

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg,
Lehrstuhl für Virologie
Vorstand: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

Humane Parechovirusinfektionen bei Kindern mit respiratorischen Erkrankungen

PCR-Detektion, Klinik und Epidemiologie der Infektion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Friederike Regina Ruf
aus Aschaffenburg

Würzburg, April 2012



Referent: Professor Dr. med. A. Rethwilm

Korreferent: Professor Dr. med. J. Liese

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10. 2013

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungen

1	Einleitung	1
1.1	Respiratorische Erkrankungen im Kindesalter	1
1.2	Humane Parechoviren	2
1.2.1	Erstbeschreibung der humanen Parechoviren	2
1.2.2	Virustaxonomie	3
1.2.3	Molekularbiologie der humanen Parechoviren	5
1.2.3.1	Virusaufbau	5
1.2.3.2	Genom der humanen Parechoviren	5
1.2.3.3	Genexpression	6
1.2.4	Erstbeschreibung von weiteren hPeV-Genotypen	7
1.3	Klinische Daten zu hPeV-Infektionen	11
1.3.1	Prävalenz von hPeV-Infektionen in verschiedenen Studien	11
1.3.2	Betroffene Altersgruppen	13
1.3.3	HPeV-assoziierte Krankheitsbilder	14
1.3.4	Serologische Studien zu hPeV	20
1.3.5	Methoden zur hPeV-Diagnostik	21
1.4	Ziele dieser Studie	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Probenmaterial	24
2.2	Herstellung eines Kontroll-Plasmids	25
2.2.1	Amplifikation	25
2.2.2	Klonierung	28
2.2.3	Plasmid-DNA-Präparation	29
2.3	Parechovirus Real-Time-PCR	30
2.3.1	Primer- und Sondenauswahl	30
2.3.2	Durchführung der Real-Time-PCR	30
2.4	Typisierung der hPeV-positiven Proben	32
2.4.1	Qualitative PCR	32
2.4.2	Sequenzierung	34
2.4.2.1	Prinzip der Sequenzierung	34
2.4.2.2	Aufreinigung der PCR-Produkte	34
2.4.2.3	Ansatz der Sequenzierreaktion	35

2.4.2.4	Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte und Kapillarelektrophorese	36
2.4.3	Phylogenetische Analyse	36
2.5	Statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Validierung des Real-Time-PCR-Systems	37
3.1.1	Minimale Nachweisgrenze	37
3.1.2	Intra-Assay-Variationskoeffizient	38
3.1.3	Inter-Assay-Variationskoeffizient	38
3.2	Ergebnisse der Real-Time-PCR	39
3.2.1	Getestete Proben	39
3.2.2	Phylogenetische Analyse der hPeV-positiven Proben	40
3.3	Demographie und Saisonalität der hPeV-positiven Patienten	44
3.3.1	Altersverteilung	44
3.3.2	Geschlechterverteilung	45
3.3.3	Jahreszeitliche Verteilung	45
3.4	Koinfektionen	46
3.5	Klinik der hPeV-positiven Patienten	48
3.5.1	Symptome bei hPeV-positiven Patienten	48
3.5.2	Diagnose bei Entlassung aus der Kinderklinik	49
3.5.3	Klinik und Diagnose bezogen auf den hPeV-Genotyp	50
3.5.3.1	Klinik bei hPeV1-Infektion	50
3.5.3.2	Klinik der hPeV 3-Infektion	51
3.5.3.3	Klinik der hPeV 4-Infektion	51
3.5.3.4	Klinik der hPeV 6-Infektion	52
3.5.4	Therapie der hPeV-positiven Patienten	52
4	Diskussion	53
4.1	Vergleich der epidemiologischen Daten zur hPeV-Infektion	54
4.1.1	Prävalenz der hPeV-Infektion	54
4.1.2	hPeV-Viruslast der Proben	54
4.1.3	Alterstruktur bei hPeV-Infektion	55
4.1.4	Jahreszeitliche Verteilung	56
4.1.5	Koinfektionsrate bei hPeV-Infektion	57
4.2	Diskussion möglicher Probleme der Studie	58
4.3	Bewertung der Studienergebnisse	60

4.3.1	Klinische Relevanz von hPeV	60
4.3.2	Routinemäßige Diagnostik von hPeV	60
4.4	Weiterführende Studien zur Rolle von hPeV	61
5	Zusammenfassung	63
6	Anhang	64
7	Literaturverzeichnis	73
8	Danksagung	
9	Lebenslauf	

I. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AdV	Adenovirus
ARI	akute respiratorische Infektion
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaar
CDC	Center for Disease Control and Prevention
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CPE	Zytopathischer Effekt
Ct-Wert	Cycle threshold
CSF	Cerebro-Spinal Fluid (Liquor)
DNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EV	Echovirus
FS	Fecal Sample (Stuhlprobe)
GE	Gastroenteritis
hBoV	Humanes Bocavirus
HKU1	Humanes Coronavirus HKU1
HMPV	Humanes Metapneumovirus
hPeV	Humanes Parechovirus
HPIV	Humanes Parainfluenzavirus
ICTV	International Committee on Taxonomy for Viruses
IFA	Immunfluoreszenz Assay
LV	Ljungan Virus
NaCl	Natrium-Chlorid
NIH	National Institute of Health
NL63	Humanes Coronavirus NL63
NRS	Nasenrachensekret
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerasekettenreaktion

RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT	Reverse Transkription
SARS	severe acute respiratory Syndrom (SARS-Coronavirus)
TS	Throat swab (Rachenabstrich)
UAW	Unterer Atemwegsinfekt
UTR	untranslated region
WHO	World Health Organization
WUPyV	WU-Polyomavirus

1 Einleitung

1.1 Respiratorische Erkrankungen im Kindesalter

Respiratorische Infektionen sind einer der Hauptgründe für Erkrankungen beim Menschen. Bei Kindern sind sie der häufigste Grund einer ärztlichen Konsultation. Ihre Prävalenz ist in der Altersgruppe unter fünf Jahren doppelt so hoch wie in jeder anderen untersuchten Altersgruppe [McCormick, 1995]. Weltweit sind akute Atemwegsinfektionen (ARI) jährlich für rund 1,9 Millionen Todesfälle bei Kindern verantwortlich, hauptsächlich (ca. 70 %) in Asien und Afrika [Williams et al., 2002].

Auch in Deutschland sind ARI in ihrer Gesamtzahl für das Gesundheitssystem außerordentlich relevant. So gehen Besuche beim Kinderarzt in 20 bis 25% auf akute Atemwegsinfekte zurück, beim Allgemeinmediziner machen sie 7-10% aus (Daten aus der Arbeitsgemeinschaft Influenza, Saisonreport 2000-2001). Die Gesamtkosten von Atemwegsinfektionen bei Kindern zwischen 0 und 36 Monaten lagen 2001 in Deutschland bei etwa 213 Millionen Euro. Diese Kosten setzen sich zusammen aus direkten medizinischen Kosten sowie direkten und indirekten nicht-medizinischen Kosten (Reisekosten, Arbeitsausfall der Eltern). Die direkten medizinischen Kosten einer Episode eines ambulant behandelten Unteren Atemwegsinfekt (LRTI) betragen durchschnittlich 70 Euro, bei einem stationär behandelten Fall 2461 Euro [Ehlken et al., 2005].

Akute Atemwegsinfekte werden hauptsächlich durch virale Erreger verursacht, zu denen typischer Weise Respiratory Syncytial Virus (RSV), Influenza A und B Virus, Parainfluenza-Viren, Adenoviren, Rhinoviren und Coronaviren zählen [Tregoning and Schwarze]. Den größten Anteil der viralen Pathogene bei ARI macht in kindlichen Patientenkollektiven RSV aus [Chanock et al., 1961; Gardner, 1968; Wasem et al., 2008; Weigl et al., 2005], gefolgt von Rhinoviren [Monto and Sullivan, 1993], Adenoviren [Chiu et al., 2010] und Influenza A

[Tregoning and Schwarze, 2010]. Diese „typischen“ respiratorischen Viren scheinen über die letzten Jahre in ihrer Prävalenz, und damit auch Relevanz, für den behandelten Arzt konstant geblieben zu sein [Wasem et al., 2008]. Daher werden vor allem diese Viren in virologischen Laboren untersucht, wenn Patientenmaterial zur Diagnostik bei akutem Atemwegsinfekt eingesandt wird.

Zu den oben genannten Erregern respiratorischer Infekte kamen in den letzten Jahren verschiedene neu entdeckte Viren. Dazu zählen das humane Metapneumovirus, verschiedene Coronaviren (SARS, HKU1, NL63) und das humane Bocavirus (hBoV) [Brodzinski and Ruddy, 2009].

Die Liste der „neuen“ viralen Pathogene, die möglicherweise für respiratorische Infekte verantwortlich sind, erstreckt sich auch auf die humanen Parechoviren (hPeV). Diese zur Familie der Picornaviridae zählenden Viren wurden bereits 1961 erstmals isoliert [Wigand and Sabin, 1961] und sind damit fast genauso lange bekannt wie RSV [Chanock et al., 1957]. Mit Verbreitung der Polymerasekettenreaktion (PCR) in der Routinediagnostik werden hPeV in den letzten Jahren vermehrt nachgewiesen und immer wieder auch bei Patienten mit der Klinik eines respiratorischen Infekts gefunden.

1.2 Humane Parechoviren

1.2.1 Erstbeschreibung der humanen Parechoviren

Die Erstbeschreibung der hPeV erfolgte durch Wigand und Sabin. Sie isolierten zwei Viren während eines Ausbruchs von Sommerdiarrhoe in den USA, die zunächst als Echovirus 22 und 23 (EV 22 und 23) klassifiziert wurden [Wigand and Sabin, 1961], und später in hPeV 1 und hPeV 2 umbenannt wurden [King, 1999].

Schon im Rahmen der ersten Beschreibung fielen Unterschiede zwischen EV 22 und 23 und den bis dahin bekannten Echoviren auf.

Der zytopathische Effekt (CPE), den man bei EV 22 und 23 beobachtete, war im Vergleich zu anderen Echoviren nur am Rand der Zellkultur ausgebildet [Wigand and Sabin, 1961] und hob sich in seinem Erscheinungsbild deutlich von letzteren ab [Shaver, 1961]. Außerdem war EV 22 resistent gegen zwei bekannte Inhibitoren der Enterovirus-Synthese, namentlich Guanidin und 2(α -Hydroxybenzyl)-Benzimidazol [Tamm and Eggers, 1962]. Als Seal und Jamison 1984 eine besondere Sekundärstruktur im RNA-Genom von EV 22 feststellten, bezeichneten sie das Virus als „atypisch“ für das Genus der Echoviren [Seal and Jamison, 1984]. Eine ausführliche Studie von Coller et al. [Coller et al., 1990] zeigte ebenfalls einen langsameren und andersartigen CPE in der Zellkultur von EV 22 im Vergleich zu anderen Echoviren. Außerdem fehlte die Ausschaltung der Proteinsynthese der Wirtszelle, und es konnte keine genomische Ähnlichkeit zwischen EV 22 und anderen Enteroviren gezeigt werden. Sie bezeichneten EV 22 ebenfalls als „atypisches“ Enterovirus. Basierend auf der Tatsache, dass EV 22 und 23 sowohl Merkmale mit bekannten Picornaviren zeigten, allerdings auch eigene charakteristische Eigenschaften haben (keine Spaltung von VP0 in VP2 und VP4), schlugen Hyypä et al. 1992 [Hyypia et al., 1992] und Stanway et al. 1994 [Stanway et al., 1994] ihre Einordnung in ein neues Genus der Picornaviridae vor, denn wie auch bei HAV, welches vormals als Enterovirus definiert war, ist ihre Ähnlichkeit zu anderen sequenzierten Enteroviren gering [Hyypia et al., 1992].

Die Umbenennung von EV 22 und 23 in hPeV 1 und 2, respektive, erfolgte offiziell im siebten Report des „International Committee for the Taxonomy of Viruses“ (ICTV), 1999 [King, 1999]. Als Prototyp von hPeV 1 gilt der sogenannte „Harris“-Stamm, den Prototyp von hPeV 2 bildet der „Williamson“-Stamm.

1.2.2 Virustaxonomie

Die humanen Parechoviren gehören nach Einteilung des ICTV zu der Familie der Picornaviridae in der Ordnung der Picornavirales. Diese Ordnung wurde 2008 dem ICTV vorgeschlagen [Le Gall et al., 2008] und wird seit 2008 als

solche aufgeführt. Gemäß den Leitlinien zur Virustaxonomie des ICTV [Knowles, 2011] unterteilt sich die Familie der Picornaviridae in 12 Genera, namentlich Aphthovirus, Avihepatovirus, Cardiovirus, Enterovirus, Erbovirus, Hepatovirus, Kobuvirus, Parechovirus, Sapelovirus, Senecavirus, Teschovirus und Tremovirus. Diese Leitlinie ordnet die Rhinoviren nur noch als eine Spezies der Enteroviren ein.

Das Genus Parechovirus wird unterteilt in zwei Spezies, die hPeV und Ljungan Virus (LV). Die Mehrzahl der hPeV-Typen wurde mittels genetischer Diagnostik definiert, sie werden daher in der Folge alle als „Genotypen“ bezeichnet. Während hPeV zu den humanen Pathogenen zählt, wurde Ljungan Virus 1999 bei Rötelmäusen (*Clethrionomys glareolus*) isoliert [Niklasson et al., 1999]. Bis dato sind vier LV-Typen bekannt [Tolf et al., 2009], und obwohl LV lange nur bei Tieren beschrieben war, mehren sich die Beobachtungen, dass es eventuell in einem Zusammenhang mit intrauterinem Fruchttod beim Menschen und plötzlichem Kindstod steht [Niklasson et al., 2009; Niklasson et al., 2007].

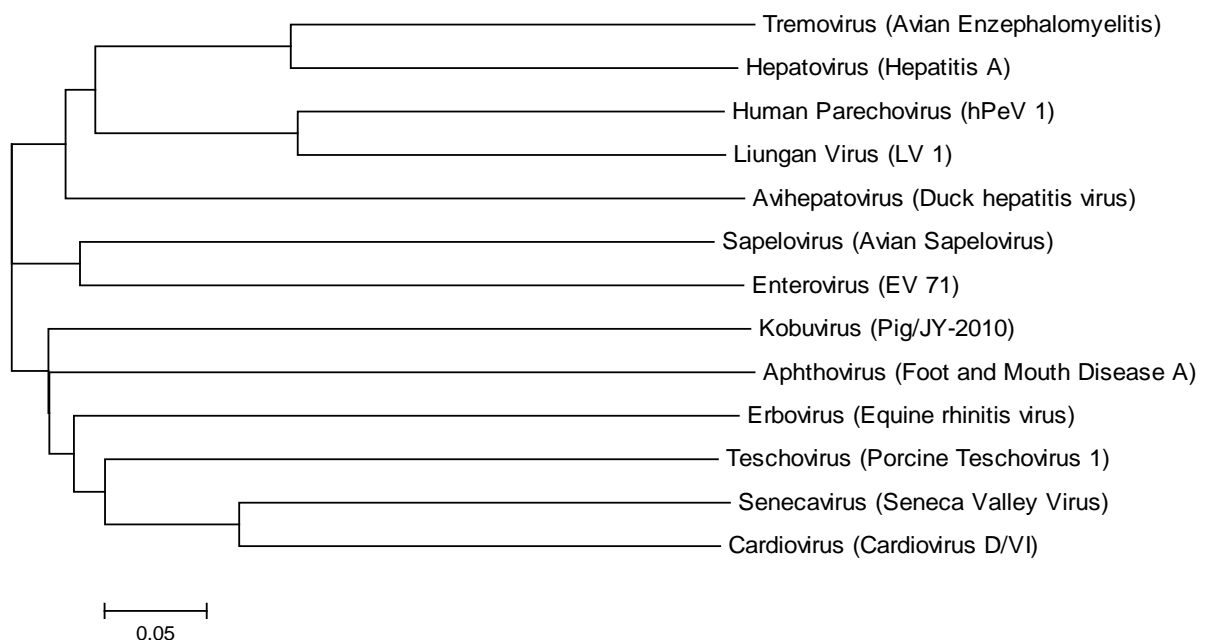


Abb. 1 Stammbaum der 12 Genera der Picornaviridae (jeweils durch eine Spezies repräsentiert) plus Ljungan Virus; der Maßstab repräsentiert 5 Nukleotid-Unterschiede pro 100 Basenpaare.

1.2.3 Molekularbiologie der humanen Parechoviren

1.2.3.1 Virusaufbau

Humane Parechoviren sind nicht umhüllte, kugelförmige Viren mit einem Durchmesser von etwa 30 nm, aufgebaut aus einer Proteinhülle, die das freiliegende RNA-Genom umgibt. Das Kapsid besteht aus einer ikosaedrischen Anordnung von 60 Protomeren, welche jeweils aus drei Polypeptiden, nämlich VP0, VP1 und VP3 bestehen. Ein viertes, inneres, Kapsidprotein (VP4) existiert im Gegensatz zu den anderen Picornaviridae nicht. Eine Darstellung des Virusaufbaus findet sich in Abb. 2.

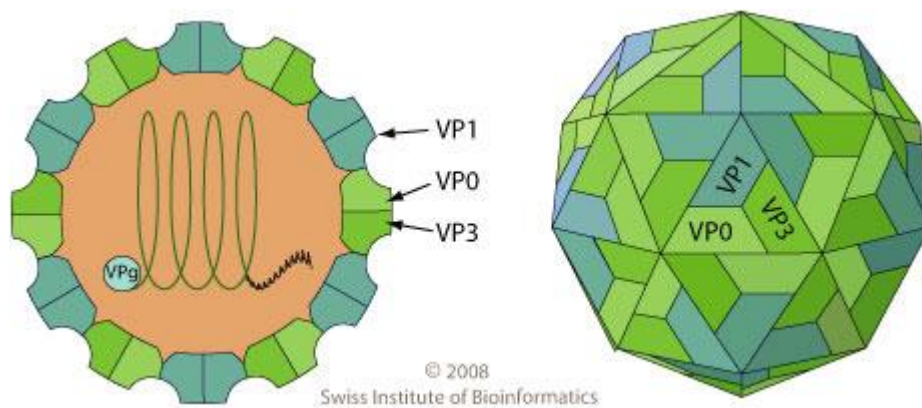


Abb. 2 Kapsidstruktur von hPeV

1.2.3.2 Genom der humanen Parechoviren

Das lineare Einzelstranggenom der hPeV [ssRNA (+)] hat eine Länge von 7,3 kb. Der Aufbau, dargestellt in Abb. 3, entspricht dem Genom der Picornaviridae. Es ist polyadenyliert und besteht aus einem einzigen open reading frame (ORF), welcher ein Polyprotein kodiert. Am 5'-Ende besitzt es das Protein VPg, welches als Protein-Primer der RNA-Synthese fungiert [Pathak et al., 2007]. Die lange, untranslatierte Region (UTR) am 5'-Ende enthält eine innere Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES).

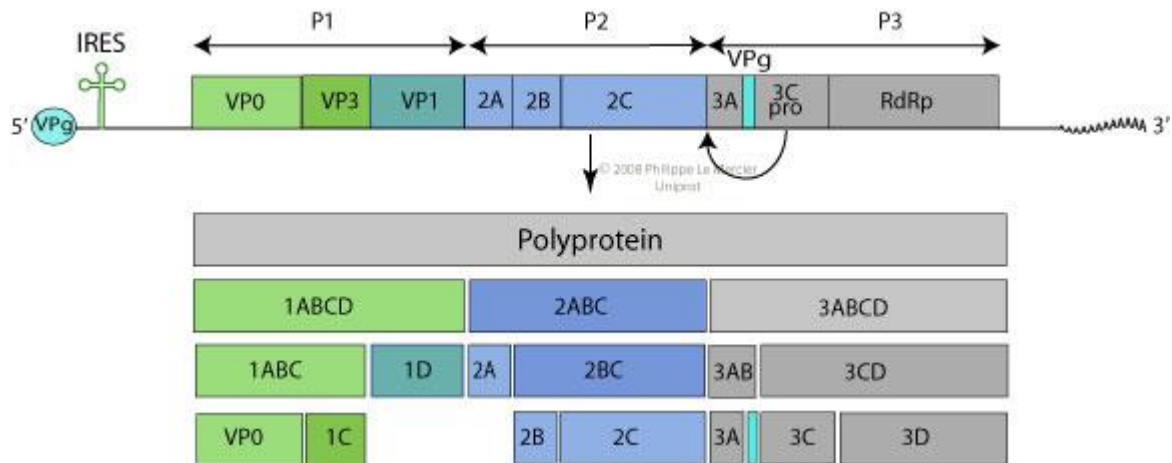


Abb. 3 Aufbau des Genoms von hPeV

Die P1-Region kodiert die Struktur-Polypeptide. Die P2- und P3-Regionen kodieren die nicht-strukturellen Proteine, welche für die Replikation notwendig sind. Die Kapsidproteine (1A, 1B, 1C und 1D), bei den Parechoviren als VP0, VP3 und VP1 bezeichnet, sind am N-terminalen Ende des Polyproteins kodiert, die nicht-strukturellen Proteine (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C und 3D) werden nachfolgend kodiert [Rueckert, 1996]. Die kürzere 3'-UTR ist wichtig für die (-)-Strang-Synthese.

1.2.3.3 Genexpression

Zwischen hPeV und den anderen Picornaviridae bestehen einige auffällige Unterschiede in der Genexpression. Bei anderen Picornaviridae werden VP4 und VP2 in Form des Vorläufers VP0 in das Partikel eingebaut, dessen Spaltung dann der letzte Schritt des Zusammenbaus des Virions ist [Rueckert, 1996]. Diese Spaltung scheint essentiell für die Stabilität und Infektiosität des Virions zu sein [Palmenberg, 1990].

Im Unterschied dazu lässt sich bei den humanen Parechoviren keine Spaltung des Kapsidproteins VP0 zu VP2 und VP4 feststellen [Hyypia et al., 1992; Stanway et al., 1994]. Daher gilt VP0 als hauptsächliches Protein der reifen Parechoviren. Im VP1-Polypeptid findet sich bei hPeV 1 ein Arginin-Glycin-Aspartat (RGD)-Motiv, dessen Rolle bei der Bindung des Virus an die Zelle in verschiedenen Spezies dokumentiert wurde [Ruoslahti and Pierschbacher,

1987]. Die Wichtigkeit des RGD-Motivs für die Infektiosität von hPeV 1 und 2 wurde mehrfach nachgewiesen [Boonyakiat et al., 2001; Ghazi et al., 1998; Stanway et al., 1994], die komplette Entfernung des Motivs führte zu nicht-infektiösen Viren [Boonyakiat et al., 2001]. Allerdings findet sich ein solches RGD-Motiv nicht in den hPeV Genotypen 3, 7, 8, 10 und 14, was die Vermutung nahe legt, dass es noch einen weiteren Eintrittsweg für hPeV in die Wirtszellen gibt [Drexler et al., 2009; Ito et al., 2004; Kim Pham et al., 2010; Li et al., 2009].

1.2.4 Erstbeschreibung von weiteren hPeV-Genotypen

Lange waren nur EV 22 und 23 als Vertreter der hPeV bekannt. Die Erstbeschreibung eines dritten Genotyps (hPeV 3) erfolgte erst 2003 in Japan [Ito et al., 2004]. Das Virus stammte von einem 1 Jahr altem Mädchen mit vorübergehender Lähmung, hohem Fieber und Diarrhoe. Die Proben (Fäzes, Rachenabstrich, Liquor und Akute-Phase-Serum) wurden während der stationären Behandlung des Kindes bereits 1999 gewonnen.

Im Jahre 2006 wurde der vierte Genotyp der Parechoviren beschrieben [Benschop et al., 2006a]. Dieser stammte aus einer Viruskultur des Stuhls eines sechs Tage alten Patienten in den Niederlanden, welcher wegen hohem Fieber und verschlechtertem Essverhalten stationär aufgenommen worden war.

Als hPeV 5 wurde 2006 ein Virus klassifiziert, welches initial aufgrund serologischer Kreuzreaktivität als hPeV 2 identifiziert worden war. Eine neue Untersuchung dieses bekannten Stamms zeigte jedoch eine hohe genetische Differenz, wodurch CT86-6760 nun als Prototyp von hPeV 5 gilt [Al-Sunaidi et al., 2007].

Im Juni 2007 wurde der sechste Genotyp der humanen Parechoviren beschrieben. Bereits im Januar 2000 wurde im Liquor eines einjährigen Mädchens, welches an einem Reye-Syndrom erkrankte und verstarb, ein Virus

detektiert. Es wurde erneut untersucht und retrospektiv als hPeV 6 typisiert [Watanabe et al., 2007].

Bei der Untersuchung von Stuhlproben von Kindern in Pakistan, welche an akuter schlaffer Lähmung (Non-Polio) litten, sowie von gesunden Kindern, welche im engen Kontakt mit einem solchen Patienten standen, wurde 2009 der Prototyp von hPeV 7 identifiziert. Das Virus wurde bei einem gesunden, 2 Jahre altem Jungen detektiert, welcher zuvor Kontakt zu einem Patienten mit akuter schlaffer Lähmung (Non-Polio) hatte [Li et al., 2009].

Der Prototyp des achten Parechovirus (hPeV 8) wurde 2009 in Brasilien isoliert. Im Rahmen einer groß angelegten Untersuchung des Stuhls von Kindern mit Enteritis auf mögliche neue humane Parechoviren wurde ein bislang unbekanntes Virus detektiert und als hPeV 8 definiert [Drexler et al., 2009].

Die jüngste Isolierung eines neuen hPeV-Genotyps erfolgte 2009 in Sri Lanka [Kim Pham et al., 2010]. Es wurden im Rahmen der Studie Stuhlproben von Kindern mit akuter Gastroenteritis auf hPeV untersucht. Zwei dabei isolierte Virussequenzen (LK-106 und LK-103) wurden durch die Picornavirus Study Group dem Prototypen von hPeV 10 zugeordnet. Als Prototyp gilt dabei der Stamm BAN2004-10903 (M.S. Oberste et al., Gensequenz dazu noch nicht veröffentlicht, Vormerkung auf www.Picornaviridae.com/parechovirus/hpev/hpev.htm [Oberste et al., 1998]).

Insgesamt gibt es derzeit zehn identifizierte hPeV-Genotypen. Die Genotypen hPeV 1-8 und 10 wie oben beschrieben, sowie den Genotyp 14, zu dem bislang keine klinischen Angaben veröffentlicht sind [Benschop et al., 2008b]. Ihren genetischen Stammbaum zeigt Abb. 4.

Unter www.Picornaviridae.com/parechovirus/hpev/hpev.htm sind außerdem die Genotypen hPeV 9-13 vorgemerkt, die Daten von Oberste et al. dazu sind

momentan noch nicht veröffentlicht. Einen tabellarischen Überblick über die Erstveröffentlichungen aller bislang bekannten hPeV-Stämme zeigt Tabelle 1.

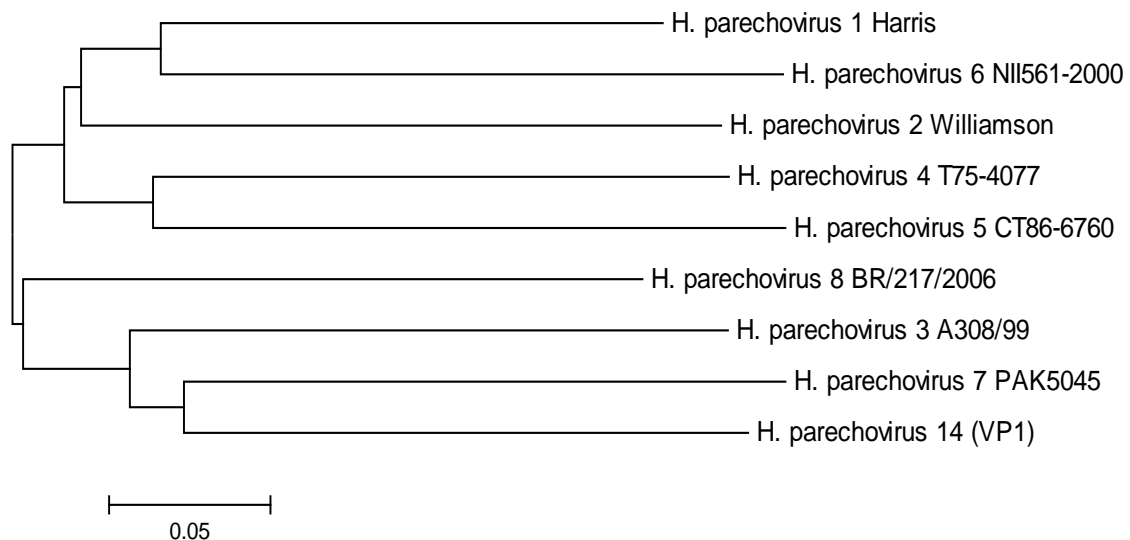


Abb. 4 Stammbaum der Genotypen hPeV 1-8 und 14; der Maßstab repräsentiert 5 Nukleotid-Unterschiede pro 100 Basenpaare.

Nach der Erstbeschreibung von EV 22 und 23 [Wigand and Sabin, 1961] dauerte es über vierzig Jahre, bis ein weiterer Genotyp der hPeV entdeckt wurde [Ito et al., 2004]. Nach der Isolierung von hPeV 3 dauerte es dann allerdings nur noch fünf Jahre, bis insgesamt 14 hPeV-Genotypen bekannt waren. Ob es sich bei den humanen Parechoviren um ein verhältnismäßig junges Virus handelt, welches im Laufe der letzten Jahre durch vermehrte Mutationen eine starke Evolution durchlaufen hat, untersuchten Faria et al. [Faria et al., 2009]. Sie ordneten die Evolution der hPeV wie folgt ein: Die erste Abweichung vom neuesten (most recent) gemeinsamen Vorfahren der untersuchten hPeV-Stämme fand sich um das Jahr 1600, neuere Verzweigungen von hPeV 3 zu hPeV 7 fanden vor ca. 150 Jahren statt. Die Autoren zeigten damit einen Beginn der genetischen Diversität der heute zirkulierende hPeV-Stämme vor rund vier Jahrhunderten. Somit sind die raschen Entdeckungen neuer Viren wohl auf die Veränderung und Verbesserung der technischen Mittel zum Virusnachweis zurückzuführen.

Autor	Jahr der Publikation	Land	Genotyp	Klinik	GenBank - Nummer	Publikation
Wigand, R. Sabin, A.B.	1961	USA	EV 22 (hPeV 1)	Sommerdiarrhoe	S45208	[Wigand and Sabin, 1961]
Wigand, R. Sabin, A.B.	1961	USA	EV 23 (hPeV 2)	Sommerdiarrhoe	AJ005695	[Wigand and Sabin, 1961]
Ito, M.	2003	Japan	hPeV 3	1-jähriges Mädchen mit vorübergehender Lähmung	AB084913	[Ito et al., 2004]
Benschop, K.S.	2006	Niederlande	hPeV 4	6 Tage altes Neugeborenes mit Fieber	AM235750	[Benschop et al., 2006a]
Al-Sunaidi, M.	2006	USA	hPeV 5	Hohes Fieber	AF055846	[Al-Sunaidi et al., 2007]
Watanabe, K.	2007	Japan	hPeV 6	1-Jährige mit Reye-Syndrom	AB252582	[Watanabe et al., 2007]
Linlin, L.	2009	Pakistan	hPeV 7	Gesundes Kind	EU556224	[Li et al., 2009]
Drexler, J.-F.	2009	Brasilien	hPeV 8	Gastroenteritis	EU716175	[Drexler et al., 2009]
Oberste et al.			Vorgemerkt: hPeV 9,11-13	Bisher keine veröffentlichten klinischen Daten	hPeV-9 BAN2004-10902, hPeV-11 BAN2004-10905, hPeV-12 BAN2004-10904, hPeV-13 BAN2005-10901	[Oberste et al., 1998]
Kim Pham, N.T.	2009	Sri Lanka	hPeV 10	Gastroenteritis	BAN2004-10903	[Kim Pham et al., 2010]
Benschop, K.	2008	Niederlande	hPeV 14	Keine klinischen Daten veröffentlicht	FJ373179	[Benschop et al., 2008b]

Tabelle 1 Erstbeschreibungen der hPeV-Genotypen und GenBank Nummern

1.3 Klinische Daten zu hPeV-Infektionen

1.3.1 Prävalenz von hPeV-Infektionen in verschiedenen Studien

Zur Frage der Prävalenz von Parechovirusinfektionen wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien durchgeführt. Alle Studien mit einem ausreichend großen Patientenkollektiv und Untersuchungszeitraum finden sich in Tabelle 27 im Anhang.

Einen Gesamtüberblick erlaubt der Enterovirus Surveillance Report [Khetsuriani, 2005], welcher den Zeitraum von 1970 bis 2005 betrachtet. Innerhalb dieser Jahre wurden auf freiwilliger Basis von Laboren in den USA insgesamt 52 812 Enterovirus-Isolierungen gezählt. Hiervon sind 880 Proben dem Genus hPeV 1 zuzuordnen. Dies entspricht 1,8% aller isolierten Enteroviren mit bekanntem Genotyp (n= 49 637). Im Gegensatz dazu wurde hPeV 2 sehr viel seltener isoliert, nur 60-mal im Untersuchungszeitraum. Die Prävalenz von hPeV 2 betrug 0,1%. Andere hPeV-Genotypen wurden in dem Report nicht nachgewiesen, die Gesamtprävalenz von hPeV 1 und 2 lag bei 1,89% aller typisierten Proben.

Eine Untersuchung aus dem Jahre 1998 von Joki-Korpela in Finnland [Joki-Korpela and Hyypia, 1998] studierte die Anwesenheit von hPeV 1 in Stuhlproben bei Kindern unter 5,5 Jahren. Aus insgesamt 578 Proben, die zwischen Januar 1991 und Februar 1992 gesammelt wurden, wurden 140 Proben mit Verdacht auf hPeV-Infektion untersucht. Hiervon waren vier Proben hPeV 1-positiv (Prävalenz 2,86%).

Eine retrospektive Studie, welche über einen Zeitraum von 12 Jahren die viralen Infektionen einer neonatalen Intensivstation untersuchte [Verboon-Maciolek et al., 2005], isolierte aus 5396 eingegangenen Proben (Liquor und Rachenabstriche) 51 mal einen viralen Erreger (1%). Davon wurden zwei Isolate als hPeV 1 typisiert (0,04% aller Proben, bzw. 3,9% der viralen Erreger).

Interessante Resultate brachte eine prospektive, longitudinale Studie zur Untersuchung von hPeV in den Stuhlproben von 102 norwegischen Kindern [Tapia et al., 2008]. Dabei wurde die Verbreitung von hPeV Infektionen in einer gesunden Population untersucht, insgesamt 1941 Stuhlproben. Hiervon waren 220 Proben positiv für hPeV (Prävalenz 11,3%), die Mehrzahl davon (76%) wurde als hPeV 1 typisiert. Bis zum Alter von zwölf Monaten hatten 43% der Kinder ein hPeV-Infektion erlebt, bis zum zweiten Lebensjahr 86%, und bis zum Alter von 3 Jahren hatten 94% der untersuchten Kinder mindestens eine hPeV-Infektion durchgemacht.

Im Zeitraum von 2000 bis 2007 in den Niederlanden gesammeltes Material (Stuhlproben, Liquor, Rachenabstriche, NRS) wurde retrospektiv auf das Vorliegen von hPeV untersucht [van der Sanden et al., 2008]. Aus insgesamt 1344 Proben wurden in Zellkultur 1076 Enteroviren isoliert, 248 Proben waren zuvor nicht typisiert worden. Davon wurden 163 Proben welche in der Zellkultur einen CPE in ähnlich dem von Enteroviren zeigten, jedoch negativen Testergebnis in der Enterovirus-PCR ausgewählt und typisiert. 155 (95%) dieser Proben ließen sich als hPeV identifizieren (Gesamtprävalenz 11,53%).

Ein weiteres Beispiel ist die Studie von Benschop et al. aus den Niederlanden [Benschop et al., 2008b]. Der Studienzeitraum umfasst die Jahre 2004 bis 2006, untersucht wurden 1824 Stuhlproben von 1379 Patienten im Alter unter fünf Jahren. Die Gesamtprävalenz von hPeV in den Proben beträgt 16,3% (270 hPeV-positive Proben von 225 Kindern).

Zusammenfassend zeigt sich in der Auswertung der 23 berücksichtigten Studien (Tabelle 27 aus dem Anhang) eine durchschnittliche Prävalenz für hPeV in verschiedenen Materialien (Stuhlproben, Liquor, Rachenabstriche, NRS) von 6,45%. Die höchste Prävalenz ermittelte die Publikation um Shan et al. [Shan et al., 2009] mit 20,5%, die geringste wurde in der retrospektiven Untersuchung von Verboon-Maciolet et al. [Verboon-Maciolet et al., 2005] mit 0,04% beschrieben. Die großen Unterschiede in der Prävalenz sind in

Zusammenhang mit den unterschiedlichen angewendeten Nachweisverfahren sowie des Probenmaterials zu sehen. Hohe Prävalenzzahlen ließen sich jeweils bei der Untersuchung von Stuhlproben identifizieren.

1.3.2 Betroffene Altersgruppen

Bis auf wenige Einzelfälle werden hPeV-Infektionen regelmäßig aus Probenmaterial von Kindern isoliert, die jünger als fünf Jahre sind. Es zeigen sich aber Unterschiede in den betroffenen Altersgruppen, wenn man die verschiedenen hPeV Genotypen getrennt betrachtet, vor allem hPeV 1 und hPeV 3.

Die Studien von Joki-Korpela und Takao [Joki-Korpela and Hyypia, 1998; Takao et al., 2001] detektierten alle ihrer 18 hPeV 1-Isolate bei Kindern unter zwei Jahren. In den Niederlanden fand Benschop [Benschop et al., 2006b] einen Altersdurchschnitt bei hPeV 1-Infektion von 6,6 Monaten, und van der Sanden [van der Sanden et al., 2008] einen Durchschnitt von 9,2 Monaten. Der Enterovirus Surveillance Report [Khetsuriani, 2005] bestätigt diese Funde, denn 95% der Patienten mit einer hPeV 1-Infektion waren jünger als 5 Jahre, 73% sogar unter einem Jahr. Diese Altersstruktur wird von allen weiteren Studien bestätigt.

Auch hPeV 2 wurde im Enterovirus Surveillance Report [Khetsuriani, 2005] hauptsächlich bei Kindern unter fünf Jahren gefunden (88% der Kinder, n = 53), 68% waren unter einem Jahr alt (n = 41).

Im Vergleich dazu ist eine hPeV 3-Infektion in den meisten Fällen mit einem noch geringeren Alter der Patienten verbunden. So sind bei Benschop die 10 Patienten mit hPeV 3 im Durchschnitt 1,3 Monate alt [Benschop et al., 2006b], in einer Untersuchung von van der Sanden sind 84 hPeV 3-Patienten durchschnittlich 1,9 Monate alt [van der Sanden et al., 2008]. Dies zeigt auch eine weitere Studie von Benschop [Benschop et al., 2008b]: 66% der untersuchten Patienten mit hPeV 3 waren unter sechs Monate alt, 27% sogar

Neugeborene. Bei einem Ausbruch von hPeV 3 in Japan [Yamamoto et al., 2009] waren alle der 40 Kinder jünger als drei Monate.

Über die weiteren Genotypen sind nur Einzelberichte zu finden. So wird von einem hPeV 4-Patienten mit vier Monaten [de Vries et al., 2008] und einem mit 5 Jahren [Watanabe et al., 2007] berichtet. HPeV 5 wurde bei einem 10 Tage alten Kind gefunden [de Vries et al., 2008]. Bei hPeV 6-Nachweis waren 82% der Kinder unter fünf Jahren (n = 14), beziehungsweise zu 65% unter zwei Jahren (n = 11) [Baumgarte et al., 2008; Harvala et al., 2009; Harvala et al., 2008; Watanabe et al., 2007]. Der Genotyp hPeV 7 wurde von einem zweijährigen Jungen isoliert [Li et al., 2009]. Für den Genotypen hPeV 8 sind keine genauen Altersangaben veröffentlicht, aus der Studie geht nur hervor, dass er von einem Kind unter sechs Jahren stammt [Drexler et al., 2009]. Zu hPeV 10 sind keine Altersangaben vorhanden.

1.3.3 HPeV-assoziierte Krankheitsbilder

Dem am häufigsten isolierten Genotyp hPeV 1 wird eine Reihe verschiedener Krankheitsbilder zugeordnet. Einen Überblick gibt Tabelle 2. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass hPeV 1 am häufigsten mit gastrointestinalen Symptomen wie Erbrechen und Diarrhoe assoziiert wird, gefolgt von respiratorischen Symptomen.

Infektionen mit hPeV 2 werden insgesamt sehr selten beobachtet, und die Anzahl an Studien, welche die assoziierte Klinik betrachten, ist gering. Im Rahmen der Erstbeschreibung [Wigand and Sabin, 1961] wurde hPeV 2 aus Rektalabstrichen von Kindern während eines Ausbruchs von Sommerdiarrhoe isoliert. Eine schwedische Studie, welche retrospektiv den Zeitraum von 1953 bis 1990 überschaute [Ehrnst and Eriksson, 1996], konnte lediglich 5 hPeV 2-Isolate beschreiben. Die Klinik bestand in vier Fällen aus gastrointestinalen Symptomen und einem respiratorischen Infekt. Der Enterovirus Surveillance Report [Khetsuriani, 2005] dokumentiert 60 hPeV 2-Detektionen von 1970 bis

2005 hauptsächlich aus respiratorischem Material. Über die klinischen Symptome ist nur vermerkt, dass sie den Symptomen von hPeV 1 entsprechen (siehe oben). Zuletzt befasste sich 2006 eine kanadische Studie [Abed and Boivin, 2006] mit der Klinik von hPeV 2-Infektionen. Die drei dabei untersuchten hPeV 2-Isolate stammten alle von Patienten, welche mit Sepsis oder Virämie aufgenommen worden waren. Retrospektiv müssen aber wahrscheinlich zwei dieser Isolate hPeV 5 zugeordnet werden, da sie CT86 6760 genetisch sehr ähnlich sind, dem Stamm, welcher 2007 als Prototyp von hPeV 5 definiert wurde [Al-Sunaidi et al., 2007].

Eine Aussage über das assoziierte Krankheitsbild ist bei Infektionen mit hPeV 3 besser möglich. Seit seiner Beschreibung 2004 [Ito et al., 2004] bei einem Mädchen mit vorübergehender Lähmung fällt eine gehäufte Verbindung des Genotyps mit Infektionen des Zentralen Nervensystems auf. Vor allem in Studien, die hPeV 3 aus Liquorproben isolieren, treten Krankheitsbilder wie Sepsis, Fieber und zentralnervöse Erscheinungen vermehrt auf. Als möglicher Grund für diese andersartige Klinik, im Vergleich zu weiteren hPeV-Genotypen, wird das Fehlen des RGD-Motivs erwogen [Benschop et al., 2008c]. Eine genaue Auflistung der Publikationen, die sich mit den klinischen Symptomen im Zusammenhang mit hPeV 3 befassen, findet sich in Tabelle 3.

Bislang existieren nur wenige hPeV 4-Isolate. Die klinischen Symptome der betroffenen Patienten umfassen akute Gastroenteritis, Lymphadenitis, hohes Fieber, Herpangina, Bewusstlosigkeit sowie respiratorische Symptome. Weitere Details zu hPeV 4-Infektionen finden sich in Tabelle 4.

Land	Patienten	Klinische Hauptsymptome	Publikation
USA	3	Diarrhoe	[Wigand and Sabin, 1961]
WHO-Daten	581	Gastroenteritis, respiratorische, neurologische, kardiale Symptome	[Grist et al., 1978]
Jamaika	3	Akute schlaffe Lähmung, aseptische Meningitis	[Figuroa et al., 1989]
Finnland	4	Gastroenteritis, respiratorische Infektionen	[Joki-Korpela and Hyypia, 1998]
Israel	19	Gastroenteritis, nekrotisierende Enterokolitis	[Birenbaum et al., 1997]
Schweden	109	Gastroenteritis, Atemwegsinfekte, Lymphadenopathie, Myokarditis	[Ehrnst and Eriksson, 1993]
Niederlande	2	Sepsis-like illness mit gastrointestinalen Symptomen, Hepatitis	[Verboon-Maciolek et al., 2005]
Japan	14	Oberer und unterer Atemwegsinfekt mit Fieber, Gastroenteritis (2)	[Takao et al., 2001]
Frankreich	1	Enzephalitis	[Legay et al., 2002]
USA	880	Atemwegsinfekte, Aseptische Meningitis, Enzephalomyelitis, akute schlaffe Lähmung, Neonatale Sepsis mit nekrotisierender Enterokolitis	[Khetsuriani, 2005]
Kanada	20	Bronchiolitis, Pneumonie, Otitis media acuta, Enteritis	[Abed and Boivin, 2006]
Niederlande	27	Milde Gastroenteritis, Atemwegserkrankungen	[Benschop et al., 2006b]
Japan	14	Gastroenteritis, Bronchitis, Oberer Atemwegsinfekt	[Watanabe et al., 2007]
Finnland	36	Otitis media (50%), Husten, Erkältung	[Tauriainen et al., 2008]
Deutschland	8	Ambulant erworbene Gastroenteritis, asymptomatische Patienten	[Baumgarte et al., 2008]
Niederlande	55	Gastroenteritis (Erbrechen, Diarrhoe)	[van der Sanden et al., 2008]
England	25	Respiratorische Symptome	[Harvala et al., 2008]
Brasilien	7	Akute Diarrhoe	[Drexler et al., 2009]
Sri Lanka	7	Gastroenteritis	[Kim Pham et al., 2010]
USA	18	Virusisolation bei überraschend verstorbenen Kindern < 24 Monaten	[Sedmak et al., 2010]

Tabelle 2 Gesammelte Symptome bei hPeV 1-Infektionen

Land	Patienten	Klinische Hauptsymptome	Publikation
Japan	1	Vorübergehende Lähmung	[Ito et al., 2004]
Kanada	3	Fieber, Virämie, Exanthem, oberer Atemwegsinfekt	[Boivin et al., 2005]
Kanada	5	Sepsis, Virämie	[Abed and Boivin, 2006]
Niederlande	10	Sepsis-like illness, ZNS-Symptome, gastrointestinale Symptome	[Benschop et al., 2006b]
Japan	16	Exanthem, Aseptische Meningitis, oberer Atemwegsinfekt, Myositis	[Watanabe et al., 2007]
Norwegen	29	Keine hPeV spezifischen Symptome	[Tapia et al., 2008]
Niederlande	89	Meningitis, Virämie, Fieber	[van der Sanden et al., 2008]
Niederlande	8	Enzephalitis, cerebrale Hirnsubstanzdefekte bei Neugeborenen	[Verboon-Maciolek et al., 2008]
England	35	Sepsis, Fieber, v.a. bei Isolation aus dem Liquor	[Harvala et al., 2009]
USA	2	Meningoenzephalitis, Hepato-Koagulabilitäts-Syndrom	[Levorson et al., 2009]
Thailand	2	Akute Gastroenteritis	[Pham et al., 2009]
Japan	40	Fieber, Gastroenteritis, oberer Atemwegsinfekt	[Yamamoto et al., 2009]
USA	3	An SIDS verstorbene Kinder, zuvor URTI und Fieber	[Sedmak et al., 2010]

Tabelle 3 Gesammelte Symptome bei hPeV 3-Infektionen

Land	Patienten	Klinische Hauptsymptome	Publikation
Niederlande	1	Hohes Fieber	[Benschop et al., 2006a]
Niederlande	1	Erbrechen, Bewusstlosigkeit	[de Vries et al., 2008]
Japan	2	Herpangina, akute Gastroenteritis	[Wakatsuki et al., 2008]
Taiwan	1	Bronchopneumonie	[Chen et al., 2009]
Japan	1	Lymphadenitis	[Watanabe et al., 2007]
Niederlande	20	Gastrointestinale und respiratorische Symptome	[Pajkrt et al., 2009]
Thailand	1	Akute Gastroenteritis	[Pham et al., 2009]
Sri Lanka	4	Gastroenteritis	[Kim Pham et al., 2010]

Tabelle 4 Gesammelte Symptome der hPeV 4-Infektionen

Nach der Reklassifizierung [Al-Sunaidi et al., 2007] des Stamms CT86-6760 von hPeV 2 zu hPeV 5 wurde dieser Genotyp in mehreren Studien nachgewiesen, die Gesamtzahl ist bislang allerdings gering (n = 17). Zu den klinischen Diagnosen zählen Fieber, gastrointestinale Symptome sowie akute schlaffe Lähmung und Late-Onset Sepsis (Tabelle 5).

Der erste Nachweis des Genotyps hPeV 6 erfolgte in Japan aus einer Liquorprobe eines Mädchens, welches an einem Reye Syndrom verstorben war [Watanabe et al., 2007]. In der selben Publikation werden neun weitere Patienten mit hPeV 6 Infektion beschrieben, zu den Hauptsymptomen zählen hierbei Gastroenteritis (fünf Fälle), Exanthem, schlaffe Lähmung und oberer Atemwegsinfekt. In zwei weiteren Fällen [Baumgarte et al., 2008, Drexler, 2009] fand sich hPeV 6 bei Kindern mit akuter Gastroenteritis sowie bei zwei Kindern mit akuter schlaffer Lähmung [Li et al., 2009]. Die Sammlung der bislang bekannten hPeV 6-Fälle findet sich in Tabelle 6.

Land	Patienten	Klinische Hauptsymptome	Publikation
USA	1	Hohes Fieber	[Al-Sunaidi et al., 2007; Oberste et al., 1998]
Niederlande	8	Gastrointestinale Symptome, Fieber, Exanthem	[van der Sanden et al., 2008]
Niederlande	1	Fieber, Late-onset Sepsis	[de Vries et al., 2008]
Brasilien	2	Akute Diarrhoe	[Drexler et al., 2009]
Pakistan	1	Akute schlaffe Lähmung	[Li et al., 2009]
Niederlande	6	Gastrointestinale und respiratorische Symptome	[Pajkrt et al., 2009]

Tabelle 5 Gesammelte Symptome bei hPeV 5-Infektionen

Land	Patienten	Klinische Hauptsymptome	Publikation
Japan	10	Gastroenteritis, Reye Syndrom, schlaffe Lähmung Exanthem, Unterer Atemwegsinfekt	[Watanabe et al., 2007]
Deutschland	1	Akute Enteritis (Erbrechen, Diarrhoe)	[Baumgarte et al., 2008]
Niederlande	1	Fieber, Otitis media	[de Vries et al., 2008]
England	8	Keine spezifischen Symptome	[Harvala et al., 2008]
Norwegen	20	Keine spezifischen Symptome	[Tapia et al., 2008]
Brasilien	1	Akute Diarrhoe	[Drexler et al., 2009]
Pakistan	2	Akute schlaffe Lähmung	[Li et al., 2009]
Niederlande	5	Gastrointestinale und respiratorische Symptome	[Pajkrt et al., 2009]

Tabelle 6 Gesammelte Symptome bei hPeV 6-Infektionen

Zu hPeV 7 existiert bisher nur die Publikation zu dessen Erstbeschreibung. Hierbei wurde der Genotyp bei einem gesunden Kind isoliert, welches lediglich in engem Kontakt zu einem Patienten mit akuter schlaffer Lähmung (Non-Polio) stand [Li et al., 2009].

Ebenso ist bisher nur ein hPeV 8 Isolat beschrieben, es stammt aus einer Stuhlprobe eines Kindes mit akuter Gastroenteritis [Drexler et al., 2009]. Die Autoren der Erstbeschreibung von hPeV 10 konnten diesen Genotypen aus dem Stuhl zweier Kinder mit akuter Gastroenteritis isolieren [Kim Pham et al., 2010].

Über die Klinik der schon vorgemerkten Genotypen hPeV 9 und 11-14 ist derzeit nichts bekannt.

Nicht jede Infektion mit humanen Parechoviren führt zu einer manifesten Erkrankung. In der prospektiven Studie von Tapia et al. [Tapia et al., 2008] wurde ein Kollektiv von 102 Kindern untersucht, von welchen monatlich eine Stuhlprobe durch die Eltern eingesandt wurde. Zusätzlich wurden auf einem Fragebogen die Symptome des Kindes dokumentiert. Im Vergleich der Monate, in denen eine Stuhlprobe positiv für hPeV war, zu den Monaten mit negativem Ergebnis ließen sich keine hPeV-spezifischen Symptome identifizieren. So kamen Erkältungskrankheiten in 13,2% der hPeV positiven Monate vor, im Vergleich zu 11,2% in negativen Monaten. Ebenso ließen sich für die Symptome Fieber und Diarrhoe keine statistisch signifikanten Unterschiede festhalten. Das Gleiche berichtet eine Studie um Harvala et al. [Harvala et al., 2008], in welcher NRS und Rachenabstriche von 2220 Patienten auf virale Erreger untersucht wurden. Die 33 isolierten hPeV (25 x hPeV 1, 8 x hPeV 6) zeigten keine für diese Infektion spezifischen klinischen Symptome, auffällig war jedoch die hohe Koinfektionsrate mit anderen respiratorischen Viren, welche möglicherweise für die Häufigkeit der berichteten respiratorischen Symptome verantwortlich waren.

1.3.4 Serologische Studien zu hPeV

In zwei serologischen Studien wurden bisher die Antikörperraten gegen hPeV in der Gesamtbevölkerung untersucht.

Die finnische Studiengruppe um Joki-Korpela et al. [Joki-Korpela and Hyypia, 1998] untersuchte insgesamt 110 Serumproben von Patienten im Alter zwischen einem Tag und 64 Jahren. Hierbei fanden sich bei 20 der 21 Neugeborenen (95%) neutralisierende Antikörper gegen hPeV 1. Im Alter zwischen zwei und zwölf Monaten hatten nur zwei von zehn Kindern Antikörper, die Anzahl stieg allerdings mit dem Alter, und Kinder über einem Jahr hatten zu 91% neutralisierende Antikörper. Erwachsene zeigten in 97% Antikörper gegen hPeV 1.

Im Rahmen der Erstbeschreibung von hPeV 3 untersuchten Ito et al. [Ito et al., 2004] die Antikörpertiter gegen hPeV 3 in Japan. Sie werteten insgesamt 207 Blutproben aus und fanden ebenfalls die geringsten Antikörpertiter im Alter zwischen sieben Monaten und einem Jahr (15%), mit raschem Anstieg des Titers bis zum sechsten Lebensjahr auf 85%. Die höchste Rate der seropositiven Proben mit 91,3% fand sich in der Altersgruppe von 15-19 Jahren und war im Alter von über 40 Jahren noch annähernd stabil (87%).

1.3.5 Methoden zur hPeV-Diagnostik

Die Diagnostik von humanen Parechovirusinfektionen erfolgte anfangs mittels Anzucht der Viren in einer Zellkultur und anschließender Neutralisationstestung. Allerdings ist dieses Vorgehen mit mehreren Problemen behaftet. Zum Einen ist es mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden, da die Anzucht der Viren mehrere Wochen dauern kann [Abed and Boivin, 2006; Boivin et al., 2005]. Zum Anderen wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt, dass hPeV ausschließlich in Kulturen von Zellen mit Affen-Ursprung (simian origin), wie Vero-Zellen, tMK oder LLC-Mk2-Zellen wachsen [Benschop et al., 2006a; de Vries et al., 2008; van der Sanden et al., 2008]. Des Weiteren ist nur eine begrenzte Auswahl von Antiseren für die Neutralisationstestung vorhanden. Vor allem für kürzlich isolierte Parechoviren sind diese nicht in jedem Labor präsent. Diese Faktoren führen wahrscheinlich dazu, dass hPeV-Infektionen übersehen werden.

Um diese diagnostische Lücke zu schließen, wurden in den letzten zehn Jahren vermehrt molekulargenetische Methoden, wie die Polymerasekettenreaktion (PCR), angewandt, um hPeV schnell und zuverlässig diagnostizieren zu können. Da humane Parechoviren durch eine reguläre Enterovirus-PCR nicht erfasst werden, mussten eigene Primer und PCR-Programme etabliert werden.

Die erste PCR zur Detektion von hPeV 1 und 2 wurde 1998 von Joki-Korpela et al. [Joki-Korpela and Hyypia, 1998] entwickelt. Ihre Primer ev22 (+) und ev22 (-) liegen in der konservierten Region der 5'-UTR. Corless et al. entwickelten eine Zwei-Schritt Real-Time-Reverse-Transkriptase (RT)-PCR mit Primern ebenfalls in der 5'-UTR. Sie konnten damit eine Zunahme der Sensitivität gegenüber Zellkultur um zwei Zehnerpotenzen erreichen [Corless et al., 2002]. Benschop et al. konzipierten eine PCR zur Detektion von hPeV 1-3. Sie legten die Primer hierzu in die VP1-Region des Genoms und amplifizierten so ein 760 bp langes Fragment [Benschop et al., 2006b]. Um die Genotypen hPeV 1-6 zu detektieren, wurden mittlerweile verschiedene Real-Time-PCR-Systeme entwickelt [Baumgarte et al., 2008; Benschop et al., 2008a; Benschop et al., 2006a; Nix et al., 2008; Noordhoek et al., 2008]. Die vom Center of Disease Control konstruierte Real-Time-PCR [Nix et al., 2008] kann gleichzeitig auch das Ljungan Virus identifizieren.

Die meisten Studien konzentrieren sich bei den Primern zur Detektion von hPeV auf die konservierte 5'-UTR. Die Sequenzierung zur Identifikation der Genotypen erfolgt vor allem in der VP1-Region.

In vielen Studien, die zur wissenschaftlichen Untersuchung von hPeV-Infektionen durchgeführt wurden, geht der Real-Time-PCR eine Zellkultur voraus. Nur Material, das darin den typischen CPE erzielte oder nicht neutralisiert werden konnte, wurde anschließend molekulargenetisch analysiert. Eine Tabelle der Untersuchungsmethoden, Primern und Proben findet sich im Anhang (Tabelle 29).

1.4 Ziele dieser Studie

Zum Beginn dieser Arbeit existierte keine Studie, welche die Epidemiologie und Klinik von hPeV-Infektionen in Deutschland untersucht hatte.

Ziel der vorliegenden Studie war festzustellen, inwiefern Infektionen mit humanen Parechoviren in einem Zusammenhang mit akuten Atemwegsinfekten bei Kindern stehen. Hierzu sollte ein Real-Time-PCR-System etabliert werden, welches die schnelle und sichere Detektion von allen (zu diesem Zeitpunkt) bekannten humanen Parechoviren in klinischen Proben erlaubte. Damit sollte eine Aussage über die Prävalenz dieser Infektion bei Kindern aus dem Großraum Würzburg getroffen werden und die vorherrschenden hPeV-Genotypen identifiziert werden. Zusätzlich sollten Daten über die Epidemiologie und Klinik von hPeV Infektionen gesammelt werden.

Basierend darauf sollte der Nutzen der Implementierung einer routinemäßigen PCR für hPeV bei Atemwegsinfekten geprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

In der vorliegenden Studie wurden retrospektiv Nasenrachensekrete (NRS) von insgesamt 800 Kindern untersucht. Diese waren von Januar 2002 bis Oktober 2005 an der Universitätskinderklinik Würzburg wegen eines respiratorischen Infekts stationär aufgenommen worden.

Die NRS wurden an das Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg geschickt und dort routinemäßig mittels Immunfluoreszenz-Assay (IFA)-Screening (Respiratory Panel IFA Kit, Chemicon/Millipore, Schwalbach, Deutschland) auf Antigen von Influenza A und B-Virus, Parainfluenzavirus 1, 2 und 3, RSV und Adenovirus getestet. Restmaterial der NRS wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert.

Im Rahmen von anderen Studien wurde aus den NRS mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) Nukleinsäure aufgereinigt und im Anschluss auf Anwesenheit von DNA des hBoV und des WU-Polyomavirus (WuPyV) untersucht. Des Weiteren wurde nach der Nukleinsäure-Aufreinigung im Rahmen einer Studie zum Nachweis von Coronavirus-RNA eine random hexamer Reverse Transkriptase (RT)-PCR durchgeführt und die erhaltene cDNA bei -20°C aufbewahrt.

Klinische und epidemiologische Daten der Kinder mit positivem hPeV-Nachweis wurden retrospektiv aus den Krankenakten erfasst. Die Entlassdiagnose wurde auf Plausibilität überprüft und im Rahmen der Studie ggf. modifiziert. Mehr als eine Enddiagnose pro Patient war zulässig. Die abschließende Bewertung erfolgte durch eine Fachärztin für Kinderheilkunde der Universitätsklinik Würzburg.

2.2 Herstellung eines Kontroll-Plasmids

2.2.1 Amplifikation

Zur Verwendung als positive Kontrolle wurde ein Plasmid hergestellt. Als Ausgangsmaterial diente Echovirus 22 (hPeV 1, „Harris“) von der American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) und Echovirus 23 (hPeV 2, „Williamson“) vom National Institute of Health (Bethesda, Maryland, USA). Die RNA wurde mittels einer One-Step RT-PCR (Qiagen, Hilden, Deutschland) in DNA umgeschrieben und amplifiziert. Die hierbei verwendeten Primer wurden mit der Primer Express 2.1 Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) entwickelt.

Dafür wurde das Genom der sechs bekannten Genotypen von hPeV (Tabelle 7) verglichen. In der 5'-UTR wurde eine konservierte Region identifiziert, innerhalb welcher die Primer lokalisiert wurden (Abb. 5).

Virustyp	GenBank accession number
hPeV 1	EF051629 (Stamm BNI-788St)
hPeV 2	AJ005695 (Stamm Gregory)
hPeV 3	AJ889918 (Stamm Can82853-01)
hPeV 4	DQ315670 (Stamm K251176-02)
hPeV 5	AF055846 (Stamm CT-86-670)
hPeV 6	AB252582 (Stamm NII561-2000)

Tabelle 7 Verwendete hPeV-Stämme zur Planung der Primer

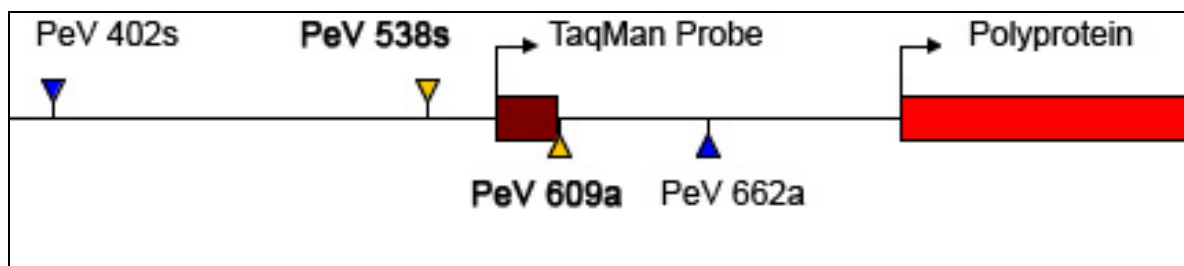


Abb. 5 Darstellung der Lokalisation der Primer innerhalb der 5'-UTR

Verwendung der Primerpaare	Name	Sequenz
One-Step RT-PCR; Kontrollplasmid; Sequenzierung	Forward: hPeV 402s	402-TGCCAGCGGAACAACATCT-420
	Reverse: hPeV 662a	662-TGGCCCACTAGACGTTTTTTAAC-640
Real-Time-PCR	Forward: hPeV 538s	538-CACTAGTTGTAAGGCCACGAA-559
	Reverse: hPeV 609a	609-GATCAGATCCAYAGTGTCWCTTGT-586
	Sonde: hPeV 563-TM	563-TGCCCAGAAGGTACCCGYAGGT-584-Fam-Tamra
Sequenzierung	Forward: hPeV 2330s	2330-TTCCARAATTCATGGGGTTC-2349
	Reverse: hPeV 3105a	3105-CCATARTGCTTGTARAAACCYCTATC-3080

Tabelle 8 Darstellung aller Primerpaare und der Sonde dieser Studie; Die Lokalisationsangaben beziehen sich jeweils auf die Basennummerierung von hPeV 1 (Stamm Harris, GenBank accession number S45208).

Die Sequenzen von hPeV 7 und 8 wurden nach ihrer Veröffentlichung ebenfalls auf das Vorliegen dieser konservierten Region überprüft. Hierbei zeigte sich, dass die verschiedenen hPeV-Stämme in maximal drei Basenpaaren Unterschiede zu der Basenpaarfolge der Consensus-Region aufwiesen (Abb. 6). Die dicken Balken im Schaubild zeigen jeweils die Lage der Primer und der Sonde an.

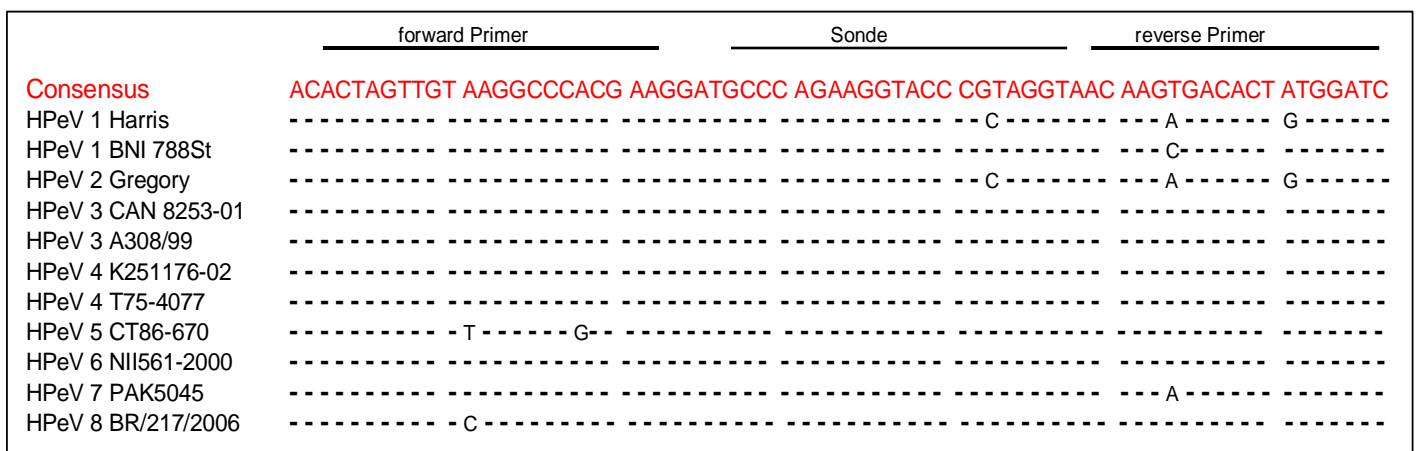


Abb. 6 Alignment der Consensus Region für die Real-Time-PCR

Als Primer für die One-Step RT-PCR wurde das Primerpaar hPeV 402s und hPeV 662a ausgewählt (Tabelle 8). Es amplifiziert eine 260 bp lange Region in der 5'-UTR (Abb. 5). Die konservierte Nukleotidsequenz dieses Fragments, welches bei allen hPeV-Genotypen vorliegt, zeigte beim Abgleich mit allen Sequenzen der GenBank keine relevanten Überschneidungen und ist somit spezifisch für hPeV.

Der Reaktionsansatz für die One-Step RT-PCR wurde mittels des Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach folgendem Schema angesetzt (Tabelle 9).

One-Step RT- Mix		pro Reaktion (in µl)
Puffer	5x Qiagen OneStep RT-PCR	10,0
dNTP je 400 µM	DNTP	2,0
Forward Primer 20 µM	hPeV 402s	1,25
Reverse Primer 20 µM	hPeV 662a	1,25
H ₂ O	H ₂ O	23,5
Enzyme Mix	Qiagen OneStep RT-PCR	2,0
Eluat der Extraktion		10,0
		50,0

Tabelle 9 Reaktionsansatz der One-Step RT-PCR

Der Reaktionsansatz wurde in 0,5 ml-Gefäße pipettiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation in einem Thermocycler 9600 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Das Temperaturprofil der RT-PCR ist in Tabelle 10 aufgeführt. Pro Zyklus wurde die DNA-Synthesezeit um 1 s verlängert.

Die amplifizierte DNA wurde mittels Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Proben mit Banden in der richtigen Höhe für hPeV wurden nach dem unter 2.4.1 bis 2.4.2 beschriebenen Schema sequenziert.

Zeit	Temperatur
30 min	50°C
15 min	95°C
30 s	94°C
45 s	45°C
1 min + 1 s	72°C
∞	4°C

} 50x

Tabelle 10 Temperaturtabelle der OneStep RT-PCR

2.2.2 Klonierung

Nach Bestätigung des Amplikons durch Sequenzanalyse wurde es mit dem Topo-TA-Cloning-Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in den Vektor pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Hierfür wurden 10 ng des linear vorliegenden pCR2.1-TOPO Vektors mit 50 ng PCR-Produkt sowie Pufferlösung und Wasser gemischt und dann 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien mit dem Ligationsansatz direkt transformiert.

Dazu wurden 2 µl der Ligationsreaktion zu 100 µl chemisch kompetenten TOP10 *E. coli* gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde im Anschluss durch einen Hitzeschock bei 42°C für 30 s durchgeführt. Nach dem Hitzeschritt wurden 250 µl S.O.C.-Medium zugegeben und die Bakterien bei 37°C für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Von dieser Kultur wurden 30 µl auf LB-Platten, die 100 µg/ml Ampicillin und X-Gal als Selektionsmarker enthielten, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Der Vektor pCR2.1 TOPO enthält ein Ampicillin-Resistenzgen. Daher konnten sich auf den LB-Platten nur die Bakterien vermehren die erfolgreich mit dem Plasmid transformiert worden waren. Bei erfolgreichem Einbau des DNA-Fragments in den Vektor wird dabei das im Vektor enthaltene β-Galaktosidase-Gen unterbrochen, so dass β-Galaktosidase nicht mehr korrekt exprimiert wird. X-Gal ist ein chromogenes Substrat der β-Galaktosidase, d.h. bei Spaltung von X-

Gal durch die β -Galaktosidase entsteht ein blauer Farbstoff. Fehlt die β -Galaktosidase, entsteht kein blauer Farbstoff. Durch den Selektionsmarker X-Gal konnten erfolgreiche Klonierungen somit anhand der weißen Koloniefarbe detektiert werden. Von diesen wurden 10 Einzelkolonien in LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Plasmid-DNA-Präparation

Am nächsten Morgen wurden jeweils 2 ml der Übernacht-Kulturen mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Hierzu wurden die Bakterienkulturen zunächst in 250 μl Puffer P1 suspendiert und in ein Mikrozentrifugen-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden 250 μl Puffer P2 zugegeben und das Ganze durch leichtes Schütteln gemischt. Danach wurden 350 μl Puffer N3 hinzugegeben und alles nochmals gemischt. Im Anschluss wurde alles für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der dabei resultierende Überstand wurde auf eine Durchflusssäule pipettiert und nochmals für weitere 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und das Röhrchen nochmals abzentrifugiert um den restlichen Puffer zu entfernen. Zuletzt wurde die Durchflusssäule in ein neues Sammelröhrchen gestellt und 50 μl Puffer EB (Tris-Cl, 10 mM, pH 8,5) zugegeben um die DNA zu eluieren. Die so isolierten Plasmide wurden mittels Sequenzierung mit den Primern hPeV 402s und hPeV 662a auf das Vorliegen der gewünschten Sequenz überprüft.

Die positiven Kolonien, in denen sich das Vorhandensein des Genfragments bestätigt hatte, wurden mit Hilfe des „Gene Quant II“ Photometers (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) in 1:5 Verdünnung photometrisch quantifiziert, und im Anschluss auf eine Konzentration von 10^{10} Kopien/ μl eingestellt. Zur Herstellung einer Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten angelegt, die von 10^5 Kopien/ μl bis 10^0 Kopien/ μl reichte. Um geringe DNA-Mengen zu stabilisieren, wurde die Verdünnungsreihe in Heringssperma-

DNA (1 ng/ml) angelegt. Die Verdünnungsstufen wurden mit 50 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Nachdem ein Aliquot aufgetaut worden war, wurde es bei 4°C aufbewahrt und maximal eine Woche verwendet.

Die Klonierungsreaktion, Transformation, Plasmid-Präparation sowie die nachweisende Gelelektrophorese und Sequenzierung wurden jeweils getrennt für hPeV 1 und hPeV 2 durchgeführt. Als Standardkurve wurde im Folgenden die Verdünnungsreihe von hPeV 1 verwendet.

2.3 Parechovirus Real-Time-PCR

2.3.1 Primer- und Sondenauswahl

Für die Real-Time-PCR wurde das Primerpaar hPeV 538s und hPeV 609a verwendet, welches, wie in Abb. 5 gezeigt, ebenfalls in der 5'-UTR liegt. In dem 71 bp langen Amplikon liegt die komplementäre Sequenz der TaqMan-Sonde hPeV 563. Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, welches am 5' Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporter-Farbstoff markiert ist und am 5'-Ende Tetramethyl-6-Carboxyrhodamine (TAMRA) als Quencher trägt. Solange die Sonde intakt ist, wird die Fluoreszenz von FAM durch den Quencher unterdrückt. Lagert sich die Sonde während der DNA-Elongationsphase der PCR an den Matrizenstrang an, werden durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase die Nukleotide am 5'-Ende der Sonde zusammen mit dem Reporter-Farbstoff FAM abgespalten. Dadurch erfolgt die räumliche Trennung von Reporter und Quencher. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs wird nicht mehr unterdrückt und kann gemessen werden.

2.3.2 Durchführung der Real-Time-PCR

Für die Real-Time-PCR wurde zunächst ein Mastermix wie in Tabelle 11 beschrieben hergestellt. Eine Reaktion bestand aus je 18 µl Mastermix und 2 µl

cDNA oder H₂O. Die einzelnen Reaktionsansätze wurden in eine 96-Loch-Platte pipettiert, und danach bei 900 rpm für 30 s zentrifugiert.

Material für Mastermix	Endkonzentration	Pro Reaktion (in µl)
Quantitect Probe MMX		10,0
Primer hPeV 538s (20 µM)	200 nM	0,2
Primer hPeV 609a (20 µM)	200 nM	0,2
Probe PEV 563-TM (20µM)	200 nM	0,2
H ₂ O		7,4
		18,0

Tabelle 11 Reaktionsansatz der Real-Time-PCR

Nach vier bis fünf Patientenproben wurde je eine extrahierte Wasserprobe als negative Kontrolle mitgetestet, um eine eventuelle Kontamination detektieren zu können. Zwei weitere unextrahierte Wasserproben dienten als zusätzliche Negativkontrolle (NTC; no template controls). Um eine Aussage über die Menge an cDNA-Kopien in den NRS treffen zu können, lief als Referenz in jedem Real-Time-PCR-Ansatz ein Doppelansatz der Standardkurve (10^5 bis 10^1 Kopien/µl) mit. Die Amplifikation und Fluoreszenzmessung wurde im ABI7500 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach folgendem Schema durchgeführt.

Zeit	Temperatur
15 min	95 °C
15 s	95 °C
1 min	60 °C
	} 50x

Tabelle 12 Temperaturtabelle der Real-Time-PCR

Die Menge der cDNA wurde anhand des cycle threshold (Ct)-Wertes bestimmt. Der Ct-Wert zeigt an, ab wann die exponentielle Amplifikation der DNA die zuvor festgelegte Schwelle (threshold) der Hintergrundfluoreszenz übersteigt und damit die Fluoreszenz der amplifizierten cDNA über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Je größer die Menge der DNA im Ausgangs-

material desto früher ist die Schwelle überschritten und desto kleiner ist der Ct-Wert.

Im Anschluss wurde die Viruslast der hPeV positiven Proben berechnet. Diese wurde ausgehend von 200 µl NRS-Ausgangsmaterial wie folgt bestimmt: Die RNA aus 200 µl Probenmaterial wurde nach der Extraktion in 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Von diesem Eluat wurden 10 µl für die reverse Transkription mit einem Endvolumen von 50 µl verwendet (Äquivalent 40 µl Ausgangsmaterial). Aus der entstandenen cDNA wurden später 2 µl für die Real-Time-PCR verwendet (Äquivalent 1,6). Unter der theoretischen Annahme, dass die Reverse Transkription zu 100% erfolgreich war, wurden die Kopien/Reaktion mit dem Faktor 625 multipliziert um die Ausgangsmenge der Viruslast pro Milliliter im Originalmaterial zu berechnen. Wahrscheinlich liegt die reale Effizienz der Reversen Transkription jedoch niedriger.

2.4 Typisierung der hPeV-positiven Proben

2.4.1 Qualitative PCR

Patientenproben, die durch die Real-Time-PCR positiv auf hPeV getestet worden waren, wurden zur Bestimmung des vorliegenden Genotyps sequenziert. Hierzu wurde das Primerpaar hPeV 2330s und hPeV 3105a verwendet (Tabelle 8). Da die Sequenz der Primer nicht vollständig bei allen hPeV-Genotypen konserviert ist, wurden an einigen Positionen Basengemische („Wobbles“) eingesetzt. Das Primerpaar amplifiziert ein 775 bp langes Fragment, welches sich zwischen den hPeV-Genotypen unterscheidet. Durch anschließende Sequenzierung ist somit eine Differenzierung der hPeV-Genotypen möglich.

Vor der Sequenzierungsreaktion wurde eine qualitative PCR (Hot Star Taq DNA Polymerase PCR; Qiagen, Hilden, Deutschland) mit der cDNA der positiven

Patientenproben durchgeführt. Folgendes Pipettierschema wurde verwendet (Tabelle 13):

Material		pro Reaktion (in µl)
Puffer	10xHot Star	5,0
dNTP (je 20 mM)	dNTP	0,5
Forward Primer	hPeV 2330s	0,5
Reverse Primer	hPeV 3105a	0,5
H ₂ O	H ₂ O	38,2
Polymerase	Hot Star Taq	0,3
CDNA		5,0
		50,0 µl

Tabelle 13 Reaktionsansatz der qualitativen PCR vor Sequenzierung

Zusätzlich wurde eine Sequenzierung auch mit den Primern hPeV 402s und hPeV 662a durchgeführt.

Im Anschluss erfolgte die qualitative PCR nach dem individuellen Temperaturprogramm für hPeV aus Tabelle 14, bestehend aus insgesamt sechs Schritten:

Zeit	Temperatur
10 min	95 °C
30 s	95°C
30 s	50°C
45 s	72°C
5 min	72°C
∞	4°C

} 50x

Tabelle 14 Temperaturprogramm der qualitativen PCR

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss auf einem 3% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

2.4.2 Sequenzierung

2.4.2.1 Prinzip der Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger und beinhaltete folgende Arbeitsschritte: Aufreinigung des PCR-Produktes zur Abtrennung von Primern und nicht-inkorporierten Nukleotiden, Ansatz der eigentlichen Sequenzierungsreaktion, Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion zur Abtrennung von nicht-inkorporierten Terminatoren sowie kapillarelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierungsprodukte. Die Sequenzierungsreaktion wurde als lineare PCR durchgeführt, bei der zusätzlich zu den vier Desoxynukleosidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP vier entsprechende Di-Desoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) zugegeben wurden, die mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert waren. Bei Einbau der ddNTP in die DNA kommt es zum Kettenabbruch da die Synthese aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am 3'Ende nicht fortgesetzt werden kann. Mittels dieses Verfahrens entstehen unterschiedlich lange Kettenabbruchprodukte, welche dann kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden. Auf Basis der unterschiedlichen Fluoreszenz-Farben am Ende der Fragmente wird ein Chromatogramm erstellt, welches die Abfolge der Basenpaare zeigt.

2.4.2.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Proben aus der qualitativen PCR mit der Bande auf der erwarteten Höhe wurden mittels des QIAquick PCR Purification Kit 250 (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde der PCR-Ansatz zunächst im Verhältnis 1:5 mit Puffermedium PB gemischt und auf eine Durchflusssäule in einem 2 ml Sammelröhrchen pipettiert. Im Anschluss wurde es für 1 min bei 15.000 x g zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde das an die Säule gebundene PCR-Produkt durch Zugabe von 750µl PE-Puffer und erneute Zentrifugation für

1 min bei 15.000 x g gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen. Zur Entfernung von Ethanol-Resten erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 15.000 x g für 1 min. Danach wurde die Durchflusssäule auf ein 1,5 ml Sammelröhrchen platziert. Um die DNA zu eluieren, wurden 50 µl EB-Puffer zugegeben und 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde bis zur Sequenzierungsreaktion bei -20°C eingefroren.

2.4.2.3 Ansatz der Sequenzierungsreaktion

Nach der Aufreinigung erfolgte der Ansatz der Sequenzierungsreaktionen der positiven Proben mit den Primern hPeV 2330s und hPeV 3105a sowie mit dem Primerpaar hPeV 402s und hPeV 662a. Dazu wurden BigDye-Terminatoren der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Zusammensetzung und das Temperaturprofil der Sequenzierungsreaktion sind Tabelle 15 und Tabelle 16 zu entnehmen.

Material	pro Reaktion (in µl)
DNA / Plasmid	2,0
Primer 5 µM (= 5 pmol/µl)	1,0
H ₂ O	
BigDye Mix	1,0
2,5 x Puffer (TrisHCl/MgCl ₂)	1,0

Tabelle 15 Reaktionsansatz der Sequenzierung

Temperatur	Zeit	
96 °C	10 s	} 25x
50 °C	5 s	
60 °C	4 min	

Tabelle 16 Temperaturtabelle der Sequenzierung

2.4.2.4 Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte und Kapillarelektrophorese

Die Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion erfolgte durch die Sequenzier-Serviceeinheit am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg mit dem Pipettierautomaten (Genesis Workstation 150/8, Tecan) und dem Kit „Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup“ (Millipore, Schwalbach, Deutschland). Die Filtrate wurden vom Pipettierautomaten in 25 µl „Injection Solution“ aufgenommen und anschließend mit dem Gerät ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) kapillar-elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.3 Phylogenetische Analyse

Die Chromatogramme aus der Sequenzierung wurden am Computer mit Hilfe des SeqMan II Programms (DNASTAR, Madison, USA) bearbeitet, die jeweils komplementären Sequenzen zu einem Contig zusammengebaut, und die Consensus-Sequenz wurde gespeichert. Aus den Consensus-Sequenzen und den unter 2.2.1 beschriebenen hPeV-Genotypen wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (MEGA Version 5 [Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011), Tempe, USA]). Dieser wurde anhand der Jukes Cantor Parameter und dem Interior Branch durch das MEGA 5.0 Programm berechnet.

Zusätzlich wurden alle erhaltenen Sequenzen zur Bestätigung des hPeV-Genotyps mittels des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des NIH auf ihre größte genomische Ähnlichkeit innerhalb der Nukleotid-Datenbank geprüft.

2.5 Statistische Auswertung

Die Erstellung der angegebenen statistischen Berechnungen erfolgten mittels GraphPad Prism version 3.0c for Mac (GraphPad Software, San Diego, USA), sowie mittels des Chi-Quadrat-Tests (SPSS Statistics Basic, Chicago, USA) und des Fisher's Exact Test über <http://statpages.org>.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung des Real-Time-PCR-Systems

3.1.1 Minimale Nachweisgrenze

Um die Real-Time-PCR als zuverlässiges Testsystem zu validieren, wurde die minimale Nachweisgrenze ermittelt sowie der Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizient bestimmt.

Die minimale Nachweisgrenze wurde mittels Probit-Analyse errechnet. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannter Kopienzahl pro Reaktion (c/r) erstellt: 40 c/r, 20 c/r, 15 c/r, 10 c/r, 5 c/r, 2,5 c/r, 1,25 c/r und 0,75 c/r. Drei unabhängige Läufe der PCR, mit insgesamt 24 Wiederholungen der beschriebenen Verdünnungsstufen, wurden angesetzt. Die Anzahl der positiven Reaktionen pro Verdünnungsstufe wurde addiert und mittels Probit-Analyse (SPSS, Chicago, USA) die minimale Nachweisgrenze errechnet (Tabelle 17). Für die untersuchte Real-Time-PCR ergab dies eine minimale Nachweisgrenze von 5,55 Kopien pro Reaktion (95%-Konfidenzintervall 4,48 bis 8,04 c/r), die mit 95% Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden konnten.

Probit	Kopienanzahl (c/r)	Anzahl Reaktionen	Anzahl positive Reaktionen	Anteil positiver Reaktionen (%)
1	40	24	24	100
2	20	24	24	100
3	15	24	24	100
4	10	24	24	100
5	5	24	21	91,3
6	2,5	24	17	56,8
7	1,25	24	6	33,6
8	0,75	24	6	25,4

Tabelle 17 Rohdaten der Probit-Analyse zur Berechnung der minimalen Nachweisgrenze

3.1.2 Intra-Assay-Variationskoeffizient

Um eine Aussage über die innere Teststabilität treffen zu können, wurde der Intra-Assay-Variationskoeffizient bestimmt. In einem Real-Time-PCR-Lauf wurde ein Doppelansatz der Standardkurve von 10^5 bis 10^1 Kopien/ μ l, sowie ein Dreifachansatz der Verdünnungsstufen 10^6 bis 10^1 Kopien/ μ l getestet. Der Variationskoeffizient wurde aus Mittelwert und Standardabweichung der Ct-Werte der jeweiligen Verdünnung berechnet und schwankte zwischen 0,1 und 1,8% (Tabelle 18).

Kopien pro Reaktion	Ct-Wert			Mittelwert	SD	Variationskoeffizient (VK %)
	Wert	der	Replikation:			
	1	2	3			
10^1	32,15	32,03	32,64	32,27	0,323	1,0
10^2	28,42	28,79	28,30	28,50	0,253	0,8
10^3	24,75	24,73	24,71	24,73	0,021	0,1
10^4	21,20	21,93	21,86	21,66	0,402	1,8
10^5	18,33	18,14	18,35	18,27	0,114	0,6
10^6	15,47	15,33	15,86	15,55	0,276	1,7
					Mittelwert	1,1

Tabelle 18 Intra-Assay-Variationskoeffizient für verschiedene Konzentrationen des hPeV-Plasmids

3.1.3 Inter-Assay-Variationskoeffizient

Im Rahmen der Validierung wurde weiterhin zu jedem einzelnen Lauf der Real-Time-PCR eine Positivkontrolle von hPeV 1 in der Konzentration 10^5 Kopien/ μ l beigefügt. Sie diente zur Überprüfung der Teststabilität zwischen den Real-Time-PCR Läufen (Inter-Assay-Variationskoeffizient).

Real-Time-Lauf	Ct- Wert	Viruslast (c/r)	Slope
Lauf 1	21,25	752971,94	-3,307
Lauf 2	20,39	473249,0	-3,568
Lauf 3	21,08	489239,75	-3,599
Lauf 4	20,11	438731,13	-3,703
Lauf 5	21,11	417649,47	-3,620
Lauf 6	21,01	462082,63	-3,590
Lauf 7	22,18	519896,63	-3,340
Lauf 8	21,26	452552,38	-3,650
Lauf 9	22,01	421357,72	-3,579
Lauf 10	21,34	454113,38	-3,620
Lauf 11	22,17	459960,03	-3,524
Lauf 12	21,16	495417,22	-3,276
Lauf 13	21,09	431830,28	-3,612
Durchschnitt	21,24	486435,11	-3,531
Standardabweichung	0,59	83161,2	0,13
Variationskoeffizient	2,76 %	17 %	3,68 %

Tabelle 19 Rohdaten der Standardkurve der Real-Time-PCR von hPeV 1 mit 10⁵-Kopien: Ct-Werte, Viruslast und Slope

Aus den Ergebnissen der einzelnen Ct-Werte der Positivkontrolle wurde anschließend ein Variationskoeffizient von 2,76% berechnet (Tabelle 19). Die Steigung der Standardkurve in den 13 voneinander unabhängig durchgeführten Real-Time-PCR Läufen zur Patientenprobenbestimmung betrug im Mittel –3,53 (Sollbereich -3,1 – -3,8), mit einer Standardabweichung von 0,13.

3.2 Ergebnisse der Real-Time-PCR

3.2.1 Getestete Proben

Mittels Real-Time-PCR wurden insgesamt 800 NRS getestet. Im ersten Durchlauf der Real-Time-PCR waren 17 der getesteten Proben positiv für hPeV-RNA. Dies entspricht einer Prävalenz von 2,1%. Die Viruslast der

untersuchten Proben wurde, wie unter 2.3.2 beschrieben, auf die Gesamtmenge im Ausgangsmaterial zurückberechnet und betrug maximal $1,5 \times 10^6$ Kopien/ml und minimal 625 Kopien/ml Ausgangsmaterial. Der Durchschnitt der nachgewiesenen Viruslast lag bei $1,25 \times 10^5$ Kopien/ml, der Median bei $2,25 \times 10^4$ Kopien/ml.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Proben erneut getestet. War das Ergebnis in der zweiten PCR negativ erfolgte eine dritte Wiederholung, die Probe wurde dann nach dem 2:1-Prinzip fortan als positiv oder negativ bewertet. Bis auf eine Probe konnte das Ergebnis bei wiederholter Testung repliziert werden. Die Ausnahme bildete dabei das NRS mit der niedrigsten Viruslast (625 Kopien/ml), die Probe wurde fortan als negativ gewertet.

3.2.2 Phylogenetische Analyse der hPeV-positiven Proben

Bei den 16 wiederholt positiven Proben wurde im Anschluss eine Sequenzierung in der variablen (VP1), und in der konservierten 5'-UTR-Region durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels BLAST auf ihre größte genomische Ähnlichkeit in der NIH Nukleotid-Datenbank überprüft. Die BLAST-Resultate finden sich in Tabelle 20 wieder.

Es konnten insgesamt 14 Proben sequenziert werden. Sie teilten sich auf in 11 hPeV 1, einmal hPeV 3, einmal hPeV 4 und einmal hPeV 6. Zwei Sequenzen ließen sich trotz wiederholt positiver Real-Time-PCR in der Folge nicht sequenzieren. Für zehn Proben war die Sequenzierung der variablen sowie auch der konstanten Region möglich, in allen Fällen bestätigte sich der identifizierte Genotyp. Bei zwei Proben war nur eine Sequenzierung der konstanten Region möglich, beide gehören zum Genotyp hPeV 1. Zwei Proben wurden nur in der variablen Region sequenziert (hPeV 4 und hPeV 1).

Weder hPeV 2 noch hPeV 5 wurden unter den getesteten Proben nachgewiesen.

Materialnummer	Ct-Werte	Viruslast (Kopien/ml)	BLAST - Resultat 5'-UTR-Region	BLAST -Resultat VP1-Region
2005007198	38,18	1,0 x 10 ⁴	hPeV 1	hPeV 1
2002002767	28,76	1,5 x 10 ⁶	hPeV 1	hPeV 1
2004000269	38,32	7,5 x 10 ³	hPeV 1	hPeV 1
2004000278	35,51	4,4 x 10 ⁴	hPeV 1	hPeV 1
2005004743	33,48	6,9 x 10 ⁴	hPeV 1	hPeV 1
2005002928	34,26	4,4 x 10 ⁴	hPeV 1	hPeV 1
2003001696	33,47	5,6 x 10 ⁴	hPeV 1	hPeV 1
2004009408	32,30	2,7 x 10 ⁵	hPeV 1	hPeV 1
2004003152	37,28	1,3 x 10 ⁴	hPeV 6 (98% zu BNI-67/03)	hPeV 6
2004014280	36,09	2,5x 10 ⁴	hPeV 3	hPeV 3
2002026704	37,97	2,5 x 10 ³	hPeV 1	n.s.
2005005405	39,28	2,5 x 10 ³	hPeV 1	n.s.
2004027830	35,16	4,4 x 10 ⁴	n.s.	n.s.
2004030781	38,68	3,1 x 10 ³	n.s.	hPeV 4
2004010019	36,13	1,9 x 10 ⁴	n.s.	hPeV 1
2005001382	35,46	3,1 x 10 ⁴	n.s.	n.s.

Tabelle 20 Ergebnisse der hPeV-positiven Proben, Ct-Werte, Viruslast und Resultate im BLAST der 5'-UTR und VP1-Sequenzen. Keine Sequenzierung möglich = n.s.; Sequenz BNI-67/03 (GenBank Accession Nummer EU24629)

Anschließend wurde von beiden Regionen jeweils ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Zusätzlich zu den Referenzsequenzen der acht hPeV Genotypen wurden in die unten abgebildeten Stammbäumen drei weitere Genomsequenzen eingefügt um die genetische Verwandtschaft der hier sequenzierten Proben besser hervorzuheben. Die hPeV 3 Genomsequenz K8-94 (GenBank Accession Nummer GQ183033) stammt aus der Veröffentlichungen von Beschop et al. [Beschop et al., 2009], die hPeV 1 Sequenz PicoBank/HPeV1/a (GenBank Accession Nummer FM242866) wurde erstmals 2009 von Williams et al. publiziert [Williams et al., 2009]. Die hPeV

Sequenz BNI-67/03 (GenBank Accession Nummer EU24629) wurde von Baumgarte et al. veröffentlicht [Baumgarte et al., 2008].

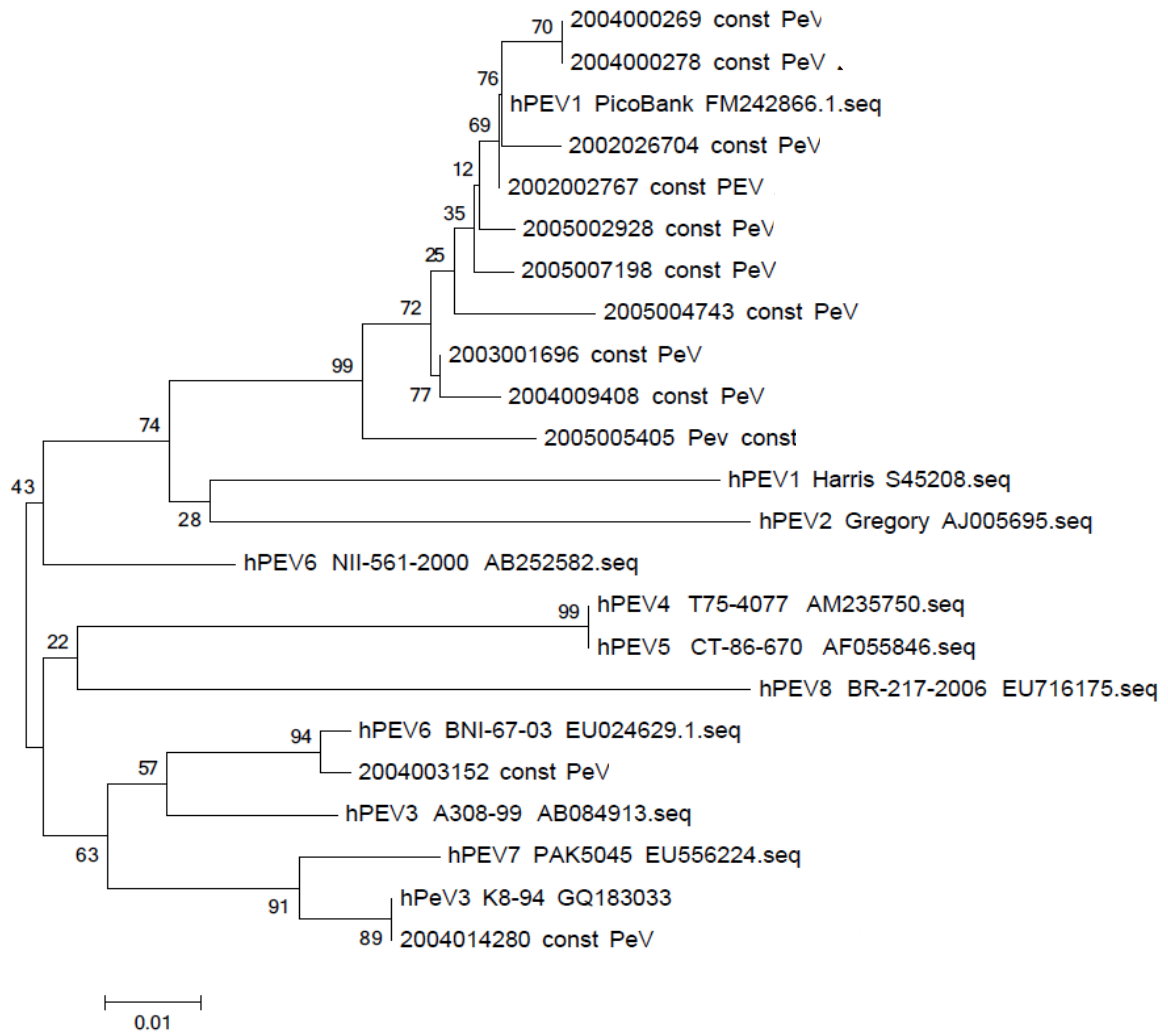


Abb. 6 Stammbaum hPeV 1-8, Sequenzen der 5'-UTR Region InteriorBranch, Bootstrap Replikate 1000, Jukes Cantor Parameter; der Maßstab repräsentiert 1 Nukleotid-Unterschied pro 100 Basenpaare.

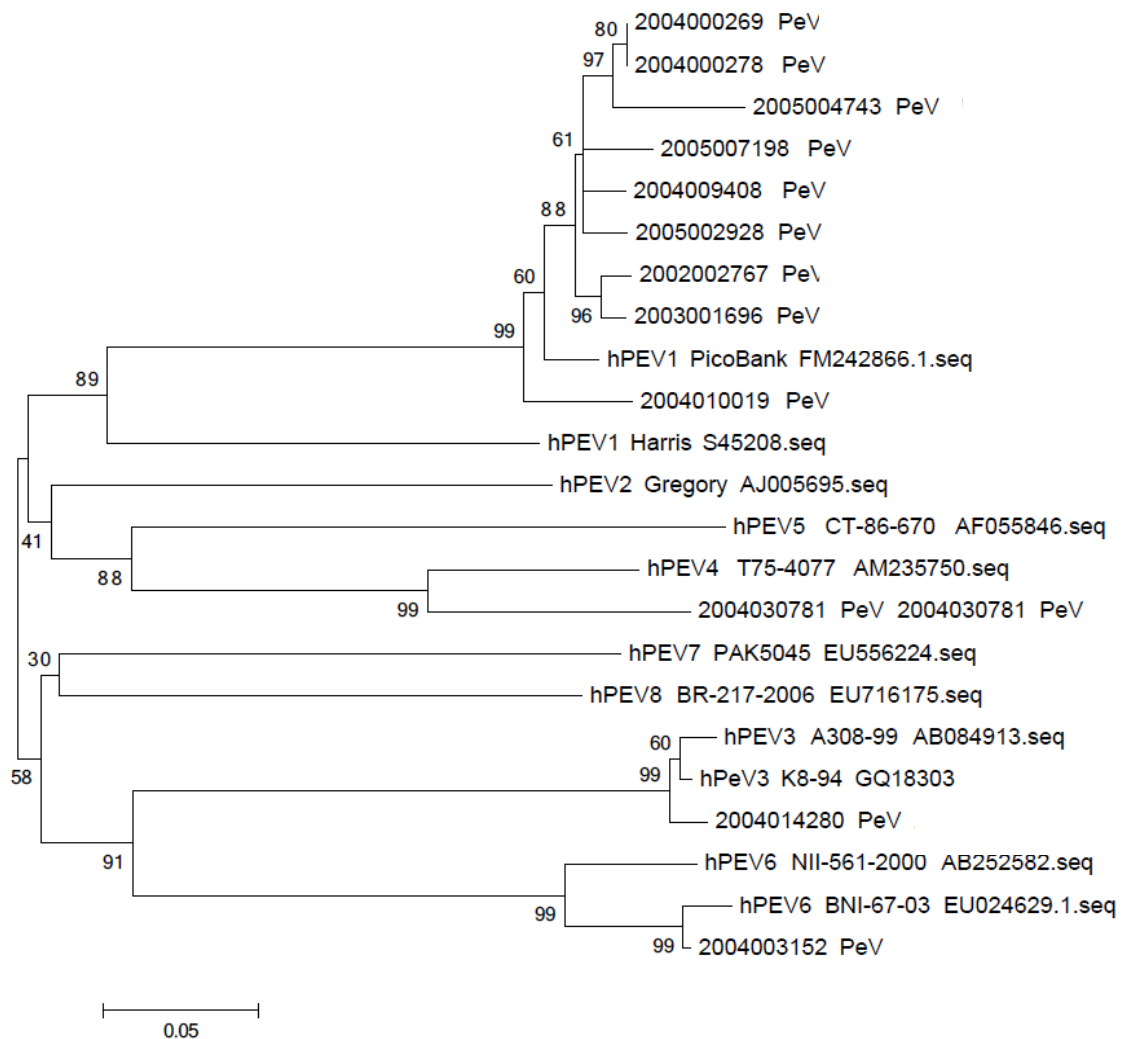


Abb. 7 Stammbaum hPeV 1-8, Sequenzen der VP1-Region, Interior Branch, Bootstrap Replikate 1000, Jukes Cantor Parameter; der Maßstab repräsentiert 5 Nukleotid-Unterschiede pro 100 Basenpaare.

Sowohl im Stammbaum der aus den Sequenzen der 5'-UTR erstellt wurde (Abb. 6) sowie im Stammbaum der VP1-Region (Abb. 7) bestätigte sich der mittels BLAST ermittelte Genotyp der Sequenzen. In beiden phylogenetischen Darstellungen zeigte sich, dass die hPeV 1-Sequenzen enger um die Sequenz hPeV 1 PicoBank (GenBank Accession Nummer FM242866) clustern, als um den ursprünglichen Referenzstamm „Harris“. Das hPeV 3-Segment ist der Sequenz K8-94 (GenBank Accession Nummer GQ183033) ähnlicher als dem Referenzstamm A308-99 aus der Erstbeschreibung. Die hPeV 6-Sequenz hat eine engere genetische Verwandtschaft zur Sequenz BNI-67/03 (GenBank Accession Nummer EU24629) als zum Referenzstamm NII-561-2000.

3.3 Demographie und Saisonalität der hPeV-positiven Patienten

3.3.1 Altersverteilung

Innerhalb der Studiengruppe aller auf hPeV getesteten Patienten ($n = 800$) lag der Altersdurchschnitt bei 3,48 Jahren (Spanne 0,03 – 20,9 Jahre). Im Kollektiv der 16 Kinder mit hPeV-positiven NRS lag das Durchschnittsalter bei 1,26 Jahren (Spanne 0,16 – 4,10 Jahre) und der Median bei 1,23 Jahren. Der Altersdurchschnitt der hPeV-negativen Kinder lag bei 3,53 Jahren, der Altersmedian bei 1,82 Jahren. Der Unterschied der Altersmediane der hPeV-positiven und hPeV-negativen Kinder zeigte einen Trend zur statistischen Signifikanz ($p=0,066$; Mann-Whitney-Test).

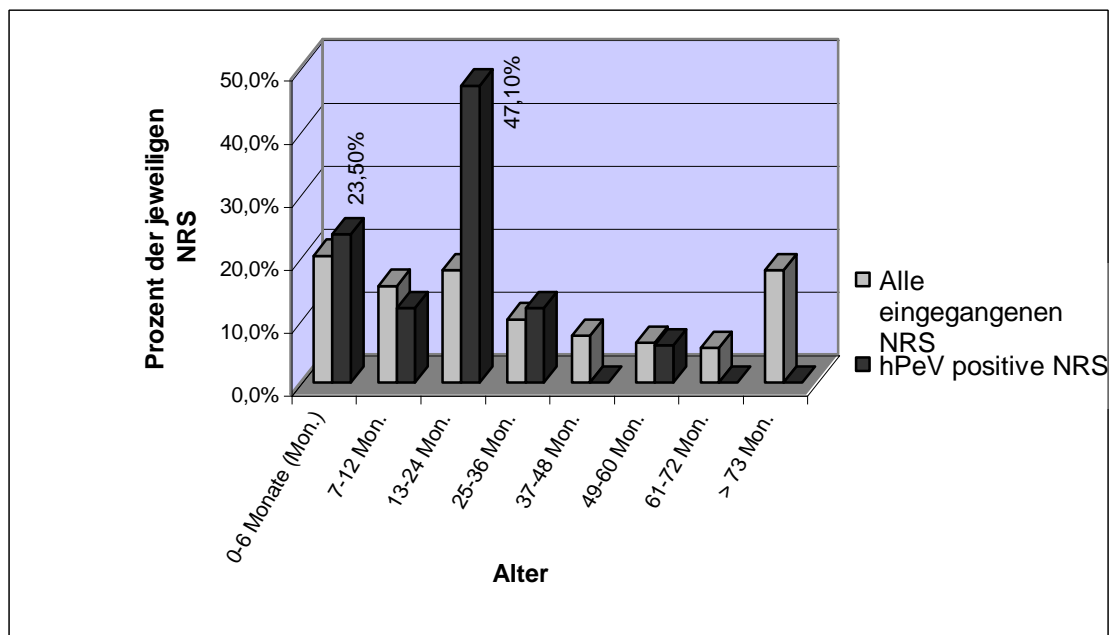


Abb. 8 Altersverteilung bei Patienten aller eingegangenen NRS und hPeV-positive NRS

Im Altersbereich zwischen ein und zwei Jahren fanden sich 17,8% der eingegangenen Proben und 47,1% der hPeV-positiven Patienten. Insgesamt waren 82,4% der Kinder, bei denen hPeV im NRS gefunden wurde, unter zwei Jahre alt, aus diesem Alterssegment stammen aber nur 53,2% der gesammelten Proben (Abb. 8)

Berücksichtigt man ausschließlich das Kollektiv der Kinder, die bei Gewinnung des NRS kleiner gleich 2,0 Jahre waren ($n = 425$), liegt die Prävalenz von hPeV bei insgesamt 3,29% ($n = 14/425$).

3.3.2 Geschlechterverteilung

Im Studienkollektiv ($n = 800$) waren 59,1% der Patienten männlich. Das Geschlechterverhältnis zeigte unter den hPeV-positiven Patienten 56% weibliche Patienten. Der Unterschied der Geschlechterverteilung war statistisch nicht signifikant (Chi-Quadrat Test, p -Wert = 0,1225).

3.3.3 Jahreszeitliche Verteilung

Alle in dieser Studie untersuchten Proben stammen aus dem Zeitraum Januar 2002 bis Oktober 2005. Es wurden somit drei vollständige ARI-„Saisons“ erfasst. Die Sammlung erfolgte kontinuierlich in jedem Monat des Untersuchungszeitraums, mit vermehrten Eingängen jeweils zwischen November und April der drei untersuchten Jahre. Die hPeV-positiven Proben wurden vor allem in den Monaten zwischen November und März detektiert ($n = 13$), allerdings gab es auch im April ($n = 2$) und Juni ($n = 1$) Nachweise (Abb. 9).

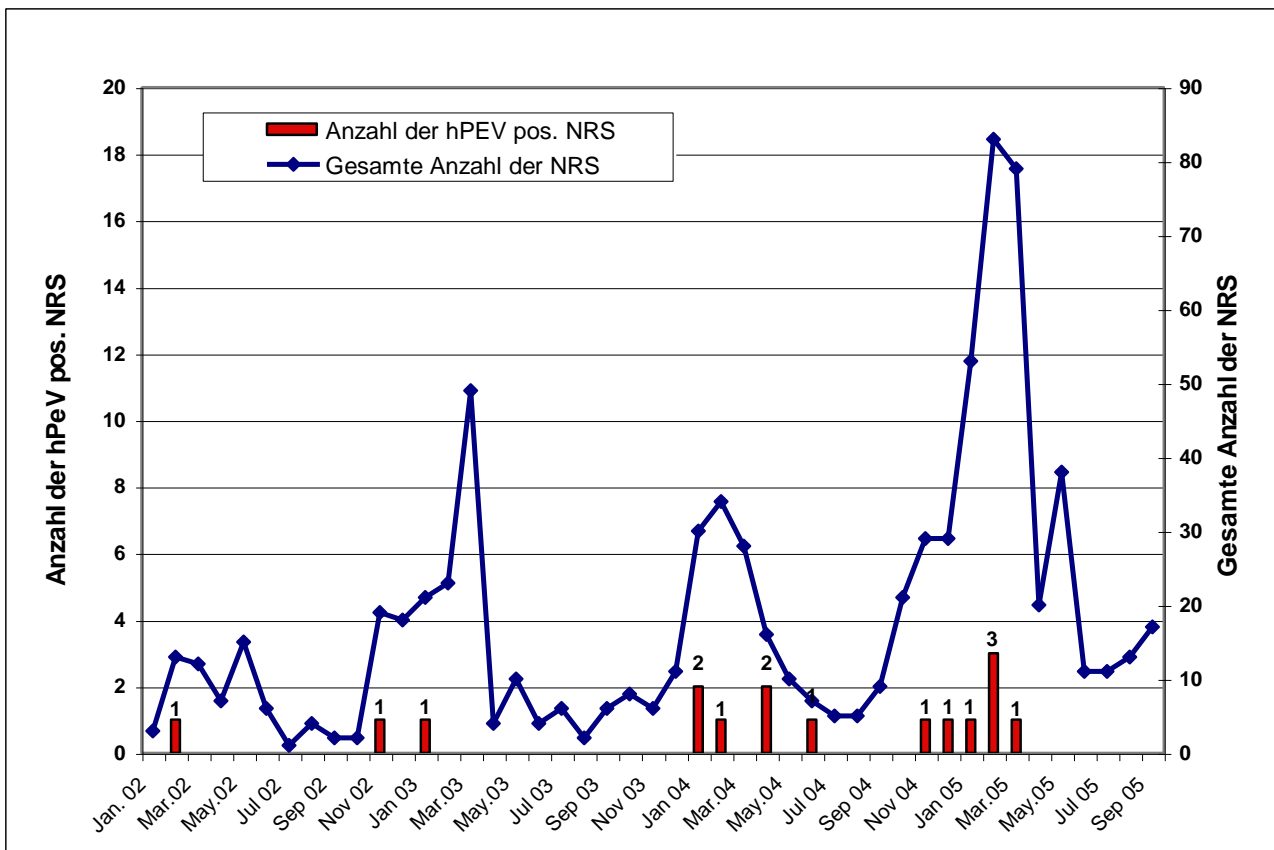


Abb. 9 Saisonale Verteilung der eingegangenen NRS und der hPeV-Nachweise

3.4 Koinfektionen

Das Gesamtkollektiv aller eingegangenen NRS ($n = 800$) war routinemäßig mittels IFA-Screening auf respiratorische Viren getestet worden (Influenza A und B-Virus, Parainfluenzavirus 1, 2 und 3, RSV und AdV). Hierbei zeigte sich eine virale Infektionsrate von 39,6% aller untersuchten NRS (vgl. Tabelle 21). Zusätzlich wurde bei 41 Kindern im Rahmen von anderen Studien WuPyV und bei 79 Kindern hBoV gefunden.

Bei den hPeV-positiven Patienten zeigte sich eine virale Koinfektionsrate von 56,3% ($n = 9$). Nur sieben Kinder wurden ausschließlich für hPeV positiv getestet.

	Anzahl (n)	Prozent (%)
Alle eingegangenen NRS	800	
Mittels IFA-Screening untersucht	800	100
Influenza A-Virus	95	11,9
Influenza B-Virus	12	1,5
Adenovirus	45	5,6
RSV	134	16,8
Parainfluenza 3-Virus	25	3,1
Parainfluenza 2-Virus	3	0,3
Parainfluenza 1-Virus	3	0,3

Tabelle 21 Ergebnisse des IFA-Screening aller eingegangenen Proben

Im statistischen Vergleich der Koinfektionen (Tabellen 22 und 23, Berechnung mittels Fisher's-Exact-Test) von hPeV-positiven Kindern mit allen hPeV-negativen Kindern aus dem Gesamtkollektiv zeigte sich nur für die Koinfektion mit Parainfluenza 1-Virus eine statistische Signifikanz ($p= 0,004$). Die zwei Patienten mit oben genannter Koinfektion waren Zwillingsskinder welche aufgrund eines Atemwegsinfekts zeitgleich im Krankenhaus waren.

Virale Koinfektion zu hPeV	Kinder
Keine Koinfektion	n = 7
Eine virale Koinfektion	n = 8
RSV	n = 2
Adenovirus	n = 3
Parainfluenza I-Virus	n = 2
Influenza A-Virus	n = 1
Mehr als eine virale Koinfektion	n = 1
RSV, hBoV, WuPyV	

Tabelle 22 Virale Koinfektionen bei hPeV-Infektion

	hPeV		p-Wert
	negativ	positiv	
Koinfektion ja	317	9	p = 0,154
Koinfektion nein	467	7	
RSV pos.	134	2	p = 0,470
RSV neg.	650	14	
AdV pos.	45	3	p = 0,065
AdV neg.	739	13	
PIV 1 pos.	3	2	p = 0,004
PIV 1 neg.	739	14	
Influenza A pos.	95	1	p = 0,590
Influenza A neg.	689	15	

Tabelle 23 Daten der nachgewiesenen Koinfektionen für Fisher's-Exact-Test und p-Wert

Das durchschnittliche Alter der Kinder mit viraler Koinfektion bei hPeV-Infektion betrug 1,7 Jahre, ohne virale Koinfektion lag der Altersdurchschnitt bei 0,69 Jahren.

3.5 Klinik der hPeV-positiven Patienten

3.5.1 Symptome bei hPeV-positiven Patienten

Die retrospektiv erfassten klinischen Symptome aller hPeV-positiven Kinder finden sich in Tabelle 24.

Vergleicht man die Symptome der hPeV-positiven Patienten mit einer oder mehreren Koinfektionen mit den beschriebenen Symptomen der sieben Individuen ohne nachgewiesene virale Koinfektion, zeigt sich Folgendes: Während Husten bei sieben Patienten mit Koinfektion auftrat (77%), hatten Kinder mit reiner hPeV-Infektion nur in knapp 43% der Fälle Husten. Ebenso hatten Kinder mit einer Koinfektion in 77% eine Rötung des Mund-Rachenraumes, während Kinder ohne ein weiteres infektiöses Agens nur in 43% eine Rötung aufwiesen.

Zu einem Exanthem oder einem Krampfanfall bei Fieber kam es ausschließlich in der Gruppe mit einer zusätzlichen Koinfektion. Es ergaben sich für alle Symptome keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Symptome	Alle hPeV positiven Patienten (n = 16)	Patienten mit Koinfektion (n = 9)	Patienten ohne Koinfektion (n = 7)	p-Wert
	n	n	N	
Husten	10	7	3	0,182
Mund-Rachenraum gerötet	10	7	3	0,182
Rhinitis	8	5	3	0,499
Fieber	8	5	3	0,499
Erbrechen / Diarrhoe	8	4	4	0,842
Tachydyspnoe	6	3	3	0,818
Rasselgeräusche	6	5	3	0,490
Pulmonale Obstruktion	3	2	1	0,600
Krampfanfall	3	3	0	0,149
Exanthem	1	1	0	0,562

Tabelle 24 Auflistung der dokumentierten Symptome bei hPeV-positiven Patienten

3.5.2 Diagnose bei Entlassung aus der Kinderklinik

Die Enddiagnosen bei Entlassung der 16 hPeV-positiven Patienten sind in Tabelle 25 ersichtlich.

Die Entlassdiagnose der sieben Patienten ohne Koinfektion lässt sich unterteilen in einen „Infekt der oberen Atemwege“ (14,3%) mit Gastroenteritis, sowie in sechs „Infekte der unteren Atemwege“ (UAW) (87,5%). Letzterer lässt sich weiterhin unterteilen in jeweils zwei Fälle von Bronchitis und obstruktiver Bronchitis (je 33,3%), eine Bronchiolitis (16,7%) und eine Pneumonie (16,7%).

Entlassdiagnose	n	%
Infekt der oberen Atemwege	2	12,5
Infekt der unteren Atemwege	14	87,5
Obstruktive Bronchitis	7	50,0
Bronchitis	4	28,6
Bronchiolitis	1	7,1
Pneumonie	2	14,3
Gastroenteritis	1	6,3
Krampfanfall bei Fieber	3	18,8

Tabelle 25 Entlassdiagnose aller hPeV-positiven Patienten

Die durchschnittliche Aufenthaltsdauer aller hPeV-positiven Patienten betrug 6,5 Tage (Spanne 3 – 11 Tage). Kinder mit viraler Koinfektion bleiben im Durchschnitt 5,7 Tage im Krankenhaus (Spanne 3 – 7 Tage), Kinder, die nur eine hPeV-Infektion hatten, blieben 8,6 Tage (Spanne 5 – 11 Tage).

3.5.3 Klinik und Diagnose bezogen auf den hPeV-Genotyp

3.5.3.1 Klinik bei hPeV 1-Infektion

Bei der Mehrzahl der hPeV-positiven Kinder in dieser Studie konnte im NRS hPeV 1 nachgewiesen werden (n = 11). Von den elf Kindern mit hPeV 1 waren sechs Jungen und fünf Mädchen, sie waren im Durchschnitt 1,06 Jahre alt. Fünf Kinder hatten keine zusätzliche virale Koinfektion. Sie blieben im Mittel 6,5 Tage in der Kinderklinik (Spanne 3-11 Tage). Die dokumentierten Symptome der hPeV 1-positiven Patienten finden sich in Tabelle 26.

Diese Kinder erhielten in einem Fall die Enddiagnose „Infekt der oberen Atemwege“, und in zehn Fällen „Infekt der unteren Atemwege“. Der UAW wurde in sechs Fälle von Obstruktiver Bronchitis, zwei Pneumonien, sowie jeweils einen Fall von Bronchitis respektive Bronchiolitis unterteilt. Zusätzlich erhielten

zwei Kinder die Diagnose eines Krampfanfalls bei Fieber, und ein Patient Gastroenteritis.

Symptome	hPeV 1-positive Patienten (n = 11)	Alle hPeV positiven Patienten (n = 16)
	n (%)	n (%)
Husten	9 (81,8)	10 (62,5)
Mund-Rachenraum gerötet	7 (63,6)	10 (62,5)
Rhinitis	5 (45,5)	8 (50,0)
Fieber	7 (63,6)	8 (50,0)
Erbrechen / Diarrhoe	6 (54,5)	8 (50,0)
Tachydyspnoe	5 (45,5)	6 (37,5)
Rasselgeräusche	7 (63,6)	6 (37,5)
Pulmonale Obstruktion	2 (18,2)	3 (18,8)
Krampfanfall	2 (18,2)	3 (18,8)
Exanthem	1 (9,1)	1 (6,3)

Tabelle 26 Symptome bei hPeV1-positiven Patienten

3.5.3.2 Klinik der hPeV 3-Infektion

Eingangsdatum der hPeV 3-positiven Probe war Juni 2004. Die Probe gehört zu einem 0,16 Jahre alten Mädchen, welches gleichzeitig das jüngste Kind unter den hPeV-positiven Patienten war. Sie hatte keine virale Koinfektion. Die erfassten Symptome setzten sich aus hohem Fieber und Tachykardie zusammen, im Röntgen-Thorax fiel zudem eine Peribronchitis auf. Sie erhielt die Diagnose Bronchitis und wurde mit Paracetamol sowie Ampicillin und Gentamycin therapiert. Das Mädchen blieb 6 Tage stationär.

3.5.3.3 Klinik der hPeV 4-Infektion

Der 1,36 Jahre alte Junge mit Nachweis von hPeV4 wurde wegen eines Infektes der oberen Luftwege und einem Krampfanfall bei Fieber behandelt. Das Virus wurde in einer Probe aus dem Dezember 2004 nachgewiesen. Der

Junge hatte eine Koinfektion mit Adenovirus. Seine Symptome waren Rhinitis, geröteter Mund-Rachenraum, Otitis media sowie ein Krampfanfall bei Fieber. Er wurde 6 Tage stationär mit Paracetamol und Otriven therapiert und erhielt 4 Tage lang Amoxicillin.

3.5.3.4 Klinik der hPeV 6-Infektion

Die hPeV 6-positive Probe stammt aus dem Februar 2004. Das Mädchen war 1,22 Jahre alt. Sie hatte keine virale Koinfektion. Die Symptome waren pulmonale Obstruktion, Tachydyspnoe sowie Stridor. Sie war 7 Tage stationär und wurde mit Steroid-Inhalation, Flüssigkeitsersatz und Clarithromycin für 6 Tage behandelt. Sie erhielt die Entlassdiagnose Obstruktive Bronchitis und stenosierende Laryngotracheitis.

3.5.4 Therapie der hPeV-positiven Patienten

Innerhalb des Fragebogens wurde auch die angeordnete Therapie während des Aufenthalts in der Kinderklinik sowie die Entlassmedikation dokumentiert. Es zeigte sich, dass 10 der 16 Kinder eine Antibiotikatherapie erhielten. Diese dauerte im Durchschnitt 6,2 Tage und umfasste maximal zwei verschiedene Antibiotika. Zur Therapie erhielten insgesamt neun Kinder Paracetamol, 13 Kinder erhielten Otriven Nasentropfen. Drei Kinder benötigten zusätzlich Sauerstoff bei erniedrigtem pO₂. Eine Inhalationstherapie mit NaCl 0,9% war bei insgesamt neun Kindern notwendig, in zwei Fällen zusätzliche Inhalation mit Steroiden. Zehn Kinder erhielten eine Flüssigkeitssubstitution.

Eine Tabelle aller hPeV-positiven Kinder findet sich im Anhang (Tabelle 28).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Studie wurden erstmals für Deutschland epidemiologische Daten zur Prävalenz sowie Daten zur Klinik von hPeV-Infektionen bei Atemwegserkrankungen von Kindern erhoben. Die gewonnenen Ergebnisse erlauben Einblicke in die Häufigkeit und das klinische Bild von hPeV-Infektionen in Deutschland und ergänzen die bisher existierenden Daten aus Studien in anderen Ländern.

Für diese Arbeit wurde ein sensitives und spezifisches Real-Time-PCR-System zur Diagnostik von hPeV-Infektionen entwickelt. Die hierfür entworfenen Primer hPeV 538s und hPeV 609a amplifizieren ein 71 bp langes Fragment in der hoch konservierten 5'-UTR der hPeV Genotypen 1-6. Wie die Validierung der Real-Time-PCR zeigte, war die Untersuchungsmethode spezifisch und zuverlässig für die Amplifikation von hPeV-cDNA. Bei einer minimalen Nachweisgrenze von 5,5 c/r ist die Real-Time-PCR zudem sehr sensitiv für die Detektion von hPeV. Eine vergleichbar sensitive Real-Time-PCR wurde nur durch das CDC von Nix et al. entwickelt, sie hatte eine minimale Nachweisgrenze von einer Kopie hPeV 1 [Nix et al., 2008]. In der durch van der Sanden et al. entworfenen Real-Time-PCR lag die minimale Nachweisgrenze bei 53 Kopien im Reaktionsansatz, Benschop et al. hatten eine untere Nachweisgrenze von 400 Kopien hPeV cDNA/PCR [Benschop et al., 2008a; van der Sanden et al., 2008]. Einschränkend hierzu muss jedoch angemerkt werden, dass sich die hier bestimmte untere Nachweisgrenze auf cDNA bezieht und somit nicht vollständig mit einer RNA-Nachweisgrenze vergleichbar ist. Hierzu wäre zunächst die Erstellung von RNA-Transkripten notwendig gewesen um die RNA zu quantifizieren.

4.1 Vergleich der epidemiologischen Daten zur hPeV-Infektion

4.1.1 Prävalenz der hPeV-Infektion

Die ermittelte hPeV-Prävalenz lag bei 2% im untersuchten Patientenkollektiv (n = 16/800). Betrachtet man die Altersgruppe von kleiner gleich zwei Jahren, so liegt die Prävalenz bei 3,29% (n = 14/425). Diese Prävalenz ist geringer im Vergleich zu Studien, welche ausschließlich Stuhlproben untersuchten (Mittelwert Prävalenz 11,28%), oder Studien, die sowohl Stuhl, Liquor und respiratorische Materialien untersuchten (Mittelwert 7,63%).

Betrachtet man aber die Studien, welche ebenfalls respiratorisches Material, wie NRS oder Rachenabstriche, untersuchten, ähneln sich die Zahlen. So fanden Harvala et al. 1,64% ihrer hPeV-Isolate in Rachenabstrichen (Gesamtprävalenz 3,93%, [Harvala et al., 2009]), beziehungsweise ermittelten eine Gesamtprävalenz von 1,22% bei der Untersuchung von NRS und Rachenabstrichen [Harvala et al., 2008]. Bei Watanabe et al. stammten 16 der 41 hPeV-Isolate aus Rachenabstrichen, was in ihrer Untersuchung eine Prävalenz von 0,12% ergeben würde [Watanabe et al., 2007]. Yamamoto et al. isolierten 29 ihrer insgesamt 58 hPeV-Sequenzen aus Rachenabstrichen, die Prävalenz läge damit bei 2,24% [Yamamoto et al., 2009]. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Studie um Pajkrt et al., welche eine Gesamtprävalenz von 15,3% bei der Untersuchung von Stuhlproben ermittelten. Sie untersuchten im Anschluss bei fünf von 31 Patienten, die positiv für hPeV 4 - 6 waren, zusätzlich vorliegende NRS. Hierbei wurde nur in einem NRS ebenfalls hPeV detektiert.

4.1.2 hPeV-Viruslast der Proben

Die nachgewiesene Viruslast der Proben war insgesamt niedrig, bei einem Mittelwert von $1,25 \times 10^5$ Kopien/ml bezogen auf das Ausgangsmaterial und einem Median von $2,25 \times 10^4$ Kopien/ml. Einschränkend hierzu muss erwähnt werden, dass es kein standardisiertes Vorgehen zur Gewinnung des NRS gegeben hatte. Wenige Studien geben bislang die Viruslast ihrer Proben an.

Baumgarte et al. hatten eine hohe Streuung der Viruslast in den Stuhlproben, zwischen 3170 – 502.377.290 Kopien/ ml bzw. g Stuhl, wobei eine der höchsten Viruslasten bei einem gesunden Kind beobachtet wurde [Baumgarte et al., 2008]. Tapia et al. sequenzierten nur Proben mit einer Viruslast von $> 10^3$ Kopien/ ml und fanden sogar Viruslasten $>10^5$ [Tapia et al., 2008]. Hohe Viruslasten konnten auch von Benschop et al. in Liquorproben gezeigt werden (Ct-Werte zwischen 16,18 und 38,8 wobei 10.000 Kopien cDNA/PCR einem Ct-Wert von 33,19 entsprachen) [Benschop et al., 2008a].

Die niedrige Viruslast bei einigen Proben in dieser Studie führte zu einer deutlichen Erschwerung der Sequenzierung. Die Proben konnten umso seltener in der 5'-UTR-Region plus der VP1-Region sequenziert werden, je geringer die Viruslast war. Diese Problematik könnte möglicherweise dazu geführt haben, dass manche Genotypen nicht identifiziert wurden. Es konnte unter den sechzehn wiederholt positiven Proben in 11 Fällen hPeV 1 typisiert werden, einmal hPeV 3, einmal hPeV 4 und einmal hPeV 6. Zwei Proben konnten nicht erfolgreich sequenziert werden. Grundsätzlich lässt sich mittels der verwendeten Primer auch hPeV 2 nachweisen, wie bei Erstellen der Standardkurve gezeigt wurde. Im Rahmen der Untersuchung erfolgte die phylogenetische Zuordnung der Proben zum einen über die sequenzierten 5'-UTR-Region (Primer hPeV 402s und hPeV 662a) und zum anderen über die VP1-Sequenzen (Primer hPeV 2330s und hPeV 3105a). Für die Fälle, in denen beide Sequenzen vorhanden waren, gab es eine Übereinstimmung der ermittelten Genotypen bei allen Proben. Für die weitere Auswertung wurde daher davon ausgegangen, dass dies bei den vier Sequenzen, die nur in einer Region vorlagen, ebenfalls der Fall ist.

4.1.3 Alterstruktur bei hPeV-Infektion

Das Durchschnittsalter der hPeV-positiven Kinder lag bei 1,32 Jahren (Spanne 0,16 - 4,1 Jahre). Auffällig war, dass insgesamt 82,4% der Kinder mit hPeV-Infektion unter zwei Jahren alt waren, aus diesem Alterssegment aber nur

53,2% der gesammelten NRS stammten. Insgesamt waren alle hPeV-Patienten unter fünf Jahre alt. Diese Ergebnisse bestätigen die Altersstruktur, die in anderen Studien gefunden wurde [Khetsuriani, 2005; Tapia et al., 2008; Wolthers et al., 2008].

Die hPeV 3-positive Probe stammte von einem Kind mit 0,16 Jahren, welches gleichzeitig das jüngste Kind unter den positiven Patienten war. Die Beobachtung, dass hPeV 3 vor allem bei sehr jungen Kindern auftritt, machten mehrere Studien, so auch Benschop et al. und van der Sanden et al., die hPeV 3 bei Kindern mit einem Durchschnittsalter von 1,3 respektive 1,9 Monaten fanden [Benschop et al., 2006b; van der Sanden et al., 2008].

4.1.4 Jahreszeitliche Verteilung

Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurden hPeV-Isolate vornehmlich in den Wintermonaten zwischen November und März gefunden. Die saisonale Verteilung ist vergleichbar mit der Beobachtung von Tapia et al. aus Norwegen, welche einen deutlichen Anstieg der hPeV-Nachweise in den Monaten September-Dezember beobachteten und sehr geringe Zahlen zwischen April und Juni [Tapia et al., 2008].

Im Gegensatz dazu stehen unter anderem die Beobachtungen von Abed et al. aus Kanada sowie Harvala et al. aus den Niederlanden, welche den Erkrankungsgipfel in den Sommer- und Herbstmonaten dokumentierten [Abed and Boivin, 2006; Harvala et al., 2008], beziehungsweise für hPeV 1 keine Saisonalität ausmachen konnten. Interessant ist die Differenz zur niederländischen Studie von Harvala et al., die ebenfalls nur respiratorische Materialien untersuchte, wenn man von der Annahme ausgeht, dass respiratorische Infekte in der für sie „typischen“ Zeit, sprich den Wintermonaten, auftreten.

Die Detektion von hPeV 3 im Juni passt zu den Angaben, dass hPeV 3 vornehmlich im Frühling und Sommer nachgewiesen wird [van der Sanden et al., 2008]. Es wird zudem eine Periodizität in Zwei-Jahres-Intervallen beschrieben, mit einer Häufung von hPeV 3 in den geraden Jahren seit 2000 [Harvala et al., 2009; van der Sanden et al., 2008; Wolthers et al., 2008; Yamamoto et al., 2009]. Bei nur einem hPeV 3-Nachweis (im Jahr 2004) erlaubt unsere Studie keine Aussage zu diesem Aspekt.

4.1.5 Koinfektionsrate bei hPeV-Infektion

Es wurde eine hohe Koinfektionsrate von 56,3% beobachtet. Ein ähnliches Ausmaß von Koinfektionen haben auch die Patienten bei Harvala et. al (70%). Geringere Koinfektionsraten werden bei Abed et. al berichtet (20,8%) sie untersuchten auf RSV, AdV, HPIV 3 [Abed and Boivin, 2006]. Pajkrt et al. geben eine Koinfektionsrate von 25% an, sie untersuchten jedoch nur unspezifisch auf Enteroviren [Pajkrt et al., 2009]. Während bei Harvala et al. 88% der Koinfektionen durch Adenovirus bedingt waren, verteilen sich die Koinfektionen in unserer Untersuchung zu gleichen Teilen zwischen RSV und Adenovirus (n=3) sowie auf zwei Fälle von Parainfluenza 1-Virus und einen Fall von Influenza A-Virus. Zusätzlich trat eine vierfach-Infektion mit hBoV, WuPyV, RSV und hPeV auf. Statistisch relevant ($p = 0,04$) war nur die hPIV 1-Infektion, diese trat im Vergleich zum Gesamtkollektiv überproportional häufig auf. Einschränkend muss angeführt werden, dass die zwei Kinder mit dieser Koinfektion Zwillinge waren, welche zeitgleich im Krankenhaus waren.

Die Auswertung der klinischen Angaben erlaubte bei den 16 hPeV positiven Patienten zweimal die Diagnose „Oberer Atemwegsinfekt“ und 14-mal „Unterer Atemwegsinfekt“. Der Vergleich der Symptome zwischen Patienten mit einer Koinfektion sowie Patienten mit reiner hPeV-Infektion zeigte keine signifikanten Unterschiede. Ein eindeutig abgrenzbares klinisches Bild, welches mit der hPeV Infektion assoziiert war, ließ sich nicht ermitteln.

4.2 Diskussion möglicher Probleme der Studie

In der endgültigen Bewertung dieser Untersuchung müssen folgende Aspekte berücksichtigt werden:

Zu Planungsbeginn der Studie waren nur die Genotypen hPeV 1-6 beschrieben. Die verfügbaren Sequenzen dieser Genotypen bildeten die Grundlage zum Design der später verwendeten Primer. Ein retrospektiver durchgeführter Vergleich mit den im Verlauf der Arbeit neu entdeckten Genotypen zeigte eine hohe Übereinstimmung der Basenpaarfolge der Primerregion in der konservierten Region der 5'-UTR (Abb. 6). Die ausgewählten Primer der VP1-Region waren für die neuen Genotypen ebenfalls passend. Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Primer für die Genotypen hPeV 9-13, deren Sequenzen bislang nicht zugänglich sind, oder für noch unbeschriebene Genotypen nicht optimal geeignet sind. Dies mag ein Grund für die Schwierigkeiten bei der Sequenzierung zweier wiederholt positiver Proben sein, welche bis zum Schluss nicht erfolgreich war.

Ein Defizit der Studie ist möglicherweise eine Unterbewertung der Koinfektionsrate. Das durchgeführte IFA-Screening beinhaltete nicht alle viralen respiratorischen Pathogene. So wurden zum Beispiel Rhinovirus- oder Enterovirus-Infektionen nicht erfasst. Aus der Reihe der neueren respiratorischen Viren blieben die u.a. humanen Metapneumoviren unberücksichtigt. Die Koinfektionsrate der Kinder mit hPeV ist somit vermutlich höher als tatsächlich dokumentiert. Diese zusätzlichen Infektionen könnten eine Ursache für die beobachtete respiratorische Symptomatik sein.

Es wurde ein vorselektiertes Studienkollektiv untersucht. Das Kollektiv bestand ausschließlich aus Kindern, welche wegen eines respiratorischen Infekts in die Kinderklinik der Universität Würzburg stationär aufgenommen worden waren. Es wurde im gleichen Zeitraum kein Vergleichskollektiv auf hPeV untersucht mit Kindern, die wegen nicht-respiratorischer Beschwerden aufgenommen worden waren. Diese Vorauswahl führte dazu, dass jedes Kind, bei dem hPeV im NRS

gefunden wurde, die Klinik eines respiratorischen Infekts hatte. Andere klinische Manifestationen wurden nur als Nebenbefunde erfasst. Die Bedeutung von hPeV für ARI konnte somit nur durch ihre Prävalenz im Studienkollektiv sowie die Ausprägung der Klinik ermittelt werden.

Im Rahmen der Datenerhebung wurde retrospektiv für alle 800 Kinder, deren NRS im Institut für Virologie und Immunbiologie eingegangen waren, ein standardisierter Datenbogen ausgefüllt. Diese Daten sind jedoch nicht vollständig in die statistische Auswertung eingegangen, sondern es wurden nur die Fragebögen der hPeV-positiven Kinder ausgewertet. Ein Vergleich der Klinik bei hPeV-Infektion mit der Klinik von Kindern ohne hPeV-Infektion ist im Rahmen dieser Untersuchung nicht erfolgt. Es war bei der Datensammlung zudem kein „numerischer“ Wert zur Bewertung der Schwere der Klinik verteilt worden, was einen objektiven Vergleich der Ausprägung eines klinischen Bildes erschwerte.

Wie aus den serologischen Untersuchungen von Joki-Korpela et al., Ito et al. und Tauriainen et al. hervorgeht, ist eine Infektion mit hPeV im Kindesalter ein häufiges, fast ubiquitär vorkommendes Ereignis [Ito et al., 2004; Joki-Korpela and Hyypia, 1998; Tauriainen et al., 2008]. Auch die prospektive Studie von Tapia et al. zeigt, dass bis zum dritten Lebensjahr fast jedes der Kinder (94%) ihres Studienkollektivs mindestens eine hPeV-Infektionen erlebt hat [Tapia et al., 2008]. In seiner klinischen Relevanz wird hPeV jedoch unterschiedlich behandelt. Zum einen wird hPeV zwar immer wieder bei Patienten mit einer respiratorischen Klinik, wie Pneumonie oder obstruktive Bronchitis, gefunden (siehe Tabelle 2 und 4), allerdings gibt es genug Nachweise, dass ein Nachweis des Virus nicht unbedingt mit der Klinik eines ARI einhergehen muss [Harvala et al., 2008; Tapia et al., 2008].

4.3 Bewertung der Studienergebnisse

4.3.1 Klinische Relevanz von hPeV

Für die Bewertung der klinischen Relevanz von hPeV bei respiratorischen Infekten bei Kindern ergeben sich daher verschiedene Hypothesen:

So ist hPeV am wahrscheinlichsten ein respiratorisches Pathogen, welches nicht regelmäßig zu einer stark ausgeprägten Klinik führt und folglich nur selten im hospitalisierten Patientengut gefunden wird. Es könnte aber auch nur zufällig im Rahmen von respiratorischen Infektionen nachgewiesen werden und als einziges infektiöses Agens nur auftreten, wenn andere virale Pathogene nicht untersucht wurden. Somit würde es die Rolle eines „innocent bystander“ einnehmen. Möglicherweise führt eine hPeV-Infektion auch zur Verstärkung der Klinik eines anderen Pathogens, wie es für die Kombination von RSV und hMPV-Infektionen bekannt ist [Semple et al., 2005].

Bezogen auf die tägliche klinische Praxis bedeuten die gesammelten Informationen vor allem, dass hPeV ein allenfalls seltenes (Ko-)Pathogen bei respiratorischen Infekten bei Kindern sein kann.

4.3.2 Routinemäßige Diagnostik von hPeV

Ob dies die Implementierung einer routinemäßigen Real-Time-PCR für hPeV nötig macht, kommt auf das zu untersuchende Patientenkollektiv an. Die Durchführung einer Real-Time-PCR wäre in der Altersgruppe von Kindern unter fünf Jahren eine Option, um die Diagnose eines viralen Infekts früher stellen zu können. Diese Einschränkung ist in Anbetracht der Altersstruktur bei hPeV-Infektionen notwendig, da nach dem fünften Lebensjahr die Anzahl der hPeV-Detektionen deutlich abnimmt. Möglicherweise ist sogar ein noch engeres Altersfenster, etwa bis zum vollendeten zweiten Lebensjahr, sinnvoll.

Vorausgesetzt dass ARI durch eine hPeV-Infektion verursacht werden, mag der Vorteil der frühzeitigen Diagnose einer viralen Genese in der Verminderung der

Anwendung von Antibiotika liegen. Denn obwohl respiratorische Erkrankungen meist harmlos sind und lediglich einer symptomatischen Therapie bedürften, werden hierbei oft Antibiotika verschrieben [Akkerman et al., 2004]. Auch im untersuchten Kollektiv dieser Studie erhielten knapp 60% der Kinder ($n = 10/16$) im Durchschnitt für 6,2 Tage Antibiotika. Allerdings haben Antibiotika keinen oder nur wenig Vorteile gegenüber Placebo bei Erkrankungen wie Rhinitis, Pharyngitis oder akuter Bronchitis [Arroll and Kenealy, 2005; Del Mar et al., 2006; Smucny et al., 2004]. Allerdings muss einschränkend gesagt werden, dass nicht jeder hPeV-Nachweis auch mit einer aktiven Erkrankung verbunden sein muss.

4.4 Weiterführende Studien zur Rolle von hPeV

Um die Rolle von hPeV als respiratorisches Pathogen vollends zu klären und zu verstehen, ist weitere Forschung in diesem Bereich notwendig.

Zum Thema der Persistenz von hPeV sind bislang nur wenige Informationen vorhanden. Pajkrt et al. konnten für maximal 40 Tage nach Primärdetektion hPeV-RNA in Stuhlproben nachweisen [Pajkrt et al., 2009]. Tapia et al. stellten fest, dass, je höher die maximale Viruslast von hPeV im Stuhl war, desto länger war die Ausscheidungsdauer. Proben mit mehr als 10^3 Kopien/ μ l waren zu 75% nach 50 Tagen frei von hPeV, war die Viruslast aber $>10^5$, so waren sie nur in 40% nach dieser Zeit hPeV-frei [Tapia et al., 2008]. Vergleichbare Studien zur Ausscheidungsdauer von hPeV in respiratorischen Materialien existieren bisher nicht.

Eine Vergleichsstudie, welche alle über einen definierten Zeitraum in der Kinderklinik aufgenommenen Kinder unter fünf Jahren auf das Vorkommen von hPeV untersucht, wäre wünschenswert. Hierdurch wäre eine bessere Beurteilung des assoziierten klinischen Bildes möglich, und asymptomatische Infektionen könnten erkannt werden. Hieran könnte sich eine Studie zur

Ausscheidungsdauer von hPeV anschließen, bei der für alle primär hPeV-positiven Kinder ein zeitlich definiertes follow-up stattfindet.

Daten zu hPeV-Infektionen im ambulanten Bereich haben bislang nur Baumgarte et al. erhoben, ein Kollektiv von primär gesunden Kindern wurde nur von Tapia et al. und Tauriainen et al. untersucht. Die Studien befassten sich jedoch mit dem Nachweis von hPeV in Stuhlproben bzw. mit dem Antikörpernachweis gegen hPeV 1 im Serum [Baumgarte et al., 2008; Tapia et al., 2008] bzw. [Tauriainen et al., 2008]. Vergleichbare Kollektive wurden bis dato für respiratorische Materialsammlungen nicht untersucht.

5 Zusammenfassung

Respiratorische Infektionen sind bei Kindern der Hauptgrund für eine ärztliche Konsultation. In den meisten Fällen werden sie durch virale Erreger ausgelöst. Häufig nachgewiesene respiratorische Viren sind RSV, Adenovirus und Influenza-Virus. In den letzten Jahren wurden weitere Viren als Auslöser von ARI erkannt, so auch die humanen Parechoviren, welche zur Familie der Picornaviridae gehören.

Um Daten über die Prävalenz, die vorherrschenden Genotypen sowie über die Epidemiologie und Klinik von hPeV-Infektionen in Deutschland zu erhalten, wurde eine Real-Time-PCR etabliert und validiert, um hPeV-RNA in klinischem Probenmaterial nachweisen zu können. Hierzu wurde innerhalb der 5'-UTR des hPeV-Genoms eine konservierte Region identifiziert und die Primer sowie die Sonde in diesem Bereich ausgewählt.

Insgesamt wurden 800 NRS aus der Universitätskinderklinik Würzburg aus dem Zeitraum zwischen Januar 2002 und September 2005 untersucht. In 16 der untersuchten Proben ließ sich hPeV-RNA nachweisen (Prävalenz 2%). Von den nachgewiesenen hPeV ließen sich insgesamt 11 Proben als hPeV 1 identifizieren sowie jeweils eine Probe als hPeV 3, hPeV 4 und hPeV 6 einordnen. Alle Kinder waren unter fünf Jahre alt, 56% der Patienten waren weiblich. Die Isolate wurden vor allem in den Monaten zwischen November und März detektiert (n = 14), jedoch auch im April und Juni. Die Koinfektionsrate mit RSV, Adenovirus Parainfluenzaviren, Influenzaviren sowie hBoV und WUPyV lag bei 56%. Die Entlassdiagnose lautete bei zwei Kindern ‚Infekt der oberen Atemwege‘ und bei 14 Kindern ‚Infekt der unteren Atemwege‘.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei hospitalisierten Kindern mit akuten Atemwegsinfekten im Großraum Würzburg hPeV hauptsächlich im Alterssegment unter 2 Jahren vorkommt, hierbei vornehmlich der Genotyp hPeV 1. Insgesamt spielt hPeV jedoch bei viralen respiratorischen Infektionen bei Kindern eine eher untergeordnete Rolle.

6 Anhang

Publikation	Studienzeitraum	Patienten/Probenzahl	Material	hPeV pos.	Prävalenz
[Joki-Korpela and Hyypia, 1998]	Jan. 1991-Feb. 1992	578 Proben insges. daraus 140 Proben untersucht	FS	4 hPeV 1	2,86%
[Corless et al., 2002]	Jan.-Okt. 2000	97 Proben 100 Proben	CSF TS	1 hPeV 1 hPeV	1,03% 1,00%
[Verboon-Maciolek et al., 2005]	1992-2003	5396 Proben; 51 Virus pos.	NPA; TS	2 hPeV 2 hPeV 1	von allen 0,04% von Virus 3,92%
[Benschop et al., 2006b]	Dez. 2000- Jan. 2005	303 (EV-Kultur +), --> 35 PCR - plus 19 n.k. = 54	FS; TS	37 hPeV 27 hPeV 1 10 hPeV 3	11,49%
[Benschop et al., 2008a]	2000-2005	522 Proben	CSF	20 hPeV	3,80%
[Baumgarte et al., 2008]	Jan.-Dez. 2004	118 Hospital 538 Community	FS FS	0 hPeV 9 hPeV 8 hPeV 1 1 hPeV 6	1,67%
[van der Sanden et al., 2008]	2000-2007	1344 Proben; 1076 EV + davon 248 noch nicht typisiert Insges. 163 untersucht	FS, TS, CSF	155 (95%) 55 (35%) hPeV 1 2 (1,3%) hPeV 2 89 (57%) hPeV 3 1 (0,6%) hPeV 4 8 (5%) hPeV 5	11,53%
[Benschop et al., 2008b]	2004-2006	1824 Proben von 1379 Patienten	FS	270 Proben v. 225 Kindern 168 Proben v. 130 Kindern typisiert 64,6% hPeV 1 (109) 22,3% hPeV 3 (37) 7% hPeV 4 (12) hPeV 5 + 6 mind 1x/Jahr	16,30%
[Tapia et al., 2008]	2004-2007	102 Patienten; 1941 Proben 51 hohe Risikogruppe für DM 1 51 ohne erhöhtes DM Risiko	FS	217 hPeV 76% hPeV 1 (166) 13% hPeV 3 (29) 9% hPeV 6 (20) 1% hPeV2 (2)	11,30%
[Wolthers et al., 2008]	2004-2006	840 Proben v. 761 Pat.	CSF	33 hPeV	4,61%

		davon 716 Patienten getestet		keine weitere Typisierung	
[Harvala et al., 2008]	Jan.-Dez. 2007	3844 Proben von 2220 Patienten	NPA, TS	33 Proben v. 27 Patienten (1,2%) 25 hPeV 1 8 hPeV 6	1,22%
[Harvala et al., 2009]	2006-2008	1575 Proben von 1480 Kindern 2295 Proben von 1525 Kindern	CSF TS, FS	14 hPeV; Alle 14 hPeV 3 37 hPeV 1 (16 aus TS, 21 aus FS) 21 hPeV 3 (9 aus TS, 12 aus FS) 2 hPeV 6 (aus FS)	0,95% 3,93%
[Yamamoto et al., 2009]	Jan.-Dez. 2008	1293 Proben von 876 Patienten	TS, FS CSF	58 hPeV von 1293 Proben (40 Pat) Alle hPeV 3 29 aus TS, 24 aus FS, 5 aus CSF	4,48%
[Khetsuriani, 2005]	1970-2005	52812 Enterovirus-Meldungen	CSF, FS, RS	880 hPeV 1 (1,8%) 60 hPeV 2 (0,1%) % der Viren mit bekanntem Genotyp	1,67%
[Watanabe et al., 2007]	1991-2005	13 656 Proben mit 8195 CPE induzierende Viren	FS, TS, CSF	41 hPeV 14 hPeV 1 16 hPeV 3 1 hPeV 4 10 hPeV 6	0,30%
[Li et al., 2009]	2008	65 Personen 56 Personen mit AFP, 9 ohne AFP	FS	6 hPeV 1 hPeV 1 1 hPeV 5 2 hPeV 6 1 hPeV 7	9,20%
[Drexler et al., 2009]	Feb.2006 - Aug.2007	335 Proben	FS	54 hPeV, nur 11 typisiert 7 hPeV 1 2 hPeV 5 1 hPeV 6 1 hPeV 8	16,10%
[Kim Pham et al., 2010]	Sep. 2005 - Aug. 2006	362 Proben	FS	30 hPeV, nur 12 Typisiert 7 hPeV 1 3 hPeV 4 2 hPeV 10	8,29%

[Takao et al., 2001]	1999-2000	2257 Proben von 2105 Kindern	CSF,FS,TS	14 hPeV 1		0,67%
[Pajkrt et al., 2009]	2004-2007	2372 Proben von 1809 Kindern	FS	277 hPeV		15,3%
				20 hPeV 4	davon	11,2%
				6 hPeV 5	hPeV4-6	
				5 hPeV 6		
[Shan et al., 2009]	Mai - Dez. 2008	220 Proben	FS	45 hPeV		20,50%
				23 hPeV 1		
				6 hPeV 4		
				16 hPeV 6		
				Gesamtprävalenz bei 23 berücksichtigten Studien-Kollektiven (148,24 : 23)		6,45%

Tabelle 27 Gesammelte Studien zur Prävalenz von hPeV-Infektionen zu Kapitel 1.3.1, ausgewählt wurden hierzu Studien mit einem ausreichend großen Patientenkollektiv und Untersuchungszeitraum. NPA = Nasen-Rachensekret, TS = Rachenabstrich, FS = Stuhlprobe, CSF = Liquor, DM 1 = Diabetes mellitus Typ 1, CPE = Zytopathischer Effekt, AFP = akute schlaffe Lähmung

Sex	Alter (Jahre)	Aufnahme	hPeV – Genotyp	Viruslast (Kopien/ml)	Koinfektionen	Diagnose	Aufenthaltsdauer (Tage)	Antibiose
M	2,65	2005	hPeV 1	1,0 x 10 ⁴	RSV	Obstruktive Bronchitis, Krampfanfall bei Fieber	4	3 d Ampicillin
M	0,93	2004	hPeV 1	2,7 x 10 ⁵	RSV	Pneumonie	7	5 d Ampicillin
F	1,42	2004	hPeV 1	4,4 x 10 ⁴	Parainfluenza 1	Obstruktive Bronchitis	5	Cefpodoxim
F	1,42	2004	hPeV 1	7,5 x 10 ³	Parainfluenza 1	Obstruktive Bronchitis, Krampfanfall bei Fieber	6	3 d Ampicillin
M	0,52	2003	hPeV 1	5,6 x 10 ⁴	Influenza A	Obstruktive Bronchitis	7	
F	1,45	2002	hPeV 1	2,5 x 10 ³	RSV	Obstruktive Bronchitis, stenosierende Laryngotracheitis	3	
F	4,1	2004	Nicht sequenziert	4,4 x 10 ⁴	Adenovirus	Bronchitis	8	1 d Ampicillin 6 d Clarithromycin
F	1,67	2005	Nicht sequenziert	3,1 x 10 ⁴	Adenovirus	Bronchitis	6	5 d Ampicillin
M	1,36	2004	hPeV 4	3,1 x 10 ³	Adenovirus	Infekt der oberen Luftwege, Krampfanfall bei Fieber	6	4 d Amoxicillin
F	0,43	2005	hPeV 1	4,4 x 10 ⁴		Infekt der oberen Luftwege; Gastroenteritis	5	
F	0,16	2004	hPeV 3	2,5 x 10 ⁴		Bronchitis	6	5 d Ampicillin 4 d Gentamycin
M	1,0	2002	hPeV 1	1,5 x 10 ⁶		Bronchitis	5	
F	0,22	2004	hPeV 1	6,9 x 10 ⁴		Bronchiolitis	9	
M	0,42	2004	hPeV 1	1,9 x 10 ⁴		Obstruktive Bronchitis	11	
F	1,22	2004	hPeV 6	1,3 x 10 ⁴		Obstruktive Bronchitis, stenosierende Laryngotracheitis	7	6 d Clarithromycin
M	1,23	2005	hPeV 1	2,5 x 10 ³		Pneumonie	9	14 d Clarithromycin

Tabelle 28 Tabelle der hPeV positiven Patienten aus der Real-Time-PCR dieser Studie, Material = NRS

Studie	Untersuchungsmethode	Primer
[Joki-Korpela and Hyypia, 1998]	Zellkultur und Immunoperoxidase Färbung ; Reverse Transkription (RT), PCR für hPeV 1 und 2, 237 bp langes Fragments aus 5'-UTR	Primer : ev22 (+) 5'-CCC ACA CAC AGC CAT CCT C-3' (Position 312-328); ev22 (-) 5'-TGC GGG TAC CTT CTG GG-3' (Position 565-581)
[Corless et al., 2002]	Two-step TaqMan RT-PCR für hPeV 1 und 2	Fwd (Par1F): 538' CAC TAG TTG TAA GGC CCA CGA A-559 Rev (Par1R): 616'-GGC CCC AGA TCA GAT CCA-599 Sonde: Position 598-568
[Tapia et al., 2008]	Two-step Real-Time RT-PCR (Hot Star Taq)	Aus [Corless et al., 2002]
[Abed and Boivin, 2006]	Zellkultur, danach RT und PCR	HPeVUniv5': 5'-GCT GAC CTA TGY ATC CCC TAT GT-3' (nt 1358-1379, VP0-Gen) HPeV3': 5'-GTG AAC CCC AYG AAT TTT GGA A-3' (nt 2351-2330, VP1 Gen)
[Boivin et al., 2005]	Zellkultur, RT-PCR für hPeV 3	Wie bei [Ito et al., 2004]; 1. RT-PCR: 810 bp zw. 5'-UTR und VP0-Gen; 2. RT-PCR: 2030 bp zw. VP0 und 2A-Gen
[van der Sanden et al., 2008]	Zellkultur, RT, PCR der 5'-UTR Typisierung in der VP1/2A-Region	Fwd: PE5F: 5'-CCA CGC TYG TGG AYC TTA TG-3' Rev: PE5R: 5'-GGC CTT ACA ACT AGT TTG C-3' (nt 292-553)
[Baumgarte et al., 2008]	Zellkultur, One-step Real-Time RT-PCR für hPeV 1-6; Sequenzierung des 3'-Endes von VP1	HPS: 5'-GTG CCT CTG GGG CCA AAA G-3' (nt 435-453) HPA:5'-TCA GAT CCA TAG TGT GTC GCT TGT TAC-3' (nt 589-613); Sonde: Position 562-586
[Benschop et al., 2006b]	Zellkultur, VP1-OneStep RT-PCR für hPeV 1-3; Amplifikation der gesamten VP1-Region (760 bp)	VP1-parEchoF1: 5'-CCA AAA TTC RTG GGG TTC (nt 2332-2349) VP1-parEchoR1: 5'-AAA CCY TRT CTA AAT AWG C (nt 3090-3071)
[de Vries et al., 2008]	Zellkultur, VP1-RT-PCR; VIDISCA	Primer aus [Benschop et al., 2006a]

[Wolthers et al., 2008]	RT mit random hexamer, Real-Time 5'-UTR-RT-PCR	Primer: ParechoF31 und K30 aus [Oberste et al., 1998] und [Benschop et al., 2008a]
[Harvala et al., 2008]	RT, dann nested RT-PCR; Sequenzierung der VP3/VP1 Übergangsregion (nt 2090/2523) und (nt 2159/2458)	Outer sense: 5' GGG TGG CAG ATG GCG TGC CAT AA (253); outer antisense: 5'-CCT RCG GTA CCT TCT GGG CAT CC (583) Inner sense: 5'-YCA CAC AGC CAT CCT CTA GTA AG (313); Inner antisense: 5'-GTG GGC CTT ACA ACT AGT GTT TG (556)
[Benschop et al., 2008b]	Real-Time RT-PCR Sequenzierung in VP1-Region	RT-PCR: Parecho F31 und K30 [Oberste et al., 1998] Sequenzierung: VP1-parEchoF12: 5'-CCA RAA YTC ITG GGG YTC-3' VP1-parEchoR12: 5'-AAI CCY CTR TCY ARR TAW GC-3'
[Harvala et al., 2009]	RT nested PCR mit 5'-UTR-Primern [Harvala et al., 2008]	Sequenzierung zw. 2182-2437
[Yamamoto et al., 2009]	Zellkultur, Neutralisation, RT, 5'-UTR-RT-PCR	Primer von [Corless et al., 2002], danach Sequenzierung wie bei [Ito et al., 2004]
[Wakatsuki et al., 2008]	Zellkultur, RT-PCR Sequenzierung der VP1-Region	Primer von [Ito et al., 2004] und [Oberste et al., 1998]
[Verboon-Macielek et al., 2008]		Primer wie [Benschop et al., 2006a] und [Abed and Boivin, 2006]
[Benschop et al., 2008a]	Real-Time RT-PCR für hPeV 1-6	Fwd: ParechoF31: 5'-CTG GGG CCA AAA GCC A-3' (nt 441-457) Rev: K30 [Oberste et al., 1998] Sonde 1: (6'FAM)-HpeV-WT-MBG, Sonde 2: (VIC)-IC-MBG
[Pajkrt et al., 2009]	RT-PCR, Sequenzierung der VP1-Region	Primer wie [Benschop et al., 2008a]
[Chen et al.,	Zellkultur, OneStep RT-PCR	Primer VP1-F1 und VP1-R1 von [Benschop et al., 2006b]

2009]	Amplifikation eines 760bp langen Fragments	
[Shan et al., 2009]	Nested RT-PCR für hPeV 1-8	Outside: L5'-CTA GAG AGC TTG GCC GTC GG-3' Outside: R5'-GTA CCT TCT GGG CAT CCT TC-3' Inside: L5'-GGC CTT ATA CCC CGA CTT GC-3' Inside: R5'-GGC CTT ACA ACT AGT GTT TG-3'
[Pham et al., 2009]	RT, PCR Sequenzierung in VP1	Primer ev22 (+) und ev22 (-) von [Joki-Korpela and Hyypia, 1998]; für Sequenzierung Primer von [Benschop et al., 2006b] sowie Primer zw. (+) 2162-2181 und (-) 3237-3218
[Ito et al., 2004]	Zellkultur, RT, RT-PCR für 810bp zw. 5'-UTR und VP0 Sequenzierung zw. VP0 und 2A-Region	Fwd: E23P1:5'-CCG YAG GTA ACA AGW GAC AT-3' Rev: HPV-N1:5'-TAG GGG ATA CAT ARG TCR GCY T-3' Sequenzierung: HPV-N1-S und RGD-R (2030 bp)
[Benschop et al., 2006a]	5'-UTR-PCR für hPeV 1-6, dann 5'-RACE	PCR wie [Benschop et al., 2006b]
[Watanabe et al., 2007]	Zellkultur, 3'RACE und 5'RACE ; Antiserumneutralisation	RACE-Primer
[Li et al., 2009]	Sequence independent PCR, Sequence similarity searches	Randomisierte RT und PCR Primer
[Drexler et al., 2009]	RT-PCR	Primer wie bei [Baumgarte et al., 2008]
[Kim Pham et al., 2010]	RT, PCR Sequenzierung mittels Two-step PCR in VP1-Region	Primer ev22 (+) und ev22 (-) [Joki-Korpela and Hyypia, 1998]; 1. PCR mit Primern Cap-ParEcho-F: 5'-TCH ACW TGG ATG MGR AAR AC-3' und Cap-ParEcho-R: 5'-TCY ARY TCA CAY TCY TCY TC-3', Nested PCR mit innerem Primerpaar von [Benschop et al., 2006b]
[Benschop et al.,	OneStep RT-PCR	OL1505: 5'-GTG TAC AGG ATG ATC ATG ATG GA-3' (nt 6419-6441)

2008c]	Primer in konservierten Region innerhalb von 3Dpol	OL1501: 5'-CTT AGT CAA ACA CCA TGG GCA-3' (nt 7253-7233)
[Jokela et al., 2005]	Multiplex RT-PCR (nonnested)	HPeV 1B (+) TGC CTC TGG GGC CAA AAG (nt 430-447) HPeV 1(-) CAG GGA TCC CCC CTG GGT TT (nt 662-681) Sonde: nt 599-615
[Nix et al., 2008]	Zellkultur, OneStep, quantitative TaqMan Real-Time PCR der konservierten 5'-UTR für hPeV 1-6 und LV	Degenerierte PCR-Primer (AN345 und AN344) aus der konservierten Region (nt 421-446 und 615-594) Sonde: nt 556-582
[Noordhoek et al., 2008]	Zellkultur, Genotypisierung TwoStep Real-Time PCR	Primer aus [Corless et al., 2002]

Tabelle 29 Verwendete Primer und Sonden für hPeV in ausgewählten Studien

7 Literatuurverzeichnis

- Abed Y, Boivin G. 2006. Human parechovirus types 1, 2 and 3 infections in Canada. *Emerg Infect Dis* 12(6):969-975.
- Akkerman AE, van der Wouden JC, Kuyvenhoven MM, Dieleman JP, Verheij TJ. 2004. Antibiotic prescribing for respiratory tract infections in Dutch primary care in relation to patient age and clinical entities. *J Antimicrob Chemother* 54(6):1116-1121.
- Al-Sunaidi M, Williams CH, Hughes PJ, Schnurr DP, Stanway G. 2007. Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *J Virol* 81(2):1013-1021.
- Arroll B, Kenealy T. 2005. Antibiotics for the common cold and acute purulent rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*(3):CD000247.
- Baumgarte S, de Souza Luna LK, Grywna K, Panning M, Drexler JF, Karsten C, Huppertz HI, Drosten C. 2008. Prevalence, types, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a sixth parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis. *J Clin Microbiol* 46(1):242-248.
- Benschop K, Molenkamp R, van der Ham A, Wolthers K, Beld M. 2008a. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *J Clin Virol* 41(2):69-74.
- Benschop K, Thomas X, Serpenti C, Molenkamp R, Wolthers K. 2008b. High prevalence of human Parechovirus (HPeV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. *J Clin Microbiol* 46(12):3965-3970.
- Benschop KS, de Vries M, Minnaar RP, Stanway G, van der Hoek L, Wolthers KC, Simmonds P. 2009. Comprehensive full-length sequence analyses of human parechoviruses: diversity and recombination. *J Gen Virol* 91(Pt 1):145-154.
- Benschop KS, Schinkel J, Luken ME, van den Broek PJ, Beersma MF, Menelik N, van Eijk HW, Zaaijer HL, VandenBroucke-Grauls CM, Beld MG, Wolthers KC. 2006a. Fourth human parechovirus serotype. *Emerg Infect Dis* 12(10):1572-1575.
- Benschop KS, Schinkel J, Minnaar RP, Pajkrt D, Spanjerberg L, Kraakman HC, Berkhout B, Zaaijer HL, Beld MG, Wolthers KC. 2006b. Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis* 42(2):204-210.

- Benschop KS, Williams CH, Wolthers KC, Stanway G, Simmonds P. 2008c. Widespread recombination within human parechoviruses: analysis of temporal dynamics and constraints. *J Gen Virol* 89(Pt 4):1030-1035.
- Birenbaum E, Handsher R, Kuint J, Dagan R, Raichman B, Mendelson E, Linder N. 1997. Echovirus type 22 outbreak associated with gastrointestinal disease in a neonatal intensive care unit. *Am J Perinatol* 14(8):469-473.
- Boivin G, Abed Y, Boucher FD. 2005. Human parechovirus 3 and neonatal infections. *Emerg Infect Dis* 11(1):103-105.
- Boonyakiat Y, Hughes PJ, Ghazi F, Stanway G. 2001. Arginine-glycine-aspartic acid motif is critical for human parechovirus 1 entry. *J Virol* 75(20):10000-10004.
- Brodzinski H, Ruddy RM. 2009. Review of new and newly discovered respiratory tract viruses in children. *Pediatr Emerg Care* 25(5):352-360; quiz 361-353.
- Chanock R, Roizman B, Myers R. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* 66(3):281-290.
- Chanock RM, Kim HW, Vargosko AJ, Deleva A, Johnson KM, Cumming C, Parrott RH. 1961. Respiratory syncytial virus. I. Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases in children. *JAMA* 176:647-653.
- Chen BC, Cheng MF, Huang TS, Liu YC, Tang CW, Chen CS, Chen YS. 2009. Detection and identification of human parechoviruses from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65(3):254-260.
- Chiu SS, Chan KH, Chen H, Young BW, Lim W, Wong WH, Peiris JS. 2010. Virologically confirmed population-based burden of hospitalization caused by respiratory syncytial virus, adenovirus, and parainfluenza viruses in children in Hong Kong. *Pediatr Infect Dis J* 29(12):1088-1092.
- Chung JY, Han TH, Kim SW, Kim CK, Hwang ES. 2007. Detection of viruses identified recently in children with acute wheezing. *J Med Virol* 79(8):1238-1243.
- Coller BA, Chapman NM, Beck MA, Pallansch MA, Gauntt CJ, Tracy SM. 1990. Echovirus 22 is an atypical enterovirus. *J Virol* 64(6):2692-2701.
- Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB, Mutton KJ. 2002. Development and evaluation of a 'real-time' RT-PCR

- for the detection of enterovirus and parechovirus RNA in CSF and throat swab samples. *J Med Virol* 67(4):555-562.
- de Vries M, Pyrc K, Berkhout R, Vermeulen-Oost W, Dijkman R, Jebbink MF, Bruisten S, Berkhout B, van der Hoek L. 2008. Human parechovirus type 1, 3, 4, 5, and 6 detection in picornavirus cultures. *J Clin Microbiol* 46(2):759-762.
- Del Mar CB, Glasziou PP, Spinks AB. 2006. Antibiotics for sore throat. *Cochrane Database Syst Rev*(4):CD000023.
- Drexler JF, Grywna K, Stocker A, Almeida PS, Medrado-Ribeiro TC, Eschbach-Bludau M, Petersen N, da Costa-Ribeiro-Jr H, Drosten C. 2009. Novel human parechovirus from Brazil. *Emerg Infect Dis* 15(2):310-313.
- Ehlken B, Ihorst G, Lippert B, Rohwedder A, Petersen G, Schumacher M, Forster J. 2005. Economic impact of community-acquired and nosocomial lower respiratory tract infections in young children in Germany. *Eur J Pediatr* 164(10):607-615.
- Ehrnst A, Eriksson M. 1993. Epidemiological features of type 22 echovirus infection. *Scand J Infect Dis* 25(3):275-281.
- Ehrnst A, Eriksson M. 1996. Echovirus type 23 observed as a nosocomial infection in infants. *Scand J Infect Dis* 28(2):205-206.
- Faria NR, de Vries M, van Hemert FJ, Benschop K, van der Hoek L. 2009. Rooting human parechovirus evolution in time. *BMC Evol Biol* 9:164.
- Figueroa JP, Ashley D, King D, Hull B. 1989. An outbreak of acute flaccid paralysis in Jamaica associated with echovirus type 22. *J Med Virol* 29(4):315-319.
- Gardner PS. 1968. Virus infections and respiratory disease of childhood. *Arch Dis Child* 43(232):629-645.
- Ghazi F, Hughes PJ, Hyypia T, Stanway G. 1998. Molecular analysis of human parechovirus type 2 (formerly echovirus 23). *J Gen Virol* 79 (Pt 11):2641-2650.
- Grist NR, Bell EJ, Assaad F. 1978. Enteroviruses in human disease. *Prog Med Virol* 24:114-157.
- Harvala H, Robertson I, Chieochansin T, McWilliam Leitch EC, Templeton K, Simmonds P. 2009. Specific Association of Human Parechovirus Type 3 with Sepsis and Fever in Young Infants, as Identified by Direct Typing of Cerebrospinal Fluid Samples. *J Infect Dis* 199(12):1753-1760.

- Harvala H, Robertson I, McWilliam Leitch EC, Benschop K, Wolthers KC, Templeton K, Simmonds P. 2008. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *J Clin Microbiol* 46(10):3446-3453.
- Hyypia T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, Kalkkinen N, Auvinen P, Kinnunen L, Stanway G. 1992. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(18):8847-8851.
- Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K. 2004. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol* 85(Pt 2):391-398.
- Jokela P, Joki-Korpela P, Maaronen M, Glumoff V, Hyypia T. 2005. Detection of human picornaviruses by multiplex reverse transcription-PCR and liquid hybridization. *J Clin Microbiol* 43(3):1239-1245.
- Joki-Korpela P, Hyypia T. 1998. Diagnosis and epidemiology of echovirus 22 infections. *Clin Infect Dis* 27(1):129-136.
- Khetsuriani N, LaMonte-Fowlkes, A., Oberste, M.S., Pallansch, M.A. 2005. Enterovirus Surveillance ---United States, 1970--2005.
- Kim Pham NT, Trinh QD, Takanashi S, Abeysekera C, Abeygunawardene A, Shimizu H, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. 2010. Novel human parechovirus, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis* 16(1):130-132.
- King AMQ, Brown, F., Christian, P., *et al.* . 1999. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses.* Academic Press(New York, San Diego):996.
- Knowles NJ, Hovi, T, Hyypiä, T., King, A.M.Q., Lindberg, M., Pallansch, M.A., Palménberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and Zell, R. . 2011. *Picornaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J(San Diego: Elsevier):pp 855-880.
- Le Gall O, Christian P, Fauquet CM, King AM, Knowles NJ, Nakashima N, Stanway G, Gorbalenya AE. 2008. Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. *Arch Virol* 153(4):715-727.
- Legay V, Chomel JJ, Fernandez E, Lina B, Aymard M, Khalfan S. 2002. Encephalomyelitis due to human parechovirus type 1. *J Clin Virol* 25(2):193-195.

- Levorson RE, Jantausch BA, Wiedermann BL, Spiegel HM, Campos JM. 2009. Human parechovirus-3 infection: emerging pathogen in neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 28(6):545-547.
- Li L, Victoria J, Kapoor A, Naeem A, Shaukat S, Sharif S, Alam MM, Angez M, Zaidi SZ, Delwart E. 2009. Genomic characterization of novel human parechovirus type. *Emerg Infect Dis* 15(2):288-291.
- McCormick A, Fleming, D., Charlton, J. 1995. Morbidity Statistics from General Practice, Forth national study 1991-1992. A study carried out by the Royal College of General Practitioners, the Office of Population Censuses and Surveys, and the Department of Health.
- Monto AS, Sullivan KM. 1993. Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved. *Epidemiol Infect* 110(1):145-160.
- Niklasson B, Almqvist PR, Hornfeldt B, Klitz W. 2009. Sudden infant death syndrome and Ljungan virus. *Forensic Sci Med Pathol* 5(4):274-279.
- Niklasson B, Kinnunen L, Hornfeldt B, Horling J, Benemar C, Hedlund KO, Matskova L, Hyypia T, Winberg G. 1999. A new picornavirus isolated from bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Virology* 255(1):86-93.
- Niklasson B, Samsioe A, Papadogiannakis N, Kawecki A, Hornfeldt B, Saade GR, Klitz W. 2007. Association of zoonotic Ljungan virus with intrauterine fetal deaths. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79(6):488-493.
- Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. 2008. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 46(8):2519-2524.
- Noordhoek GT, Weel JF, Poelstra E, Hooghiemstra M, Brandenburg AH. 2008. Clinical validation of a new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and parechoviruses, and implications for diagnostic procedures. *J Clin Virol* 41(2):75-80.
- Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. 1998. Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enteroviruses. *Virus Res* 56(2):217-223.
- Pajkrt D, Benschop KS, Westerhuis B, Molenkamp R, Spanjerberg L, Wolthers KC. 2009. Clinical characteristics of human parechoviruses 4-6 infections in young children. *Pediatr Infect Dis J* 28(11):1008-1010.
- Palmenberg AC. 1990. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol* 44:603-623.

- Pathak HB, Arnold JJ, Wiegand PN, Hargittai MR, Cameron CE. 2007. Picornavirus genome replication: assembly and organization of the VPg uridylylation ribonucleoprotein (initiation) complex. *J Biol Chem* 282(22):16202-16213.
- Pham NT, Trinh QD, Khamrin P, Maneekarn N, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. 2009. Diversity of human parechoviruses isolated in stool samples collected from Thai children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol*.
- Rueckert RR. 1996. Picornaviridae: The viruses and their replication. In *Field's Virology*, Fields BN, Knipe DM, Howley PM *et al.* (eds) Raven Press(New York):609-654.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238(4826):491-497.
- Seal LA, Jamison RM. 1984. Evidence for secondary structure within the virion RNA of echovirus 22. *J Virol* 50(2):641-644.
- Sedmak G, Nix WA, Jentzen J, Haupt TE, Davis JP, Bhattacharyya S, Pallansch MA, Oberste MS. 2010. Infant Deaths Associated with Human Parechovirus Infection in Wisconsin. *Clin Infect Dis*.
- Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, Shears P, Smyth RL, Hart CA. 2005. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 191(3):382-386.
- Shan TL, Guo W, Cui L, Shang XG, Dai XQ, Yuan CL, Yu Y, Zhang W, Zhu JG, Shen Q, Yang ZB, Hua XG. 2009. The first detection of human parechovirus infections in China. *J Clin Virol* 45(4):371-372.
- Shaver DN, A.L. Barron, and D.T. Karzon. 1961. Distinctive cytopathology of ECHO viruses type 22 and 23. *Proc Soc Exp Biol Med* 106:648-652.
- Smucny J, Fahey T, Becker L, Glazier R. 2004. Antibiotics for acute bronchitis. *Cochrane Database Syst Rev*(4):CD000245.
- Stanway G, Kalkkinen N, Roivainen M, Ghazi F, Khan M, Smyth M, Meurman O, Hyypia T. 1994. Molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a new picornavirus group. *J Virol* 68(12):8232-8238.
- Takao S, Fukuda S, Shimazu Y, Noda M, Tokumoto S. 2001. The isolation of human parechovirus 1 from cases of acute respiratory illness in children. *Jpn J Infect Dis* 54(1):36-38.

- Tamm I, Eggers HJ. 1962. Differences in the selective virus inhibitory action of 2-(alpha-hydroxybenzyl)-benzimidazole and guanidine HCl. *Virology* 18:439-447.
- Tapia G, Cinek O, Witso E, Kulich M, Rasmussen T, Grinde B, Ronningen KS. 2008. Longitudinal observation of parechovirus in stool samples from Norwegian infants. *J Med Virol* 80(10):1835-1842.
- Tauriainen S, Oikarinen S, Taimen K, Laranne J, Sipila M, Lonrot M, Ilonen J, Simell O, Knip M, Hyoty H. 2008. Temporal relationship between human parechovirus 1 infection and otitis media in young children. *J Infect Dis* 198(1):35-40.
- Tolf C, Gullberg M, Johansson ES, Tesh RB, Andersson B, Lindberg AM. 2009. Molecular characterization of a novel Ljungan virus (Parechovirus; Picornaviridae) reveals a fourth genotype and indicates ancestral recombination. *J Gen Virol* 90(Pt 4):843-853.
- Tregoning JS, Schwarze J. 2010. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev* 23(1):74-98.
- van der Sanden S, de Bruin E, Vennema H, Swanink C, Koopmans M, van der Avoort H. 2008. Prevalence of human parechovirus in the Netherlands in 2000 to 2007. *J Clin Microbiol* 46(9):2884-2889.
- Verboon-Macielek MA, Groenendaal F, Hahn CD, Hellmann J, van Loon AM, Boivin G, de Vries LS. 2008. Human parechovirus causes encephalitis with white matter injury in neonates. *Ann Neurol* 64(3):266-273.
- Verboon-Macielek MA, Krediet TG, Gerards LJ, Flier A, van Loon TM. 2005. Clinical and epidemiologic characteristics of viral infections in a neonatal intensive care unit during a 12-year period. *Pediatr Infect Dis J* 24(10):901-904.
- Wakatsuki K, Kawamoto D, Hiwaki H, Watanabe K, Yoshida H. 2008. Identification and characterization of two strains of human parechovirus 4 isolated from two clinical cases in Fukuoka City, Japan. *J Clin Microbiol* 46(9):3144-3146.
- Wasem S, Weichert S, Walther S, Weigl JA, Puppe W, Ihorst G, Schmitt HJ, Forster J. 2008. Lower respiratory tract disease in children: constant pathogens - constant management?! *Klin Padiatr* 220(5):291-295.
- Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fujii M. 2007. Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerg Infect Dis* 13(6):889-895.

- Weigl JA, Puppe W, Belke O, Neususs J, Bagci F, Schmitt HJ. 2005. The descriptive epidemiology of severe lower respiratory tract infections in children in Kiel, Germany. *Klin Padiatr* 217(5):259-267.
- Wigand R, Sabin AB. 1961. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Arch Gesamte Virusforsch* 11:224-247.
- Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. 2002. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect Dis* 2(1):25-32.
- Williams CH, Panayiotou M, Girling GD, Peard CI, Oikarinen S, Hyoty H, Stanway G. 2009. Evolution and conservation in human parechovirus genomes. *J Gen Virol* 90(Pt 7):1702-1712.
- Wolthers KC, Benschop KS, Schinkel J, Molenkamp R, Bergevoet RM, Spijkerman IJ, Kraakman HC, Pajkrt D. 2008. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children. *Clin Infect Dis* 47(3):358-363.
- Yamamoto M, Abe K, Kuniyori K, Kunii E, Ito F, Kasama Y, Yoshioka Y, Noda M. 2009. Epidemic of human parechovirus type 3 in Hiroshima city, Japan in 2008. *Jpn J Infect Dis* 62(3):244-245.

8 Danksagung

Großer Dank gilt als erstes Herrn Dr. Benedikt Weissbrich für das Angebot des Themas, für seine Hilfe im Entwicklungsprozess sowie für seine geduldige und qualifizierte Kommentierung der wechselnden Fassungen der nun hier präsentierten Dissertation.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Axel Rethwilm für die Bereitschaft mich als Doktorandin an seinem Institut anzunehmen.

Dank gilt weiterhin Dr. Florian Neske, der als Betreuer dieser Arbeit eine große Hilfe und ein elementarer Faktor für deren Gelingen war.

Dr. Jörg Schubert danke ich für seine Bereitschaft meine Fragen immer wieder kompetent zu beantworten.

Weiterhin danke ich Christiane Prifert für die großartige Hilfe bei der Erstellung der Stammbäume.

Besonderer Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Abteilung für Virusdiagnostik, für ihre kompetente Anleitung und Hilfe sowie für die freundliche Atmosphäre.

Unendlich viel Dank, Lob und Anerkennung verdienen meine Eltern, die mich im Leben sowie auf meinem akademischen Weg, immer voller Unterstützung und Lebensfreude begleitet haben.

Danke für die immerwährende Motivation und Inspiration!

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Friederike Regina Ruf
Geburtsort	Offenbach am Main
Geburtsdatum	01.12.1983

Schul- und Universitätslaufbahn

1990 - 1994	Pestalozzi-Grundschule, Aschaffenburg
1994 - 2000	Deutsche Schule Washington, D.C., USA
2000 - 2003	Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Aschaffenburg
Juni 2003	Abitur
2003 - 2009	Studium der Humanmedizin an der Julius- Maximilians-Universität in Würzburg
August 2005	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August - Dezember 2008	Praktisches Jahr, Plastische Chirurgie und Orthopädie, Inselspital Bern
Dezember 08 - März 2009	Praktisches Jahr, Anästhesie, Uniklinikum Würzburg
April - Juni 2009	Praktisches Jahr, Innere Medizin, Uniklinikum Würzburg
November 2009	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dezember 2009 – April 2010	Promotionsstudium Humanmedizin
Seit Mai 2010	Assistenzärztin am Zentrum für Innere Medizin IV, Allgemeine Innere und Nephrologie am Robert Bosch Krankenhaus, Stuttgart

Aschaffenburg, 27.10. 2013