections, and by the fact that clinical information was analyzed only for WUPyV positive patients.

Stool samples from 2 of 14 children were positive for WUPyV DNA. This finding may be explained by replication of WUPyV in gastrointestinal epithelium. However, both of the children had high WUPyV loads in NPA, which points to swallowing of WUPyV as an alternative explanation for the presence of WUPyV DNA in stool samples. Whether the WUPyV DNA in stool samples is derived from infectious or from degraded virus particles and if WUPyV may be a cause of gastroenteritis remains to be determined.

In conclusion, we have successfully established and used a real-time PCR assay for the detection of WUPyV DNA. Application of this assay for quantitative analysis has shown that WUPyV DNA can be found in NPA samples at very high titers. In addition to the respiratory tract, WUPyV was also found in serum and stool samples. However, the clinical relevance of WUPyV infections remains uncertain both for the respiratory and for the gastrointestinal tract.

Acknowledgements

We thank the technicians of the viral diagnostic lab for skilful and dedicated assistance.

References

- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:12891–6.
- Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus AD. Newer respiratory virus infections: human metapneumovirus, avian influenza virus, and human coronaviruses. *Curr Opin Infect Dis* 2005; **18**:141–6.

3. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;**79**:884–95.
4. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 2007;**81**:4130–6.
5. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 2007;**3**:e64.
6. Ahsan N, Shah KV. Polyomaviruses and human diseases. *Adv Exp Med Biol* 2006;**577**:1–18.
7. Abed Y, Wang D, Boivin G. WU polyomavirus in children, Canada. *Emerg Infect Dis* 2007;**13**:1939–41.
8. Han TH, Chung JY, Koo JW, Kim SW, Hwang ES. WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2007;**13**:1766–8.
9. Le BM, Demertzis LM, Wu G, Tibbets RJ, Buller R, Arens MQ, et al. Clinical and epidemiologic characterization of WU polyomavirus infection, St. Louis, Missouri. *Emerg Infect Dis* 2007;**13**:1936–8.
10. Neske F, Blessing K, Ullrich F, Pröttel A, Kreth HW, Weissbrich B. WU polyomavirus infection in children. *Germany Emerg Infect Dis*; 2008;**14**:680–1.
11. Norja P, Ubbilos I, Templeton K, Simmonds P. No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. *J Clin Virol* 2007;**40**:307–11.
12. Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol* 2008;**41**:29–33.
13. Weissbrich B, Neske F, Schubert J, Tollmann F, Blath K, Blessing K, et al. Frequent detection of Bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis* 2006;**6**:109.
14. Weissbrich B, Harms F, ter Meulen V. Detection of enterovirus RNA and herpes virus DNA in CSF by multiplex PCR. *Qiagen News* 1995;2/95.
15. Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Gould A, Nissen MD, Sloots TP. Development and evaluation of real-time PCR assays for the detection of the newly identified KI and WU polyomaviruses. *J Clin Virol* 2007;**40**:9–14.
16. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HG, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007;**44**:904–10.

Diskussion:

Das humane Bocavirus

In der vorliegenden Studie wurde die Infektionshäufigkeit von hBoV bei Kindern mit ARE durch eine spezifische qualitative PCR untersucht. Von den 835 untersuchten NRS konnte bei 10,3 % hBoV-DNA detektiert werden, was sich mit den Daten der in den vergangenen Jahren weltweit durchgeführten Studien deckte, die eine Infektionshäufigkeit zwischen 1,5 und 19 % ermittelten (Allander, T., 2008; Lindner, J. and Modrow, S., 2008). HBoV-DNA konnte über das ganze Jahr verteilt in NRS nachgewiesen werden, woraus geschlossen werden kann, dass hBoV-Infektionen nicht saisonabhängig sind und somit keinen Häufigkeitsgipfel, wie andere respiratorische Viren, in den Wintermonaten haben. Diese Schlussfolgerung wird durch verschiedene Arbeiten gestützt, die ähnliche Ergebnisse in der saisonalen Verteilung von hBoV-Infektionen feststellten (Allander, T., 2008; Anderson, L. J., 2007).

Das mediane Alter der hBoV-positiven Patienten ähnelte mit 1,6 Jahren dem Alter des Gesamtkollektives (Median 1,8 Jahre). Auch in anderen Veröffentlichungen konnte das mediane Alter der hBoV-infizierten Patienten auf < 2 Jahren eingegrenzt werden (Allander, T., 2008; Lindner, J. and Modrow, S., 2008), was darauf schließen lässt, dass eine primäre Infektion mit hBoV wahrscheinlich in den ersten 2 Lebensjahren erfolgt.

Durch die qualitative PCR konnte ein schnelles, spezifisches Testverfahren zur Ermittlung der Infektionshäufigkeit von hBoV etabliert werden. Dabei wurde die analytische Sensitivität durch ein Kontroll-Plasmid und die Spezifität durch Sequenzierung der PCR-Amplikons überprüft. Um sich anhand der Empfehlungen von Frederick und Relman (Fredericks, D. N. and Relman, D. A., 1996) mit der Fragestellung, ob es sich bei hBoV um ein Pathogen handelt befassen zu können und das Testverfahren zu beschleunigen, wurde für das hBoV eine qrt-PCR etabliert. Mit diesem Testverfahren konnte nach erfolgreicher Validierung eine Infektionshäufigkeit von 12 % der untersuchten NRS ermittelt werden, bei einer medianen hBoV-Last von $4,9 \times 10^3$ Kopien/ml. Interessanterweise konnte kein signifikanter Unterschied in der hBoV-DNA-Menge zwischen Proben, die hBoV als einziges Virus enthielten, und Proben, in denen ein weiteres Virus detektiert worden war, festgestellt werden. Dies steht im Kontrast zum Coronavirus NL63, bei welchen eine höhere Viruslast festgestellt wurde, wenn NL63 der einzige nachgewiesene Erreger war (van der, Hoek L. et al., 2005) und könnte darauf hinweisen, dass die Replikation von hBoV nicht durch die Anwesenheit anderer respiratorischer Viren beeinflusst wird. Da aber in der vorliegenden Studie nur auf Koinfektionen mit AdV, Inf A+B, PIV 1-3 und RSV getestet wurde, bedarf es weiterer

Experimente, um durch ein breiteres Spektrum an getesteten respiratorischen Viren die Anzahl der tatsächlichen Koinfektionen zu ermitteln. Dadurch könnten sich neue Erkenntnisse in Bezug auf einen möglichen Zusammenhang zwischen hBoV-Last und Koinfektionen ergeben.

Zusätzlich zu den NRS wurden Serum- und Stuhlproben von Kindern getestet, deren NRS zuvor positiv auf hBoV-DNA getestet worden war. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der hBoV-DNA-Menge im NRS und dem hBoV-DNA-Status von Stuhlproben festgestellt werden. Danach war die hBoV-DNA-Menge im NRS signifikant höher ($p < 0,0001$), wenn die Stuhlprobe des Patienten ebenfalls hBoV-DNA enthielt. Ob die hBoV-DNA in der Stuhlprobe auf verschluckte Viren oder auf eine Infektion des gastrointestinalen Traktes zurückzuführen ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Zwar konnte eine spanische Arbeitsgruppe hBoV-DNA mit einer Häufigkeit von 9,1 % in Stuhlproben von Kindern mit gastrointestinalem Infekt nachweisen (Vicente, D. et al., 2007), in einer thailändischen Studie konnte hBoV-DNA jedoch nur bei 0,9 % von Kindern mit Gastroenteritis detektiert werden (Chieochansin, T. et al., 2008), was sich nicht signifikant von der Häufigkeit einer ebenfalls untersuchten Kontrollgruppe gesunder Kinder unterschied. Ferner konnte in einer deutschen Studie gezeigt werden, dass kein Zusammenhang zwischen hBoV-Infektion und untersuchten Gastroenteritis-Ausbrüchen bestand (Campe, H. et al., 2008). Daher scheint hBoV im Gegensatz zu seinen tierpathogenen Verwandten keine gastrointestinale Krankheit auszulösen. Da in der vorliegenden Studie nur bei Kindern mit hoher hBoV-Last im NRS hBoV-DNA im Stuhl nachgewiesen werden konnte, könnte es sich im Stuhl um verschluckte Viren handeln. Die Krankendaten wurden jedoch nicht in Bezug auf gastrointestinale Erkrankungen ausgewertet, wodurch diese These lediglich als Vermutung gelten kann.

Die Testverfahren der qualitativen- und qrt-PCR lieferten nahezu identische Ergebnisse und waren beide geeignet, die Infektionshäufigkeit von hBoV zu untersuchen. Jedoch haben beide Nachweismethoden ihre Vor- und Nachteile. Während die konventionelle qualitative PCR mit Gel-Detektion schneller etabliert werden konnte und mit weniger Kosten verbunden ist als eine qrt-PCR, kann durch eine validierte qrt-PCR innerhalb von ~2 h sowohl die Anwesenheit von hBoV-DNA als auch die Menge der viralen DNA nachgewiesen werden. Allerdings ist die Validierung der qrt-PCR aufwändiger, da Linearität, Amplifikations-Effizienz und die Variationskoeffizienten von Inter- und Intraassay bestimmt werden müssen. Ferner ist die vorausgehende Ermittlung von optimalen Primer/Sonden-Konzentrationsverhältnissen durch

die zusätzliche Sonde und dadurch entstehende Variationsmöglichkeiten aufwändiger, als im Falle eines Primerpaares für eine qualitative PCR (Ratcliff, R. M. et al., 2007).

Daher bot sich die konventionelle qualitative PCR an, erste epidemiologische Daten von hBoV Infektionen zu sammeln, während durch die qrt-PCR zusätzliche Informationen in Form der DNA-Menge gewonnen werden konnten. Somit waren beide Testverfahren für die Untersuchung der hBoV-Epidemiologie wichtig.

Bei der Untersuchung des hBoV-Infektionsverlaufes von 6 Kindern konnte erstmals hBoV-DNA über einen Zeitraum von 4,5 Monaten nachgewiesen werden. Bei 4 der Patienten wurde ein Viruslastabfall zwischen den einzelnen Probenentnahme-Zeitpunkten und bei zwei Kindern ein Anstieg der hBoV-Last festgestellt. Von den beiden Kindern mit ansteigender Viruslast wurde bei einem zu Beginn eine Infektion mit hBoV festgestellt und bei der zweiten Probenentnahme eine Koinfektion mit RSV. Dies könnte auf hBoV als Wegbereiter für andere respiratorische Viren hindeuten. Das andere Kind wies zunächst eine RSV-Koinfektion auf, die jedoch bei der zweiten Probenentnahme nicht mehr nachweisbar war. Gerade im Zusammenhang mit dem langen Nachweis von hBoV über 4,5 Monate könnte dieser Fall einen Hinweis auf die Persistenz und Reaktivierung von hBoV liefern. So wäre es möglich, dass im Zuge der Infektion mit einem anderen respiratorischen Virus eine Stimulierung der hBoV-Replikation stattfindet, was den Anstieg der hBoV-Last erklären würde. Um diese These jedoch weiter zu belegen sind zusätzliche Verlaufsstudien erforderlich.

Zur Bestimmung der Divergenz von hBoV wurde sowohl ein variabler Abschnitt des VP2-Gens von 69 Stämmen als auch das komplette Genom von sieben ausgesuchten hBoV-Stämmen sequenziert. In beiden Fällen konnten die phylogenetischen Cluster St1 und St2 beobachtet werden, die auch schon von Allander et al. beschrieben wurden (Allander, T. et al., 2005). Beide Cluster wiesen eine sehr hohe Nukleotid-Identität auf (VP2: 99,4 %; Genom: 99,6 %). Die nachgewiesenen Mutationen in den Nichtstrukturgenen NP1 und NS1 waren ausschließlich synonym, so dass sich eine AS-Identität von 100 % ergab. Lediglich der ORF VP1/VP2 wies nichtsynonyme Mutationen (n=4) auf. Von diesen waren allerdings drei clusterunspezifisch, wodurch nur eine clusterspezifische Substitution auf AS-Ebene im Genom der 7 untersuchten hBoV-Stämme ermittelt werden konnte. Diese Ergebnisse wurden durch phylogenetische Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt (Allander, T. et al., 2005; Lindner, J. and Modrow, S., 2008), die ebenfalls nur eine geringe Divergenz bei hBoV feststellen konnten. Aufgrund der hohen Sequenzidentität von hBoV, sowohl auf Nukleotid- als auch AS-Ebene, und einer fehlenden Assoziation der Cluster mit Epidemiologie,

Krankheitsbild oder Viruslast, ist es fraglich, ob eine Einteilung von hBoV in St1- und St2-Stämme sinnvoll ist.

Um die Epidemiologie von hBoV näher zu untersuchen, ist es notwendig, neben hBoV-DNA auch Antikörper gegen hBoV detektieren zu können. Daher wurde ein IFT entwickelt, bei dem SF9-Insektenzellen mit rekombinanten Baculoviren infiziert wurden, die das VP2-Gen von hBoV enthielten. Dieses Gen codiert für ein Kasidprotein, welches beim Parvovirus B19, dem am besten charakterisierten humanpathogenen Virus der Familie der Parvoviren, ~96 % des Kapsides bildet (Heegaard, E. D. and Brown, K. E., 2002). Bei der Testung von Blutspender-Proben wurde eine hBoV-IgG-Seroprävalenz von 74 % ermittelt. Da durch statistische Analysen keine Korrelation zwischen Alter und Seroprävalenz festgestellt werden konnte, ist eine primäre Infektion mit hBoV vor Erreichen des 20. Lebensjahres wahrscheinlich. Diese Daten werden durch eine japanische Studie (Endo, R. et al., 2007) belegt, die bei Kindern mit ARE ab 2 Jahren eine Seroprävalenz von >80 % und bei Erwachsenen eine Seroprävalenz von 94 % für hBoV-VP1-IgG ermitteln konnten. Die Untersuchung der Seroprävalenz gesunder Erwachsener lässt natürlich noch keine Rückschlüsse über die Pathogenität oder ein hBoV-assoziiertes Krankheitsbild zu. Daher sollte das etablierte serologische Testverfahren in Verlaufsstudien zum Nachweis von Anti-hBoV-VP2-IgM herangezogen und zur Ermittlung von Serokonversionen verwendet werden. Dadurch ließe sich der Zeitpunkt einer primären hBoV-Infektion genau bestimmen und eine Auswertung der vorliegenden klinischen Daten könnte aussagekräftige Rückschlüsse auf ein hBoV-assoziiertes Krankheitsbild zulassen.

Bei der Wahl des Testverfahrens zur Ermittlung der Seroprävalenz bei gesunden Erwachsenen wurde ein IFT angewandt, da bei diesem Verfahren das Antigen in natürlicher Konformation vorliegt und so auch konformationsabhängige Antikörper daran binden können. Im Falle eines Immunoblots wird das Antigen durch die Auftrennung in einem SDS-Gel linearisiert, so dass konformationsabhängige Antikörper nicht mehr binden können. Eine finnische Studie (Soderlund, M. et al., 1995) konnte zeigen, dass Antikörper gegen lineare Epitope des VP2-Kapsidproteins von Parvovirus B19 innerhalb von 6 Monaten nach Infektion nicht mehr detektierbar waren, während Antikörper gegen Konformationsepitope weiterhin vorlagen. Da in der vorliegenden Studie die Seroprävalenz gesunder Erwachsener untersucht werden sollte und daher davon auszugehen war, dass die Primärinfektion in der Regel lange zurück lag, schien die Verwendung einer Methode, die auf Konformationsepitopen basiert, wichtig. Eine weitere Alternative zum IFT wäre z. B. ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA). Für die Etablierung eines ELISA wären allerdings große Mengen an Antigen nötig,

die gewöhnlich durch eine Überexpression in Bakterien gewonnen werden. Zusätzlich ist ein hoher Aufreinigungsgrad der Antigene notwendig, um unspezifische Reaktionen vom Probenmaterial im ELISA zu minimieren. Eine Antigen-Aufreinigung ist bei IFT-Untersuchungen nicht notwendig. Daher wurde der IFT als Methode für die Durchführung der ersten serologischen Untersuchungen ausgewählt. Durch die individuelle Mikroskopierung jeder einzelnen Probe können uncharakteristische Fluoreszenzmuster erkannt werden, so dass IFT-Untersuchungen auch ohne aufwändige Validierungen häufig eine Spezifität auf Bestätigungstest-Niveau erreichen. Da ELISA-Untersuchungen jedoch eine Automatisierung und eine bessere Standardisierung erlauben, sollten zukünftige Studien das Ziel haben, VP2 oder andere hBoV-Antigene zu produzieren, um die Etablierung eines ELISA zu ermöglichen. Um anhand der ermittelten Daten abzuklären, ob es sich bei hBoV um ein Pathogen handelt, wurden die sieben Empfehlungen von Frederick und Relman herangezogen (Fredericks, D. N. and Relman, D. A., 1996). Danach sollte virales Erbmaterial (i) aus möglichst vielen Patienten mit einem „bestimmten Krankheitsbild“ isoliert werden. In der vorliegenden Studie wurde ein respiratorisches Virus untersucht, wodurch das „bestimmte Krankheitsbild“ eine ARE wäre, unabhängig von IOA oder IUA, da respiratorische Viren ein breites Spektrum an Krankheiten auslösen können (Tyrell, D. A. J., 1996). Durch den Nachweis von hBoV-DNA bei 12,0 % der untersuchten Kinder mit ARE, ist eine Zuordnung von hBoV zu den respiratorischen Viren möglich. Ferner (ii) soll die virale DNA bei gesunden Patienten gar nicht oder nur in geringer Menge vorhanden sein. Da keine NRS von gesunden Kindern zur Verfügung standen, konnten diese nicht auf die Anwesenheit von hBoV-DNA untersucht werden, so dass zu diesem Punkt keine Aussage getroffen werden konnte. Allerdings wurde in einer amerikanischen Studie bei keinem Kind einer asymptomatischen Kontrollgruppe hBoV-DNA detektiert (Kesebir, D. et al., 2006), wodurch die zweite Empfehlung von Fredericks und Relman für hBoV erfüllt wurde. Die folgenden Empfehlungen befassen sich mit einer Reduzierung der Virus DNA-Menge bei gesundenden Patienten (iii) und dem Vorhandensein großer Mengen an viraler DNA vor Beginn oder während einer Krankheit (iv). Obwohl wir sehr hohe hBoV-Lasten bei einigen Patienten beobachten konnten, fehlten in den meisten Fällen, aufgrund des retrospektiven Studiendesigns, weitere Proben dieser Patienten, wodurch die hBoV-DNA-Menge vor oder nach dem ersten Nachweis nicht bekannt war. Sowohl in einer schwedischen als auch in einer japanischen Studie konnte jedoch im Laufe einer hBoV-Infektion eine abfallende hBoV-Last im Serum nachgewiesen werden (Allander, T. et al., 2007b; Endo, R. et al., 2007). Des Weiteren wurden in der schwedischen und in einer italienischen Veröffentlichung Viruslasten $>10^5$ Kopien/ml als Hinweis auf eine primäre

Infektion gewertet und das vorliegende Krankheitsbild der hBoV-Infektion zugeordnet (Allander, T. et al., 2007b; Gerna, G. et al., 2007). Ein weiterer Aspekt von Ferderick und Relman war, (v) dass das vorliegende Krankheitsbild dem Krankheitsbild ähneln sollte, welches von phylogenetisch verwandten Viren ausgelöst wird. Die tierpathogenen Vertreter des Genus Bocavirus werden zwar in erster Linie mit Infektionen des gastrointestinalen Traktes und Fruchtverlust bei trächtigen Tieren assoziiert, können bei Jungtieren jedoch auch zu Infektionen des respiratorischen Traktes führen (Durham, P. J. et al., 1985; Steinel, A. et al., 2001), wodurch ein Zusammenhang zwischen den Krankheitsbildern der Viren des Genus Bocavirus zu bestehen scheint. Die nächste Empfehlung befasst sich (vi) mit dem Nachweis des Virus in betroffenem Gewebe auf zellulärer Ebene. Da von den hBoV-infizierten Kindern keine Gewebeproben zur Verfügung standen, konnte dieser Punkt nicht untersucht werden. Auch in der Literatur sind dazu bisher noch keine Daten bekannt. Die letzte Empfehlung (vii) befasst sich mit der Reproduzierbarkeit der Daten. Die in der vorliegenden Studie ermittelten Daten zur Epidemiologie von hBoV stimmen mit Ergebnissen anderer Studien weltweit überein (Allander, T., 2008; Lindner, J. and Modrow, S., 2008), wodurch die Reproduzierbarkeit der Daten bestätigt wird.

Zusammenfassend wurden in den vorliegenden Studien Testverfahren etabliert, die eine Detektion von hBoV in verschiedenen Probenmaterialien ermöglichen. Die untersuchten Proben lieferten nach den Empfehlungen von Fredericks und Relman erste Hinweise auf eine Assoziation von hBoV mit ARE. Vor allem die Proben mit hohen Viruslasten könnten zur genaueren Bestimmung dieser Assoziation weitere Hinweise geben, was durch die Arbeiten von Allander et al. (Allander, T. et al., 2007b) und Gerna et al. (Gerna, G. et al., 2007) nahegelegt wird. Allerdings kann hBoV-DNA, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, über einen Zeitraum von bis zu 4,5 Monaten nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass nach der hBoV-Primärinfektion möglicherweise eine Phase mit asymptomatischer Persistenz eintritt, so dass viele hBoV-PCR Ergebnisse mit geringen DNA-Mengen klinisch irrelevant sein könnten.

Das Polyomavirus WU

Um die Infektionshäufigkeit von WUPyV bei Kindern mit ARE zu untersuchen wurde eine qualitative PCR etabliert. Mit dieser wurden 62 (4,9 %) von 1277 NRS positiv auf WUPyV-DNA getestet. Die ermittelten Daten deckten sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die eine Infektionshäufigkeit zwischen 1,0 und 6,6 % in den jeweils untersuchten Populationen aufwiesen (Abed, Y. et al., 2007; Gaynor, A. M. et al., 2007; Han, T. H. et al., 2007; Le, B. M. et al., 2007; Norja, P. et al., 2007; Payungporn, S. et al., 2008). Das mediane Alter der WUPyV-positiven Patienten (3,0 Jahre) der vorliegenden Studie war signifikant höher als das mediane Alter der Gesamtpopulation (1,6 Jahre). Ferner wurde nur bei 3,2 % der Kinder über 6 Jahren WUPyV-DNA nachgewiesen, während der Anteil dieser Altersgruppe in der Gesamtpopulation mit 15,7 % deutlich höher war. Das mediane Alter wurde bisher nur in einer südkoreanischen Studie angegeben. Dabei wurde im Gegensatz zu den vorliegenden Daten ein medianes Alter der WUPyV-positiven Patienten von 9 Monaten festgestellt (Han, T. H. et al., 2007). Dieser Unterschied des medianen Alters der WUPyV-positiven Kinder liegt wahrscheinlich in den Patientenkollektiven begründet. Während in der Arbeit von Han et al. 85,6 % der untersuchten Kinder unter 2 Jahren waren, lag in der vorliegenden Studie der Anteil von Kindern unter 2 Jahren nur bei 53,2 %. Das mediane Alter der WUPyV-positiven Kinder der vorliegenden Studie passt zu dem Alter, in dem Kinder beginnen in den Kindergarten zu gehen, wodurch eine primäre Infektion mit WUPyV durch den vermehrten sozialen Kontakt in diesen Einrichtungen erfolgen könnte. Um sichere Angaben über das Alter der Primärinfektion machen zu können, sind jedoch Seroprävalenz-Studien erforderlich.

WUPyV-DNA konnte über das ganze Jahr verteilt in NRS nachgewiesen werden und hatte im Gegensatz zu anderen respiratorischen Viren kein Maximum in den Wintermonaten. Dies wurde durch eine schwedische Arbeit bestätigt, die ebenfalls keine erhöhte Infektionsrate im Winter detektieren konnte (Lindau, C. et al., 2009). Bei der Auswertung der Krankenakten WUPyV-positiver Patienten ergab sich kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen einer WUPyV-Infektion und einem bestimmten respiratorischen Krankheitsbild.

Analog zum Vorgehen bei hBoV wurde eine WUPyV-qrt-PCR etabliert um WUPyV-Infektionen schneller diagnostizieren zu können und durch die Quantifizierung zusätzliche Informationen zu erhalten. Nach erfolgreicher Validierung konnte bei 64 (5,2 %) der 1232 untersuchten NRS WUPyV-DNA detektiert werden. In dieser Arbeit wurde erstmals die mögliche Assoziation zwischen der WUPyV-DNA-Menge und Krankheitsbild oder Koinfektionsstatus untersucht, wobei allerdings keine Zusammenhänge offensichtlich wurden.

Ferner wurden 14 Serum- und 14 Stuhlproben von Patienten untersucht, deren NRS zuvor positiv auf WUPyV getestet worden war. Dabei konnte in 3 Serum- und 2 Stuhlproben WUPyV-DNA nachgewiesen werden. Es war zu beobachten, dass die WUPyV-DNA Menge im NRS deutlich größer war, wenn eine Stuhl- oder Serumprobe ebenfalls positiv war. Interessanterweise konnte beim Patient mit der höchsten WUPyV-DNA-Menge sowohl im Stuhl als auch im Serum WUPyV-DNA detektiert werden. Da im NRS des Patienten keine Koinfektion detektiert wurde, könnte es sich in diesem Fall um eine durch WUPyV ausgelöste Krankheit handeln.

Wie schon bei der Untersuchung der Infektionshäufigkeit von hBoV, waren die Ergebnisse zwischen qualitativer und qrt-PCR nahezu identisch. Für die Frage, welches Testverfahren zur Ermittlung der Infektionshäufigkeit besser geeignet ist, treffen daher für WUPyV die bereits im hBoV-Abschnitt aufgeführten Vor- und Nachteile der konventionellen qualitativen PCR und der qrt-PCR ebenfalls zu (Ratcliff, R. M. et al., 2007).

Bei der phylogenetischen Untersuchung von WUPyV wurde sowohl bei der Sequenzierung einer nicht-codierenden Region als auch bei der kompletten Sequenzierung des Genoms eine Nukleotid-Identität von über 99 % und die Bildung zweier Cluster beobachtet. Die Clusterbildung konnte bei allen 5 WUPyV-Genen nachgewiesen werden. Ein großer Anteil der Nukleotid-Mutationen war nicht synonym, was in 46 variablen AS-Positionen resultierte, von denen 35 Cluster-spezifisch waren. Auch wenn der Anteil der Cluster-spezifischen AS-Substitutionen deutlich höher als bei hBoV war, konnten auch bei WUPyV keine Assoziationen zwischen Krankheitsbild, Koinfektionsstatus oder der WUPyV-DNA-Menge und der Cluster-Zugehörigkeit festgestellt werden. Die gesammelten phylogenetischen Daten decken sich mit denen einer thailändischen Arbeitsgruppe, die ebenfalls eine hohe Nukleotid-Identität und einen großen Anteil an AS-Substitutionen feststellen konnte (Payungporn, S. et al., 2008). Eine Unterteilung von WUPyV in zwei unterschiedliche Cluster ist daher möglicherweise sinnvoll.

Analog zum für hBoV-IgG entwickelten IFT wurde für den Nachweis von WUPyV-VP1-IgG ein auf rekombinanten Baculoviren und SF9-Zellen basierender IFT entwickelt. Hierfür wurde das Kapsidprotein VP1 gewählt, da sich bei den humanpathogenen Vertretern der Polyomaviren zum einen die neutralisierende Immunantwort gegen Epitope des VP1-Proteines richtet und zum anderen der Großteil des Kapsides aus VP1-Proteinen besteht (Modrow, S., 2003). Bei der Untersuchung von Plasmen gesunder Erwachsener konnte eine Seroprävalenz von 88 % ermittelt werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Probanden und der An- oder Abwesenheit von Anti-WUPyV-VP1-IgG war nicht

offensichtlich. Die serologischen Ergebnisse sprechen für eine primäre WUPyV-Infektion vor Erreichen des 20. Lebensjahres. In einer amerikanischen Studie wurde mit 69 % eine etwas niedrigere WUPyV-Seroprävalenz bei gesunden Erwachsenen festgestellt (Dalianis, T. et al., 2009). In dieser Studie wurde jedoch rekombinates WUPyV-VP1 aus Bakterien verwendet, wodurch die abweichende Seroprävalenz zur vorliegenden Studie im Expressionssystem begründet liegen kann, da in prokaryontischen Expressionssystemen keine post-translationale Modifikation vorliegt (Aricescu, A. R. et al., 2006). Eine andere Erklärung, könnte eine unterschiedliche globale Prävalenz von WUPyV sein. Um diese Fragen weiter abzuklären sind jedoch zusätzliche Studien notwendig. Die in der vorliegenden Studie ermittelte Seroprävalenz für WUPyV ist ähnlich hoch wie bei den bekannten humanpathogenen Polyomaviren JC und BK (jeweils ~90 % bei Erwachsenen) (Knowles, W. A., 2006).

Wie schon bei hBoV ausgeführt, wurde bewusst der IFT als Nachweisassay verwendet, um Antikörper gegen Konformationsepitope detektieren zu können. Nachdem das Testverfahren in der vorliegenden Arbeit etabliert wurde, können künftige Studien durch Erfassung der IgG-Serokonversion oder durch Verwendung des IFT für IgM-Tests Aufschluss über eine primäre Infektion und ein damit verbundenes Krankheitsbild geben.

Zur Ermittlung, ob es sich bei WUPyV um ein Pathogen handelt, wurden analog zu hBoV die Empfehlungen von Frederick und Relman herangezogen (Fredericks, D. N. and Relman, D. A., 1996). Dabei war zu sehen, dass 5 % der untersuchten Kinder mit ARE eine WUPyV-Infektion aufwiesen, wodurch Empfehlung (i) erfüllt würde. In der vorliegenden Studie wurden keine asymptomatischen Proben untersucht. Für die Empfehlung (ii), die sich mit dem Fehlen der viralen DNA in Proben von gesunden Probanden beschäftigt, können jedoch fremde Veröffentlichungen herangezogen werden. Danach konnte WUPyV-DNA in respiratorischen Proben von asymptomatischen Kontrollgruppen mit einer ähnlichen oder sogar höheren Häufigkeit nachgewiesen werden, als in den jeweiligen Studienpopulationen mit ARE (Abed, Y. et al., 2007; Norja, P. et al., 2007; Payungporn, S. et al., 2008). Daher wird Empfehlung (ii) für WUPyV nicht erfüllt. Da keine Verlaufspuben von WUPyV-positiven Kindern vorlagen, konnte die dritte Empfehlung nicht weiter untersucht werden. Bis dato wurden auch noch keine anderen Verlaufsstudien zu WUPyV veröffentlicht. In einigen Fällen konnten hohe WUPyV-Lasten bei Kindern mit ARE beobachtet werden, wodurch Empfehlung (iv) erfüllt scheint. Im Gegensatz zu hBoV sind 2 mit WUPyV verwandte Viren humanpathogen (JCV und BKV), so dass Empfehlung (v) besser angewandt werden kann. Eine primäre Infektion mit JCV und BKV verläuft in der Regel asymptomatisch, kann aber auch eine leichte respiratorische Erkrankung verursachen (Ahsan, N. and Shah, K. V., 2006).

Da WUPyV-DNA sowohl bei Kindern, die an ARE litten, als auch bei asymptomatischen Kindern nachgewiesen wurde (Abed, Y. et al., 2007; Norja, P. et al., 2007; Payungporn, S. et al., 2008), könnte davon ausgegangen werden, dass der Infektionsverlauf von WUPyV dem anderer humanpathogener Polyomaviren (BK und JC) ähnelt. Um diese These zu überprüfen sind weitere Untersuchungen nötig, die sich gezielt mit symptomatischen und asymptomatischen Patienten beschäftigen, die WUPyV als einzigen Erreger ausweisen. Wie schon bei hBoV beschrieben, standen auch für WUPyV-infizierte Kinder keine Gewebeproben zur Verfügung. Da auch in der bisherigen Literatur keine Studien mit Gewebeproben durchgeführt wurden, konnte Empfehlung (vi) nicht überprüft werden. Die siebte Empfehlung befasst sich mit der Reproduzierbarkeit der Daten. Analog zu hBoV konnte WUPyV mit ähnlichen Infektionshäufigkeiten weltweit in NRS von Kindern mit ARE nachgewiesen werden (Abed, Y. et al., 2007; Gaynor, A. M. et al., 2007; Han, T. H. et al., 2007; Le, B. M. et al., 2007; Payungporn, S. et al., 2008; Ren, L. et al., 2008), wodurch diese Empfehlung als erfüllt betrachtet werden kann. Zusammenfassend kann zur Zeit noch nicht beantwortet werden, ob WUPyV nach den Richtlinien von Frederick und Relman ein krankheitsauslösendes Virus ist, da einige Empfehlungen erfüllt wurden, andere, wie die Abwesenheit von WUPyV-DNA in gesunden Patienten, jedoch nicht. Daher sollten weitere Studien angestrebt werden, die sich in erster Linie mit primären WUPyV-Infektionen beschäftigen.

Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit für hBoV und WUPyV etablierten Methoden konnten erste Hinweise auf das Vorkommen dieser Viren in NRS von Kindern mit respiratorischem Infekt geben. Des Weiteren war durch die Entwicklung eines IFT für diese Viren eine Einschätzung der Seroprävalenz bei gesunden Erwachsenen möglich. Anhand bisher veröffentlichter und den in dieser Arbeit gesammelten Daten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei hBoV um ein Virus handelt, das respiratorische Krankheiten auslösen kann.

Die bisherigen Studien zu WUPyV weisen auf ein Virus hin, welches zwar in respiratorischen Proben nachweisbar ist, aber nur in seltenen Fällen eine respiratorische Erkrankung verursacht. Ob WUPyV ähnlich wie die Polyomaviren BK und JC durch Reaktivierung zu Erkrankungen unter Immunsuppression führen kann, ist bisher ungeklärt.

Zur Erforschung der in dieser Arbeit untersuchten Viren sind weitere Studien erforderlich, die sich vor allem mit der genauen Erfassung des Zeitpunktes der primären Infektion und der Frage, ob zum Zeitpunkt der Primärinfektion eine Erkrankung vorliegt, beschäftigen sollten. Für solche Studien können die in dieser Dissertation etablierten Methoden verwendet werden, um zum einen mittels der qrt-PCR den Verlauf der Viruslast und zum anderen mittels des IFT den IgM- und IgG-Antikörperverlauf zu untersuchen.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden zur Untersuchung von hBoV und WUPyV etabliert und erste Daten zu diesen Viren gesammelt. Sowohl die erhaltenen Daten als auch die etablierten Methoden können als Grundlage für weitere Studien an diesen Viren dienen, die sich der weiteren Erforschung der Pathogenität von hBoV und WUPyV widmen.

Literaturverzeichnis

- Abed, Y.et al. (2007). "WU polyomavirus in children, Canada" *Emerg.Infect.Dis.* **13**: 1939-1941.
- Ahsan, N. and Shah, K. V. (2006). "Polyomaviruses and human diseases" *Adv.Exp.Med.Biol.* **577**: 1-18.
- Allander, T. (2008). "Human bocavirus" *J.Clin.Virol.* **41**: 29-33.
- Allander, T.et al. (2007a). "Identification of a third human polyomavirus" *J.Virol.* **81**: 4130-4136.
- Allander, T.et al. (2007b). "Human bocavirus and acute wheezing in children" *Clin.Infect.Dis.* **44**: 904-910.
- Allander, T.et al. (2005). "Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples" *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**: 12891-12896.
- Anderson, L. J. (2007). "Human bocavirus: a new viral pathogen" *Clin.Infect.Dis.* **44**: 911-912.
- Aricescu, A. R.et al. (2006). "Eukaryotic expression: developments for structural proteomics" *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* **62**: 1114-1124.
- Azzi, A.et al. (1999). "Human polyomavirus BK (BKV) load and haemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation patients" *J.Clin.Virol.* **14**: 79-86.
- Campe, H.et al. (2008). "Role of Human Bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis" *J.Clin.Virol.* **43**: 340-342.
- Carmichael, L. E.et al. (1991). "Pathogenicity of minute virus of canines (MVC) for the canine fetus" *Cornell Vet.* **81**: 151-171.
- Chieochansin, T.et al. (2008). "Human bocavirus infection in children with acute gastroenteritis and healthy controls" *Jpn.J.Infect.Dis.* **61**: 479-481.
- Dalianis, T.et al. (2009). "KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: a new era for human polyomavirus research" *Semin.Cancer Biol.* **19**: 270-275.
- Doerr, H. W. (2002). "Medizinische Virologie" Georg Thieme Verlag
- Doerries, K. (2006). "Human polyomavirus JC and BK persistent infection" *Adv.Exp.Med.Biol.* **577**: 102-116.
- Drosten, C.et al. (2003). "Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome" *N.Engl.J.Med.* **348**: 1967-1976.
- Durham, P. J.et al. (1985). "Pathological and virological studies of experimental parvoviral enteritis in calves" *Res.Vet.Sci.* **38**: 209-219.

- Endo, R. et al. (2007). "Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan" *J.Clin.Microbiol.* **45**: 3218-3223.
- Fredericks, D. N. and Relman, D. A. (1996). "Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates" *Clin.Microbiol.Rev.* **9**: 18-33.
- Fryer, J. F. et al. (2007). "Frequent detection of the parvoviruses, PARV4 and PARV5, in plasma from blood donors and symptomatic individuals" *Transfusion* **47**: 1054-1061.
- Fryer, J. F. et al. (2006). "Novel parvovirus and related variant in human plasma" *Emerg.Infect.Dis.* **12**: 151-154.
- Gaynor, A. M. et al. (2007). "Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections" *PLoS.Pathog.* **3**: e64-
- Gerna, G. et al. (2007). "The human bocavirus role in acute respiratory tract infections of pediatric patients as defined by viral load quantification" *New Microbiol.* **30**: 383-392.
- Han, T. H. et al. (2007). "WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea" *Emerg.Infect.Dis.* **13**: 1766-1768.
- Heegaard, E. D. and Brown, K. E. (2002). "Human parvovirus B19" *Clin.Microbiol.Rev.* **15**: 485-505.
- Jones, M. S. et al. (2005). "New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome" *J.Virol.* **79**: 8230-8236.
- Kesebir, D. et al. (2006). "Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus" *J.Infect.Dis.* **194**: 1276-1282.
- Khalili, K. et al. (2007). "Reactivation of JC virus and development of PML in patients with multiple sclerosis" *Neurology* **68**: 985-990.
- Kirkbride, C. A. (1992). "Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths" *J.Vet.Diagn.Invest* **4**: 374-379.
- Knowles, W. A. (2006). "Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV)" *Adv.Exp.Med.Biol.* **577**: 19-45.
- Koch R. (1891). "Über bakteriologisches Forschung" *Verhandlungen des X. Internationalen Medizinischen Kongresses*
- Le, B. M. et al. (2007). "Clinical and epidemiologic characterization of WU polyomavirus infection, St. Louis, Missouri" *Emerg.Infect.Dis.* **13**: 1936-1938.
- Lindau, C. et al. (2009). "A single-tube, real-time PCR assay for detection of the two newly characterized human KI and WU polyomaviruses" *J.Clin.Virol.* **44**: 24-26.

- Lindner, J. and Modrow, S. (2008). "Human bocavirus--a novel parvovirus to infect humans" *Intervirology* **51**: 116-122.
- Modrow, S. (2003). "Molekulare Virologie" Spektrum Lehrbuch
- Norja, P. et al. (2007). "No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease" *J.Clin.Virol.* **40**: 307-311.
- Payungporn, S. et al. (2008). "Prevalence and molecular characterization of WU/KI polyomaviruses isolated from pediatric patients with respiratory disease in Thailand" *Virus Res.* **135**: 230-236.
- Ratcliff, R. M. et al. (2007). "Molecular diagnosis of medical viruses" *Curr.Issues Mol.Biol.* **9**: 87-102.
- Ren, L. et al. (2008). "WU and KI polyomavirus present in the respiratory tract of children, but not in immunocompetent adults" *J.Clin.Virol.* **43**: 330-333.
- Rivers, T. M. (1937). "Viruses and Koch's Postulates" *J.Bacteriol.* **33**: 1-12.
- Rohrer, C. et al. (2008). "Seroprevalence of parvovirus B19 in the German population" *Epidemiol.Infect.* **136**: 1564-1575.
- Soderlund, M. et al. (1995). "Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19" *J.Infect.Dis.* **172**: 1431-1436.
- Steinel, A. et al. (2001). "Parvovirus infections in wild carnivores" *J.Wildl.Dis.* **37**: 594-607.
- Tamura, K. et al. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0" *Mol.Biol.Evol.* **24**: 1596-1599.
- Tyrell, D. A. J. (1996). "Erkältungskrankheiten" Gustav Fischer Verlag
- van den Hoogen, B. G. et al. (2001). "A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease" *Nat.Med.* **7**: 719-724.
- van der, Hoek L. et al. (2004). "Identification of a new human coronavirus" *Nat.Med.* **10**: 368-373.
- van der, Hoek L. et al. (2005). "Croup is associated with the novel coronavirus NL63" *PLoS.Med.* **2**: e240-
- Vicente, D. et al. (2007). "Human bocavirus, a respiratory and enteric virus" *Emerg.Infect.Dis.* **13**: 636-637.
- Woo, P. C. et al. (2005). "Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia" *J.Virol.* **79**: 884-895.

Anhang

1. Sequenzierprimer

Für die Sequenzierung von hBoV verwendete Primerpaare

Primer	Sequenz (5´- 3´)	Gen	Position ^a	Polarität	T _a
BoV0153s	aaaaagctccacgcttg	Non-coding	153-172	+	55°C
BoV0654a	aaggacgtgtagccagaagag	NS1	654-634	-	
BoV0548s	agaaggactaagcaagaggaatgc	NS1	548-571	+	59°C
BoV1061a	gcgctgatctcctacctcagg	NS1	1061-1041	-	
BoV0959s	ctaccagcaaccctagataacg	NS1	959-981	+	59°C
BoV1560a	gtctgcagtcattaatacaaatcctt	NS1	1560-1533	-	
BoV1435s	ctgtttgcttttacggcct	NS1	1435-1454	+	59°C
BoV2034a	cactatgaggaaggaaccacc	NS1	2034-2013	-	
BoV1948s	gggtcctttgtctactcattcac	NS1	1948-1971	+	59°C
BoV2453a	cgggctcctgctcctgt	NP1	2453-2436	-	
BoV2327s	ccacgtgacgaagatgagct	NP1	2327-2346	+	59°C
BoV2970a	cagcagcagaaagcatttct	NP1	2970-2950	-	
BoV2840s	gcactttagaataactctgatttgaaa	NP1	2840-2868	+	59°C
BoV3483a	acagtatcaggtgttgcttgaat	VP1/VP2	3483-3388	-	
BoV3309s	tgctaacacaaataaaggtgcaaaa	VP1	3309-3333	+	58°C
BoV3913a	gaagatcagcatgacgtcctc	VP1/VP2	3913-3892	-	
BoV3787s	ctttcaaatggtgctgacacaac	VP1/VP2	3787-3809	+	57°C
BoV4387a	atccaaatcctgcagcacct	VP1/VP2	4387-4368	-	
BoV3885s	acaatgacctcacagctggcg	VP1/VP2	3885-3906	+	57°C
BoV4287s	cagccagcacaggcagaatt	VP1/VP2	4287-4306	-	
BoV4456a	tccaaatcctgcagcacctgtg	VP1/VP2	4456-4435	+	57°C
BoV4939a	tgcagtatgtcttcttctggacg	VP1/VP2	4939-7916	-	
BoV4843s	tgcgctccagaaagaagaca	VP1/VP2	4843-4862	+	59°C
BoV5143a	tcggctaggttcgagacgg	Non-coding	5143-5125	-	

^a Nach NCBI-GenBank Zugangsnummer DQ_000495

Für die Sequenzierung von WUPyV verwendete Primerpaare

Primer	Sequenz (5´- 3´)	Gen	Position ^a	Polarität	T _a
WU0355s	cagagacgtccttgggtcaa	Non-coding	355-375	+	53°C
WU0965a	tggatattaagtcacctccttgg	VP 2	965-942	-	
WU0823s	ggtgcaggctttagtggtatata	VP 2	823-848	+	53°C
WU1427a	gcatctcttacagctctacagcattt	VP 2 / VP 3	1427-1401	-	
WU1296s	aagaagctttagtgaggagaagac	VP 2/ VP 3	1296-1321	+	53°C
WU1897a	tgggctactaataagaccaataatgtgg	VP 1	1897-1871	-	
WU1725s	gtcaaccacaagagtgcgaag	VP1 – VP 3	1725-1746	+	53°C
WU2336a	atctgcagttatcattgcggct	VP 1	2336-2315	-	
WU2155s	gctaggacttgctccactgaa	VP 1	2155-2176	+	51°C
WU2780a	attatcctgtgtgttagtattgggc	VP 1	2780-2754	-	
WU2627s	caggttacagaggttactatgactgaaga	VP 1	2627-2655	+	51°C
WU3243a	aatggaatgagtaacttagataaattaaagagactatt	large T	3243-3207	-	
WU3092s	ggagccaaagtagcagggact	large T	3092-3112	+	53°C
WU3696a	gtgtgtcaacaggctattgatgtg	large T	3696-3673	-	
WU3558s	catcttgctcacctttaatagtttatcc	large T	3558-3586	+	51°C
WU4070a	agggatactgtactattagctttttatttgt	large T	4070-4039	-	
WU3902s	tgatctttaaactccccatataaatcct	large T	3902-3929	+	51°C
WU4506a	ataccacatatggtaccccagact	large T	4506-4482	-	
WU4341s	gtgttgctgtgaacattgtgg	large T	4341-4362	+	53°C
WU4955a	cagtgaccaactaaatgaagaaga	large / small T	4955-4931	-	
WU4850s	ccaacaagcctgtactttctaggg	small T	4850-4873	+	53°C
WU0037a	gcccacactgtcaatcatgc	Non-coding	56-37	-	
WU5146s	agttttatccatttgccttcttagc	Non-coding	5146-5172	+	53°C
WU0524a	cgagacggtagcaccaataacc	Non-coding	524-504	-	

^a Nach GenBank Zugangsnummer NC_009539

2. Publikationen

Benedikt Weissbrich, Florian Neske, Jörg Schubert, Franz Tollmann, Katharina Blath, Kerstin Blessing and Hans-Wolfgang Kreth (2006). “Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections”. **BMC Infectious Disease** 6 :109

Florian Neske, Kerstin Blessing, Franz Tollmann, Jörg Schubert, Axel Rethwilm, Hans-Wolfgang Kreth, and Benedikt Weissbrich (2007). “Real-Time PCR for Diagnosis of Human Bocavirus Infections and Phylogenetic Analysis”. **Journal of Clinical Microbiology** 45: 2116-2122

Florian Neske, Kerstin Blessing, Franziska Ullrich, Anika Pröttel, Hans-Wolfgang Kreth, and Benedikt Weissbrich (2008). “WU Polyomavirus Infection in Children, Germany”. **Emerging Infectious Disease** 4: 680-681

Florian Neske, Kerstin Blessing, Anika Pröttel, Franziska Ullrich, Hans-Wolfgang Kreth, Benedikt Weissbrich (2009). “Detection of WU polyomavirus DNA in nasopharyngeal samples, serum and stool by real-time”. **Journal of Clinical Virology** 44: 115-118

Kerstin Blessing, Florian Neske, Ulla Herre, Hans-Wolfgang Kreth, Benedikt Weissbrich (in press). “Prolonged Detection of human bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of children with respiratory tract disease”. **Pediatric Infectious Disease Journal** accepted and in press

Florian Neske, Christiane Prifert, Jörg Schubert, Barabara Scheiner, Moritz Ewald, Andreas Opitz, Benedikt Weissbrich (submitted). “High prevalence of antibodies against polyomavirus WU, polyomavirus KI, and human bocavirus in German blood donors”. **BMC Infectious Disease**; submitted

3. Tagungsbeiträge

3.1 Poster

Florian Neske, Kerstin Blessing, Jörg Schubert, Axel Rethwilm, Hans Wolfgang Kreth, Benedikt Weissbrich (2007): “Real-time PCR for human bocavirus infections”; 3rd European Congress of Virology

Florian Neske, Kerstin Blessing, Franziska Ulrich, Anika Pröttel, Hans Wolfgang Kreth, Benedikt Weissbrich (2008): “Detection of WU polyomavirus DNA in nasopharyngeal samples by real-time PCR”; 18th Annual Meeting of the Society of Virology

3.2 Vorträge

Florian Neske, Kerstin Blessing, Hans Wolfgang Kreth, Benedikt Weissbrich (2007): “Longterm detection of bocavirus in respiratory tract samples”; Clinical Virology 1st Workshop

Florian Neske, Jörg Schubert, Barbara Scheiner, Benedikt Weissbrich (2008): “Serology of polyomavirus WU and human Bocavirus”; Clinical Virology 2nd Workshop

4. Lebenslauf

Name Florian Marc Karl
Geburtsdatum 04.04.1975
Geburtsort Frankfurt/Main
Staatsangehörigkeit deutsch

Akademische Ausbildung

2005 – 2008 Promotion am Institut für Virologie und Immunbiologie unter der Betreuung von Dr. Benedikt Weißbrich und Prof. Dr. Axel Rethwilm
Thema: „Entwicklung molekularbiologischer und serologischer Methoden zum Nachweis von Infektionen mit dem humanen Bocavirus und dem Polyomavirus WU“

2004 – 2005 Diplomarbeit am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg unter der Betreuung von Dr. Knut Ohlsen und Prof. Dr. Dr. hc. mult. Jörg Hacker
Thema: „Mol. Charakterisierung einer *S. aureus* *isaA*-Deletionsmutante“

2001 – 2004 Hauptstudium der Biologie an der Universität Würzburg

1999 – 2001 Grundstudium der Biologie an der Ruprecht Karls-Universität Heidelberg

1995 – 1999 Studium der Ethnologie und Anglistik an der Ruprecht Karls-Universität Heidelberg

Schulbildung

1995 Abitur am Heinrich Heine Gymnasium, Kaiserslautern

1981 - 1985 Grundschulen, Idstein & Kaiserslautern