

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

Molekulare Epidemiologie des Respiratory Syncytial Virus
bei Kindern mit Atemwegsinfektionen im Zeitraum von 2002 bis 2006

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Daniel Schneiderbanger

aus Hallstadt

Würzburg, Februar 2010

Referent: Prof. Dr. med. Axel Rethwilm

Koreferent: Prof. Dr. med. Johannes Liese

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 20.10.2010

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Entdeckung und Namensgebung	1
1.2 Übertragung und Pathogenese der RSV-Infektion	2
1.3 Klinik der RSV-Infektion	2
1.4 Diagnostik und Therapie	3
1.5 Epidemiologie.....	4
1.6 Klassifikation und Aufbau des RS-Virus	5
1.7 Bedeutung des G-Gens bei RSV	5
1.8 Bisherige phylogenetische Studien.....	6
1.9 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Probenmaterial.....	8
2.2 Extraktion	8
2.3 Reverse Transkription	9
2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	10
2.5 Aufreinigung und Ansatz der Sequenzierreaktion.....	12
2.6 Phylogenetische Analyse.....	13
2.7 Statistische Analyse.....	15
3 Ergebnisse.....	16
3.1 Patientenkollektiv	16
3.2 Nukleinsäuren-Sequenzen	16
3.2.1 Stammbäume	16
3.2.2 Typ A-Genotypen	19
3.2.3 Typ B-Genotypen	20
3.3 Aminosäuren-Sequenzen.....	21
3.3.1 Längendifferenzen bei Typ A- und B-Genotypen.....	21
3.3.2 Variabilitäten bei Typ A- und B-Genotypen	21
3.4 Zeitliche Zirkulationsmuster der Typen und Genotypen.....	22
3.5 Erkrankungen – URTI und LRTI	24
3.6 Identische Sequenzen	25

3.7 Infektionen bei Geschwistern und Reinfektionen	26
4 Diskussion	28
4.1 Zirkulationsmuster und Prävalenz bei Typ A- und B-Viren	28
4.2 Genotypen.....	28
4.3 Genetische und antigenetische Variabilität	30
4.4 Genotyp BA.....	31
4.5 Genotyp BWUE.....	32
4.6 Unterschiede zwischen den RSV-Stämmen hinsichtlich der Virulenz	33
4.7 Reinfektion	33
4.8 Problematik unterschiedlicher Genotypisierungsmethoden	34
4.9 Einschränkungen der vorliegenden Arbeit	35
5 Zusammenfassung	37
6 Abkürzungsverzeichnis	38
7 Literaturverzeichnis.....	39
8 Anhang	43
9 Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Entdeckung und Namensgebung

Das humane Respiratory Syncytial Virus (RSV; Abb. 1) ist weltweit verbreitet. Entdeckt wurde das Virus 1956 durch Morris et al. bei einem an Rhinitis erkrankten Schimpansen. Morris nannte den neuen Erreger zunächst „Chimpanzee Coryza Agent“ (CCA). Die Frage, ob der neue Erreger in der Lage sei Menschen zu infizieren, beantworteten schließlich Chanock et al., als sie Untersuchungsmaterial von zwei Kindern erhielten, welche an Bronchopneumonie bzw. Laryngotracheitis erkrankt waren. Es stellte sich heraus, dass die von den erkrankten Kindern gewonnenen Isolate nicht von CCA zu unterscheiden waren. Bei weiteren Untersuchungen an Kindern mit Atemwegsinfektionen wurde die Bedeutung als Humanpathogen immer offensichtlicher. Die Weiterführung unter der Bezeichnung „chimpanzee coryza agent“ erschien daher unangemessen, und unter Bezugnahme auf den zytopathogenen Effekt wurde es in RSV umbenannt [McCarthy and Hall, 1995]. RSV ist die Hauptursache für Bronchiolitis und Pneumonie bei Kindern, welche jünger als ein Jahr alt sind, und ist allein in den USA für 125000 Hospitalisationen und 450 Todesfälle jährlich verantwortlich [Black, 2003; McIntosh, 2000].

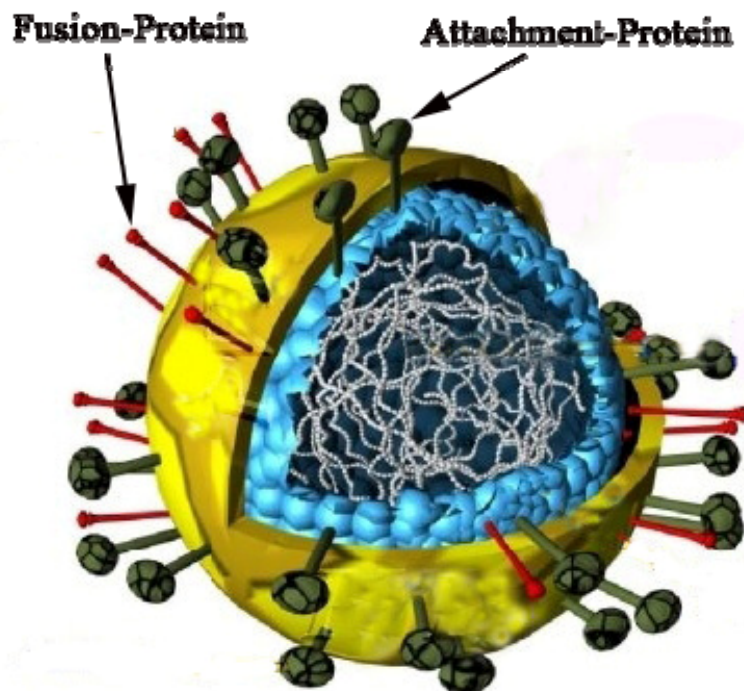


Abbildung 1. Schematischer Aufbau des RS-Virus
modifiziert nach: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fr-index.htm>

1.2 Übertragung und Pathogenese der RSV-Infektion

RSV ist ein hochkontagiöses Pathogen. Die Übertragung erfolgt vor allem durch direkten Kontakt mit RSV-haltigem Sekret aus dem Respirationstrakt. Meist erfolgt die Verbreitung über Hand-zu-Nase-Kontakte oder Hand-zu-Auge-Inokulation, selten findet die Übertragung primär aerogen statt. Die Virusausscheidung beginnt bereits 24 bis 48 Stunden vor Auftreten der ersten klinischen Symptome und persistiert für ca. eine Woche. Dabei kann die Virusausscheidung bei Frühgeborenen und immunsupprimierten Kindern noch länger dauern. Die Inkubationszeit beträgt meist drei bis fünf Tage [Black, 2003; Kreth and Schuster, 2005; McIntosh, 2000].

RSV infiziert die Flimmerepithelzellen des Respirationstrakts, welche innerhalb der ersten 24 Stunden nekrotisieren. Im Rahmen der reaktiven Entzündungsreaktion erfolgt die peribronchiale Infiltration mit Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophilen Granulozyten und Makrophagen sowie die Bildung eines Mukosaödems. Dies führt zu einer peripheren Atemwegsobstruktion, welche bei Kindern aufgrund des geringen Lumens des Bronchialsystems die Ventilation stark beeinträchtigen kann [Kreth and Schuster, 2005; Piedra et al., 2002].

1.3 Klinik der RSV-Infektion

Das klinische Bild einer RSV-Infektion weist eine deutliche Altersabhängigkeit auf. Während Neugeborene unter Infekten der oberen Atemwege leiden, stehen bei Säuglingen Bronchiolitis und Pneumonie im Vordergrund. Bei Klein- und Schulkindern tritt eine RSV-Infektion mit Pharyngitis, Bronchitis, Krupp, Otitis media und Pneumonie in Erscheinung. Hervorzuheben ist, dass in der Altersgruppe der Säuglinge und Kleinkinder 45-75 % der Bronchiolitiden und 15-25 % der Pneumonien durch RSV verursacht werden [Black, 2003; Kreth and Schuster, 2005; McIntosh, 2000]. Auch im Jugendlichen- und Erwachsenenalter sind RSV-Infektionen häufig und äußern sich meist als „banale Erkältung“ [Collins et al., 2001; Haller et al., 2004].

Die meisten primären RSV-Infektionen erfolgen im Alter von sechs Wochen bis zwei Jahren und verlaufen in ca. 40 % der Fälle symptomatisch. Meist zeigen sich dabei klinische Zeichen einer Infektion der unteren Atemwege: die betroffenen Kinder entwickeln einen zunehmenden keuchenden Husten, Dyspnoe und meist nur leicht

erhöhte Körpertemperatur. In schweren Fällen liegen zudem Tachypnoe mit Nasenflügeln und thorakalen Einziehungen, Zyanose und Tachykardie vor. Bei Früh- und Neugeborenen kann eine RSV-Infektion mit plötzlich auftretenden teils massiven Apnoen, Irritabilität, Trinkverweigerung und Lethargie einhergehen, ohne dass äußere Zeichen eines Atemwegsinfekts vorliegen [Kreth and Schuster, 2005; McIntosh, 2000]. Frühgeborene, Kinder mit konnatalen Herzfehler, chronischer Lungenerkrankung oder einer Immunschwäche bzw. Immunsuppression haben ein höheres Risiko, einen schweren Verlauf einer RSV-Infektion zu entwickeln [Black, 2003]. So müssen bis zu 2 % aller Kinder mit einer RSV-Infektion aufgrund der Schwere des Krankheitsbildes hospitalisiert werden. Die Letalität dieser Kinder liegt dann bei bis zu 1,5 % [Kreth and Schuster, 2005].

Bis zum Ende des ersten Lebensjahrs hat die Hälfte der Säuglinge bereits eine RSV-Infektion durchlaufen, spätestens bis zum dritten Lebensjahr sind alle Kleinkinder einmal infiziert worden [Collins et al., 2001; Mejias et al., 2005]. Eine Infektion führt nicht zu dauerhafter Immunität, daher sind Reinfektionen jederzeit möglich, verlaufen aber milder als die Erstinfektion [Black, 2003]. Über die Reinfektion von Kindergarten- und Schulkindern wird RSV vermutlich auf die restliche Familie übertragen, wobei ein Säugling in diesem Rahmen die Primärinfektion durchläuft [McIntosh, 2000].

Zu schweren Verläufen kann es jedoch nicht nur bei pädiatrischen Hochrisikopatienten (siehe oben) kommen, sondern auch bei alten Menschen und erwachsenen Immunsupprimierten, oder auch bei vorher Gesunden [Falsey, 2005]. RSV verursacht bei Erwachsenen während der Wintermonate 15 % der Krankenhausaufenthalte durch Pneumonie [Falsey and Walsh, 2000].

1.4 Diagnostik und Therapie

Hinweise auf eine RSV-Infektion geben die Symptomatik, der klinische Untersuchungsbefund, der jahreszeitliche Hintergrund (siehe unten) und das Alter. So sind die Patienten meist jünger als zwei Jahre. Darüber hinaus stellen RSV und Parainfluenzavirus 3 die einzigen respiratorischen Viren dar, welche Neugeborene und Säuglinge in den ersten Lebensmonaten infizieren. Üblicherweise wird für die Diagnose der Nachweis von Virusantigenen in respiratorischen Untersuchungsmaterialien wie z.B. Nasenrachensekret (NRS) angestrebt. Des Weiteren ist der Nachweis von RSV

durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) oder durch Anzucht in der Zellkultur möglich [Haller et al., 2004; Kreth and Schuster, 2005; McIntosh, 2000].

Bei unkomplizierten Fällen einer RSV-Infektion erfolgt die Behandlung symptomatisch. Sie umfasst Volumenersatz bei den häufig dehydrierten Kindern, β_2 -Agonisten, und racemisches Epinephrin. Bei schwer kranken Kindern steht die intensivmedizinische Betreuung im Vordergrund. Ribavirin hat nur einen geringen Effekt auf den Verlauf einer RSV-Pneumonie, und ist daher lediglich bei sehr schwer erkrankten Kindern oder Hochrisikopatienten (konnataler Herzfehler mit Zyanose, bronchopulmonale Dysplasie und schwere Immunschwäche) indiziert.

Bei Kindern mit bronchopulmonaler Dysplasie und bei sehr Frühgeborenen wird in den ersten beiden Lebensjahren während der RSV-Saison der monoklonale, gegen das F-Protein gerichtete Antikörper (AK) Palivizumab prophylaktisch verabreicht. Dadurch sinkt die Anzahl und die Dauer der Krankenhausaufenthalte aufgrund schwerer RSV-Infektionen [Black, 2003; Kreth and Schuster, 2005; McIntosh, 2000].

1.5 Epidemiologie

RSV ist weltweit verbreitet und tritt jährlich in Epidemien auf. In klimatisch gemäßigten Regionen dauert eine RSV-Saison vier bis sechs Monate. Der Inzidenzgipfel bewegt sich im Zeitraum von Dezember bis April. Während des restlichen Jahres treten RSV-Infektionen nur sporadisch auf [McIntosh, 2000; Terletskaia-Ladwig et al., 2005]. Seit Beginn der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurde europaweit ein Zwei-Jahres-Zyklus beobachtet: einer früh beginnenden Saison, welche einen starken Inzidenzgipfel aufweist, folgt eine spät startende Saison mit schwachem Inzidenzgipfel. Dabei fiel auf, dass sich Mittel- und Nordeuropa diesbezüglich antizyklisch verhalten. Regionen, welche im Berührungspunkt liegen – z.B. Kiel – folgen teils dem Zyklus Nordeuropas, um sich dann in der nächsten Saison dem Rhythmus Mitteleuropa anzuschließen [Terletskaia-Ladwig et al., 2005]. In tropischen Regionen ist das Saison-Muster weniger deutlich ausgeprägt [McIntosh, 2000]. Für die Dauer der RSV-Saison ist RSV meistens das dominierende respiratorische Virus in Bezug auf alle vorkommenden respiratorischen Infektionen bei Kindern [Black, 2003].

1.6 Klassifikation und Aufbau des RS-Virus

RSV gehört zur Ordnung Mononegavirales, zur Familie Paramyxoviridae, zur Subfamilie Pneumovirinae und zum Genus Pneumovirus [Collins et al., 2001]. Das virale Genom besteht aus einem einzelsträngigen und unsegmentierten RNA-Molekül negativer Polarität mit einer Länge von 15200 Basenpaaren (bp) [Cane, 2001]; es enthält elf Gene, welche für elf Proteine kodieren. Das helikale Nukleokapsid wird von einer Lipiddoppelmembran umgeben, welche drei transmembrane, virale Glykoproteine enthält: das Fusion (F)-, Attachment (G)- und Small Hydrophobic (SH)-Protein. Das stark glykosylierte G-Protein ist für Anlagerung an die Wirtszelle erforderlich (Abb. 1) [Collins et al., 2001]. Das F-Protein vermittelt die Fusion der viralen Lipidhülle mit der Wirtszellmembran (Viruspenetration) und später im Replikationszyklus auch die Fusion von benachbarten Zellen (Synzytienbildung), wenn das F-Protein auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dieser Vorgang wurde namensgebend für das Virus [Collins et al., 2001]. Monoklonale, rekombinante AK, welche im Rahmen einer passiven Immunprophylaxe eingesetzt werden, wurden gegen das F-Protein gerichtet, da sich dessen Struktur als hoch konserviert erwiesen hat [Black, 2003; Trento et al., 2003].

1.7 Bedeutung des G-Gens bei RSV

Das G-Protein besitzt die höchste Variabilität aller RNA-Virus-Genprodukte [Cane, 2001]. Unter Verwendung monoklonaler AK konnten zwei antigenetische Gruppen (Typ A und Typ B) identifiziert werden. Durch Analyse der Nukleotid-Sequenz wurde festgestellt, dass beim Vergleich von Typ A- mit Typ B-Viren das G-Protein die meisten Unterschiede innehatte: 33 % Nukleotid- und 47 % Aminosäuren (AS)-Variabilität. Darüberhinaus zeigte einzig das G-Protein große Variabilitäten auch innerhalb der Gruppen sowohl auf Nukleotid- als auch auf AS-Ebene [Sullender, 2000]. Die Variabilität konzentriert sich auf die extrazelluläre Domäne, welche zwei variable Regionen enthält; diese sind durch eine konservierte Region getrennt (Abb. 2) [Collins et al., 2001]. Innerhalb der zweiten variablen Region akkumulieren die stammspezifischen Epitope [Garcia et al., 1994].

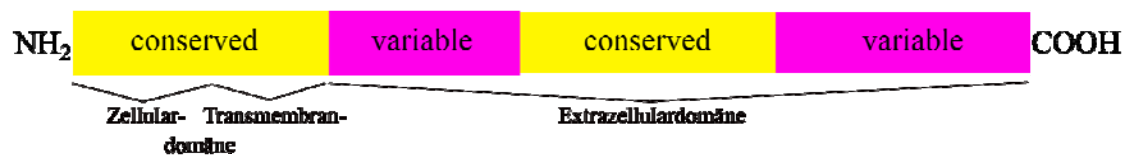


Abbildung 2. Schematischer Aufbau des G-Proteins

1.8 Bisherige phylogenetische Studien

Fast bis zum Ende der 1990er beschäftigten sich alle Untersuchungen lediglich mit der Klassifizierung in die Typen A und B und einige auch mit der Variabilität innerhalb der Typ A-Viren. Erstmals wurde die Variabilität innerhalb der Gruppe B-Viren durch eine Studie von Peret et al. charakterisiert [Peret et al., 1998]. Durch phylogenetische Analyse anhand der zweiten variablen Region des G-Gens wurden die Gruppe A- bzw. Gruppe B-Viren in fünf Gruppe A- bzw. vier Gruppe B-Genotypen unterteilt und benannt (GA1-GA5 bzw. GB1-GB4). Die dabei geschaffene Klassifikation der Genotypen wurde in darauffolgenden Studien übernommen, wobei regelmäßig weitere Genotypen entdeckt wurden. Dennoch wurde bisher kein einheitliches Nomenklatorsystem etabliert, welches exakte Kriterien für die Einführung eines neuen Genotyps definiert.

Bisher wurden in Deutschland zwei Studien über die molekulare Epidemiologie von RSV durchgeführt. Im Rahmen der Multicenter-Studie PRI.DE testeten Struck et al. 362 von insgesamt 1655 NRS aus der Saison 1999/2000 positiv für Typ A- und 110 positiv für Typ B-Viren [Struck et al., 2004]. Das Probenmaterial stammte sowohl von Krankenhaus- als auch von Praxispatienten. Die phylogenetische Analyse – mit 91 randomisiert ausgewählten Typ A-Viren – wurde anhand der ersten variablen Region durchgeführt. Dabei konnten die Sequenzen in drei Cluster eingeteilt werden, welche indirekt den Genotypen von Peret et al. zugeordnet wurden [Peret et al., 1998].

Mentel et al. untersuchten Probenmaterial von Krankenhauspatienten aus dem Zeitraum Januar 2000 bis Mai 2001 [Mentel et al., 2005]. Von 356 NRS wurden 94 positiv für RSV getestet. Bei der Typen-Analyse von 76 NRS wurden 87 % als Typ A- und 9 % als Typ B-Viren identifiziert. Die phylogenetische Analyse von 37 Typ A-Sequenzen

wurde – wie bei Struck et. al – anhand der ersten variablen Region durchgeführt. Eine Einteilung in Genotypen erfolgte nicht.

1.9 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden retrospektiven Arbeit war es, die auftretenden RSV-Stämme durch phylogenetische Analyse in Typen und Genotypen einzuordnen. Desweiteren interessierte, in welchem Verhältnis die Typen und Genotypen in einer RSV-Saison auftraten und wie diese sich über den beobachteten Zeitraum verhielten. Durch Einsicht in die Krankengeschichte konnte nachvollzogen werden, wie sich die Typen und Genotypen in Bezug auf die Krankheitsbilder „Obere Atemwegsinfektion“ (URTI) und „Untere Atemwegsinfektion“ (LRTI) aufteilten.

Das Probenmaterial stammte von Kindern, welche in dem Zeitraum von Januar 2002 bis Juni 2006 mit einem Atemwegsinfekt in der Kinder-Universitätsklinik Würzburg behandelt wurden. Für die phylogenetische Analyse wurde die zweite variable Region des G-Gens untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

Bei den Patientenproben handelte es sich um NRS, welche von der Universitätskinderklinik Würzburg zur Untersuchung auf respiratorische Viren im Rahmen der Routine-Diagnostik an das Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg geschickt worden waren. Nach Eingang im Virusdiagnostik-Labor wurden die Proben mit einem Immunfluoreszenz-Antigentest (Light Diagnostics Respiratory Panel I Viral Screening and Identification IFA Kit, Chemicon) auf das Vorhandensein von Antigenen respiratorischer Viren getestet. Dazu wurden die Proben zunächst mit einem Screening-Reagenz gefärbt, welches gleichzeitig die Antigene von Adenoviren, Influenzaviren A und B, Parainfluenzaviren 1 – 3 und RSV detektierte. NRS, welche positive Reaktionen mit dem Screening-Reagenz zeigten, wurden weiter mit den sieben einzelnen monoklonalen AK untersucht, welche im Screening-Reagenz enthalten waren. Restmaterial der NRS wurde bis zur Durchführung der phylogenetischen RSV-Analyse im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit bei – 20°C gelagert.

Die klinischen Daten wurden retrospektiv durch Einsicht in die Krankenakten erhoben und in die beiden Erkrankungsbilder URTI und LRTI eingeteilt.

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

2.2 Extraktion

Die RNA wurde mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Germany) aus 200 µl NRS unter Befolgung der Herstelleranweisungen extrahiert. Dabei wurde durch Inkubation mit Binding buffer und Proteinase K das Virus zunächst lysiert. Die freigesetzten Nukleinsäuren banden an die Glasfaseroberfläche der High Pure-Filterröhrchen. In mehreren Waschschritten wurden die Nukleinsäuren von Salzen, Proteinen und anderen zellulären Verunreinigungen gereinigt. Die aufgereinigte Nukleinsäure wurde durch 50 µl nukleasefreies, steriles Wasser aus den Glasfaser-Vlies

der High Pure-Filtrerröhrchen eluiert und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3 Reverse Transkription

Da es sich bei RSV um Viren mit einem RNA-Genom handelt, war es nötig die RNA in copyDNA (cDNA) umzuschreiben. Zunächst wurde die zuvor extrahierte RNA für 10 min bei 70°C inkubiert (Denaturierung) und im Anschluss auf Eis gekühlt gehalten. Der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl bestand aus folgenden Reagenzien:

	Menge	Endkonz.
zuvor extrahierte RNA	10,0 µl	
M-MLV-RT 5xReaction Buffer (Promega, Mannheim, Germany)	10,0 µl	1 x
dNTP (20mM)	2,5 µl	1,0 mM
Random hexamer (200 µM)	1,5 µl	6,0 µM
H ₂ O	24,5 µl	
Prime RNase Inhibitor (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)	0,5 µl	0,3 U
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) (Promega, Mannheim, Germany)	1,0 µl	4,0 U

Tabelle 1. Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

Als Primer für die reverse Transkription wurden „Random Hexamer“ verwendet. Nach Zugabe des Reaktionsmixes zur RNA wurde die Reaktion für 15 min bei Raumtemperatur (Annealing) inkubiert; weiter wurde die Reaktion für 60 min bei 42° (Elongation) und 5 min bei 99° (Denaturierung der Reversen Transkriptase) im GeneAmp PCR-System 9600 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde sofort verwendet oder bei -20° gelagert.

2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die RSV-cDNA aus der Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt. Zielsequenz war die zweite variable Region des G-Gens. Als Sense-Primer dienten: GPA, GSA, GPB und GSB. Als Antisense-Primer wurde immer der Primer F1 verwendet, welcher auf dem F-Gen bindet (Tab. 2).

Name	Polarität	Position (nt)	Sequenz (5'-3')	Amplikon ¹ (nt)
GPA	+	511-530	GAAGTGTTCAACTTTGTACC	466
GSA	+	606-625	AACCACCACCAAGCCCACAA	371
GPB	+	494-515	AAGATGATTACCATTTTGAAGT	507
GSB	+	603-623	AAAACCAACCATCAAACCCAC	398
F1	-	3-22	CAACTCCATTGTTATTTGCC	-

Tabelle 2. Liste der für die PCR und die Sequenzierung verwendeten Primer

¹Amplikonlänge bei Kombination mit dem Reverse-Primer F1

nt = Nukleotide

Ein PCR-Ansatz hatte ein Endvolumen von 50 µl und bestand aus folgenden Reagenzien (Tab. 3):

	Menge	Endkonz.
cDNA	5,0 µl	
10x PCR Hot Star Taq Buffer (Qiagen, Hilden, Germany)	5,0 µl	1 x
dNTP (20 mM)	0,5 µl	0,2 mM
Sense-Primer (20 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Antisense-Primer (20 µM)	0,5 µl	0,2 µM
H ₂ O	38,2 µl	
Hot Star Taq (5 U/µl) (Qiagen, Hilden, Germany)	0,3 µl	0,03 U

Tabelle 3. Reaktionsansatz der RSV-PCR mit einem Endvolumen von 50 µl

Die PCR wurde im GeneAmp PCR-System 9600 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit folgendem Temperaturprofil inkubiert:

95°C/10min (Aktivierung der Taq-Polymerase),
 94°C/30 s (Denaturierung),
 50°C/60 s (Annealing),
 72°C/60 s (Elongation), bei 55 Zyklen,
 72°C/10 min (verlängerte Elongation).

Im Anschluss wurden 5 µl PCR-Produkt mit 5 µl Ladepuffer in einem 3%igem – mit Ethidiumbromid versetzten – Agarose-Gel einer Elektrophorese unterzogen. Durch Vergleich der Patientenproben-Bande mit den Marker-Banden konnte die Länge der amplifizierten DNA abgelesen werden. Die erwarteten Amplikonlängen der Primerpaare sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Die cDNA wurde zunächst mit dem Primerpaar GPA/F1 amplifiziert. Konnte mittels dieses Primerpaares kein Amplikon festgestellt werden, wurde eine Seminested-PCR mit dem Primerpaar GSA/F1 durchgeführt (Tab. 4).

	Menge	Endkonz.
5x Green Go Taq Flexi Buffer (Promega, Mannheim, Germany)	10,0 µl	1 x
MgCl ₂ (25mM)	3,0 µl	1,5 mM
dNTP (20mM)	0,5 µl	0,2 mM
Sense-Primer (20 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Antisense-Primer (20 µM)	0,5 µl	0,2 µM
H ₂ O	35,3 µl	
Go Taq (5U/µl) (Promega, Mannheim, Germany)	0,25 µl	0,025 U

Tabelle 4. Reaktionsansatz der RSV Seminested-PCR mit einem Endvolumen von 50 µl

Die Seminested-PCR wurde im T3-Cycler (Biometra, Göttingen, Germany) mit folgendem Temperaturprofil inkubiert:

94°C/1min (Trennung des Doppelstrangs),

94°C/30 s (Denaturierung),
50°C/30 s (Annealing),
72°C/30 s (Elongation), bei 25 Zyklen,
72°C/7 min (verlängerte Elongation).

War die Seminested-PCR ebenfalls negativ, wurde eine PCR mit den Primern GPB/F1 und unter Umständen einer Seminested-PCR mit GSB/F1 durchgeführt. Durch Einhaltung dieses PCR-Schemas, war es möglich die zweite variable Region des G-Gens aller im Immunfluoreszenz-Screening RSV-Antigen-positiven Patientenproben mittels PCR zu amplifizieren. Allgemeine Labormaßnahmen zur Vermeidung von PCR-Kontaminationen wurden strikt eingehalten. In jedem PCR-Ansatz wurden Negativ-Kontrollen mitgeführt, welche stets negativ für RSV-RNA waren.

2.5 Aufreinigung und Ansatz der Sequenzierreaktion

Um Primer, Nukleotide, Salze und Enzyme aus den PCR-Produkten zu entfernen, wurden 40 µl der PCR-Reaktionen im Pipettierautomaten Genesis Workstation 150 (Tecan, Crailsheim, Deutschland) mit der Filtrationsplatte Multiscreen-HTS-PCR-Plate (Millipore Corporation, Billerica, USA) aufgereinigt. Bei der Aufreinigung wurde streng nach Herstellerprotokoll gearbeitet. Die reine DNA wurde in 60 µl nukleasefreies Wasser eluiert. Alternativ wurde für die Aufreinigung der PCR-Produkte das Qiaquick-PCR-Purifikation Kit (Qiagen, Hilden, Germany) – ebenfalls unter Beachtung der Herstelleranweisungen – verwendet, wobei die DNA in 40 µl nukleasefreies Wasser eluiert wurde. Die aufgereinigte DNA wurde jeweils bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Effektivität der PCR-Produkte-Aufreinigung wurde im Anschluß mittels Gelelektrophorese überprüft. Es konnte nach jeder Aufreinigung eine Bande der erwarteten Größe festgestellt werden. Auf Positiv-Kontrollen wurde hierbei verzichtet, da nur positiv auf RSV getestete Proben untersucht wurden.

Anschließend wurde die Sequenzierreaktion angesetzt. Sie hatte ein Endvolumen von 5 µl und bestand aus folgenden Reagenzien (Tab. 5):

	Menge	Endkonz.
DNA	2,0 µl	
Primer (5 µM)	1,0 µl	1,0 µM
Big Dye Terminator v3.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany)	1,0 µl	
2,5 x Buffer (200 mM TrisHcl [pH 9,0], 5 mM MgCl ₂)	1,0 µl	0,5 x

Tabelle 5. Ansatz der Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion wurde in beide Richtungen durchgeführt. Dafür wurden die PCR-Primer verwendet (Tab. 2). Die Sequenzierreaktion wurde im T3-Cycler (Biometra, Göttingen, Germany) mit folgendem Temperaturprofil inkubiert:

- 96°C/10 s (Denaturierung),
- 50°C/5 s (Annealing),
- 60°C/4 min (Elongation), bei 25 Zyklen.

Die Sequenzierreaktionen wurden am Pipettierautomaten Genesis Workstation 150 (Tecan, Crailsheim, Deutschland) mit dem „Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup“-Kit von Salzen, Enzymen und Didesoxytriphosphatnukleotiden, welche nicht in die Kettenabbruchprodukte der Sequenzierreaktion inkorporiert worden waren, aufgereinigt. Dabei wurden die Herstellerangaben befolgt.

Anschließend wurden die Kettenabbruchprodukte im ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

2.6 Phylogenetische Analyse

Mit dem Programm Seqman aus dem Softwarepaket LaserGene (DNASTAR Inc., Madison, USA) wurden die Sequenzen – soweit notwendig – manuell editiert und aus den Forward- und Reversesequenzen je Patientenprobe eine Konsensussequenzen gebildet. Zur phylogenetischen Analyse wurde die Konsensussequenz im fasta-Format in das Programm MEGA Version 3.1 exportiert.

Die Sequenzen wurden zusammen mit acht Typ A- und elf Typ B-Referenzgenotypsequenzen (Tab. 6) unter Verwendung der Clustal W-Funktion

aufeinander ausgerichtet, so dass alle bekannten Genotypen (GA1-GA7, SAA1, GB1-GB4, SAB1-SAB3 und BA) repräsentiert wurden. Die Referenzgenotypen wurden aus der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) bezogen.

Genotyp	Zugangsnummer bei GenBank	Land	Jahr
GA1	AF233914	USA	1994-1995
GA2	AF193325	Korea	1998
GA3	AF233905	Kanada	1994-1995
GA4	AF065254	USA	1993
GA5	AB175815	Japan	2002
GA6	AF233918	USA	1994-1995
GA7	AF233910	USA	1994-1995
SAA1	AF348807	Südafrika	1998
GB1	AF065250	USA	1990
GB2	AF065251	USA	1993
GB3	AF348817	Südafrika	1997
GB3	AY333363	Argentinien	1999
GB4	AF233924	USA	1994-1995
GB4	AF233931	USA	1994-1995
SAB1	AY524573	Kenia	2002
SAB2	AF309678	Mosambik	1999
SAB3	AY488795	Uruguay	1999
SAB3	AF348813	Südafrika	1999
BA	AY927412	Canada	2001-2002

Tabelle 6. Zugangsnummern der RSV Typ A- und B-Referenzgenotypen, welche in dieser Studie verwendet wurden

Anschließend wurden die Sequenzen auf die Länge der zweiten variablen Region des G-Gens zurechtgeschnitten: nt 649-918 für Typ A bzw. nt 652-921 für Typ B. Als

Bezugsskala dienten die Referenz-Typen A2 (GenBank-Zugangsnummer: M11486; Genotyp GA1) bzw. 18537 (GenBank-Zugangsnummer: M17213; Genotyp GB1). Die Würzburger Sequenzen konnten dadurch genotypisiert werden.

Die Topologie der phylogenetischen Bäume wurde mit der Neighbor-Joining-Methode (Distance Methode) berechnet. Die Reliabilität der Baumtopologie wurde mit dem Bootstrap interior branch test (1000 Replikate) getestet. Die dabei erhaltenen Konfidenz-Werte wurden in Prozent angegeben. „Pairwise Distances“ (Paarweise Sequenzunterschiede) zwischen den Genotypen und innerhalb der Genotypen wurden auf Nukleotid-Ebene mit Kimura 2-Parametern und auf AS-Ebene mit p-distances berechnet.

2.7 Statistische Analyse

Statistische Fragestellungen wurden mit SPSS Version 13.01 (SPSS, Chicago, IL) bearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von Januar 2002 bis Juni 2006 wurden aus der Universitätskinderklinik 1292 NRS von stationär behandelten Kindern eingeschickt. Bei der routinemäßigen Immunfluoreszenztestung auf virale Erreger wurden 221 NRS (17 %) positiv für RSV-Antigen getestet. Zehn Proben mussten von der phylogenetischen Untersuchung ausgeschlossen werden, da nach der Routine-Untersuchung das Restvolumen zu gering war. Die ausgeschlossenen Proben verteilten sich gleichmäßig auf die fünf Saisons. Das mediane Alter der RSV positiven Patienten betrug 9,4 Monate; 40 % der Kinder waren bei Infektion jünger als sechs Monate (Abb. 3). Der Anteil der männlichen Patienten lag bei 51 %.

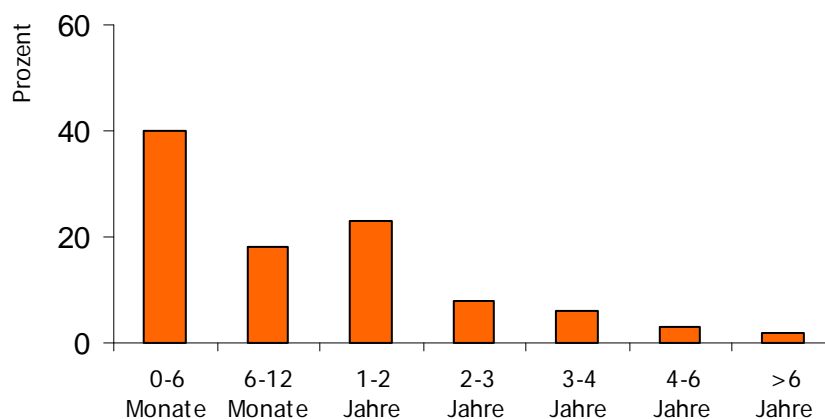


Abbildung 3. Altersverteilung der RSV-Patienten in Prozent bezogen auf alle 221 Patienten

3.2 Nukleinsäuren-Sequenzen

3.2.1 Stammbäume

Die Stammbäume in Abbildung 4 und 5 wurden mit der Neighbour-Joining-Methode berechnet. Um die Analyse der Sequenzen zu erleichtern, wurden in die phylogenetischen Bäume Referenz-Sequenzen bekannten Genotyps aus der GenBank eingefügt. Es wurde ein Bootstrap Interior Branch Test durchgeführt, um die Reliabilität der Topologie zu bestimmen. Die Konfidenzwerte lagen im Bereich von 7 % bis 99 %.

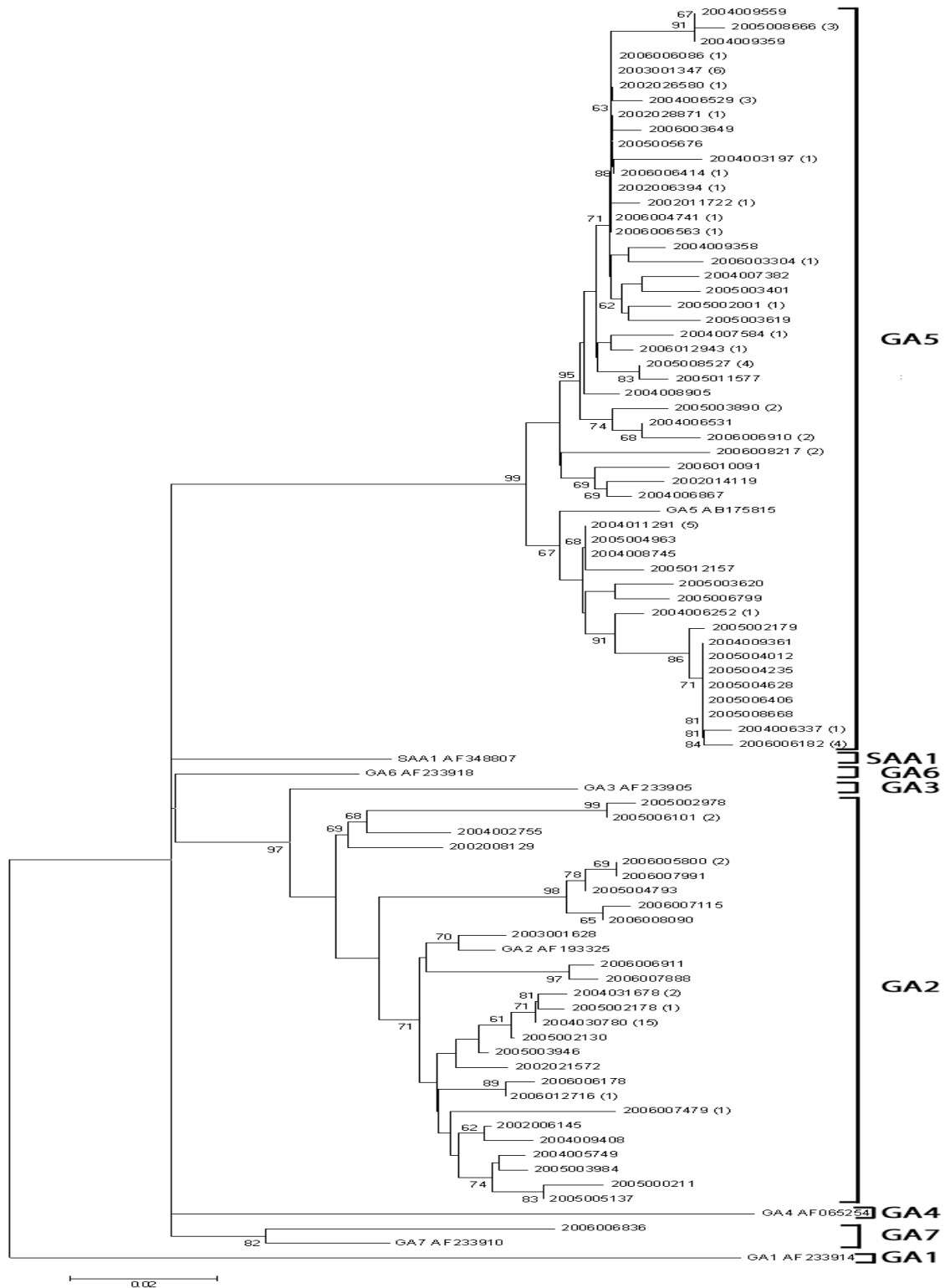


Abbildung 4. Phylogenetische Analyse für RSV-Typ A-Nukleotid-Sequenzen basierend auf der zweiten variablen Region des G-Gens (270 bp). In Klammern steht die Anzahl von identischen Sequenzen, welche im Anhang in Tabelle 12 aufgeführt sind. Die Einteilung der Genotypen erfolgte durch Aufnahme von Referenzgenotypen aus der GenBank (Tab. 6). Die beim Bootstrap interior branch test erhaltenen Konfidenz-Werte wurden in Prozent angegeben und stehen an den Verzweigungspunkten; gezeigt sind nur Werte größer als 60 %.

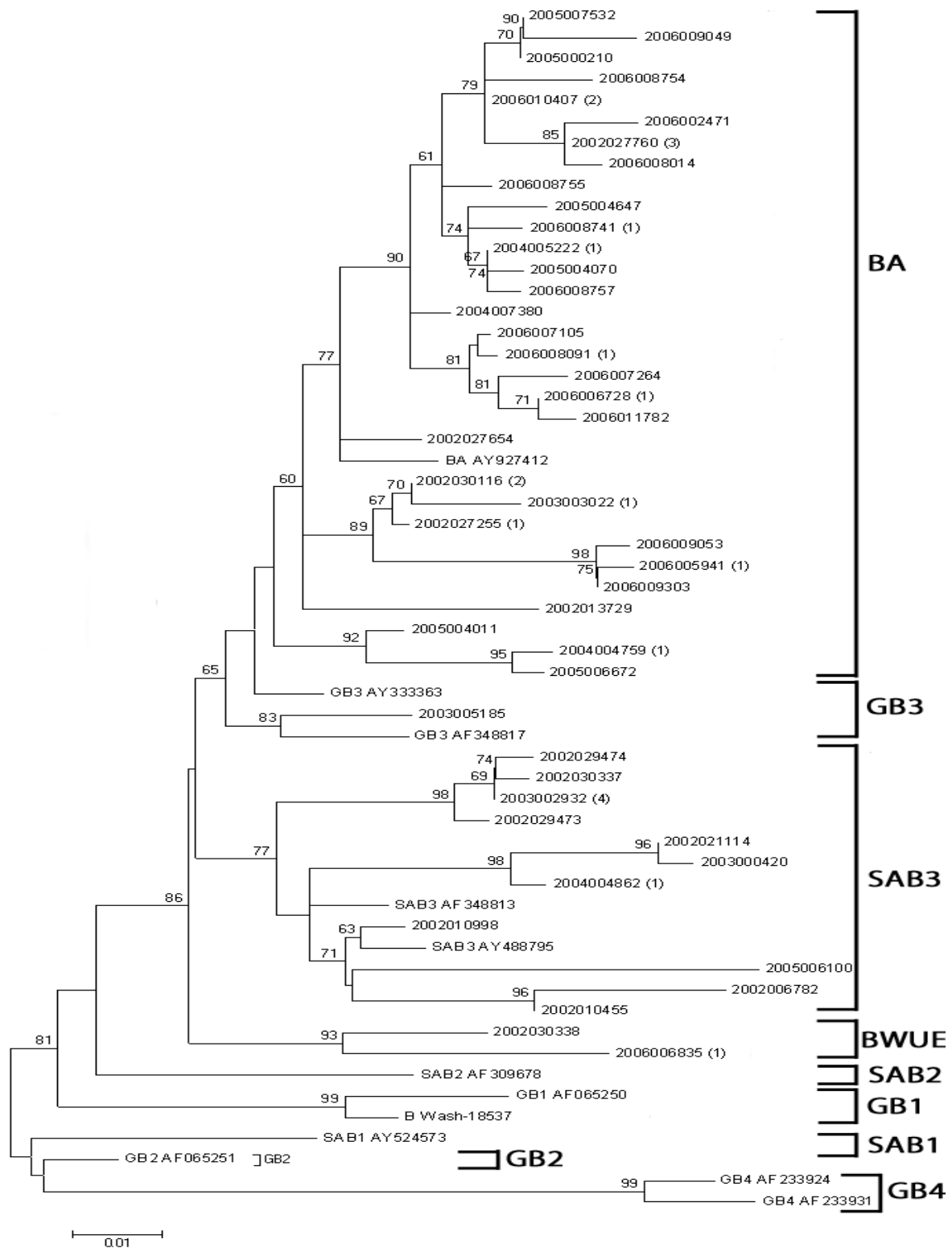


Abbildung 5. Phylogenetische Analyse für RSV-Typ B-Nukleotid-Sequenzen basierend auf der zweiten variablen Region des G-Gens (270 bis 330 bp). In Klammern steht die Anzahl von identischen Sequenzen, welche im Anhang in Tabelle 13 aufgeführt sind. Die Einteilung der Genotypen erfolgte durch Aufnahme von Referenzgenotypen aus der GenBank (Tab. 6). Die beim Bootstrap interior branch test erhaltenen Konfidenz-Werte wurden in Prozent angegeben und stehen an den Verzweigungspunkten; gezeigt sind nur Werte größer als 60 %.

Durch die phylogenetische Untersuchung konnten 146 RSV Typ A- und 65 RSV Typ B-Sequenzen identifiziert werden.

3.2.2 Typ A-Genotypen

Die 146 Typ A-Sequenzen konnten mittels phylogenetischer Analyse in drei Genotypen eingeteilt werden (Abb. 4, Tab. 7). Dabei wurden 50 Sequenzen dem Genotyp GA2 (23,7 %), 95 Sequenzen dem Genotyp GA5 (45 %) und eine Sequenz dem Genotyp GA7 (0,5 %) zugeordnet.

Saison	Gesamt	Typ A			Typ B					
		Typ A	Typ B	GA2	GA5	GA7	SAB3	BA	WUE	GB3
05 - 06	70	44 (63)	26 (37)	11 (16)	32 (46)	1 (1)	-	24 (34)	2 (3)	-
04 - 05	69	62 (90)	7 (10)	32 (46)	30 (44)	-	1 (1)	6 (9)	-	-
03 - 04	35	28 (80)	7 (20)	3 (9)	25 (71)	-	2 (6)	5 (14)	-	-
02 - 03	27	6 (22)	21 (78)	2 (7)	4 (15)	-	10 (37)	9 (33)	1 (4)	1 (4)
02	10	6 (60)	4 (40)	2 (20)	4 (40)	-	3 (30)	1 (10)	-	-
Gesamt	211	146 (69)	65 (31)	50 (24)	95 (45)	1 (1)	16 (8)	45 (21)	3 (1)	1 (1)

Tabelle 7. Saisonale Verteilung von RSV Typen und Genotypen (in Klammern %-Angabe)

Bei einer Länge von 270 Nukleotiden traten in der Gesamtheit 115 Substitutionen auf. Die mittlere Nukleotid-Variabilität der Typ A-Sequenzen betrug 6,9 %, wobei sich die größte Abweichung der Basenabfolge bezogen auf den 1961 in Australien isolierten A-Prototyp A2 (Genotyp GA1) mit maximal 15 % zeigte. Die Intra- und Intergenotyp-Variabilitäten sind in Tabelle 8 dargestellt, wobei die geringe Intra-genotyp-Variabilität des Genotyps GA5 auffiel.

	Nukleotid-Unterschiede			Aminosäuren-Unterschiede		
	GA2	GA5	GA7	GA2	GA5	GA7
GA2	3,6 (0,0-7,5)			6,4		
GA5	11,8	2,5 (0,0-5,4)		23,4	3,3	
GA7	10,1	11,4	-	22,0	24,3	-

Tabelle 8. Pairwise distances auf Nukleotid-Ebene (links) und AS-Ebene (rechts) der Typ A-Genotypen angegeben in Prozent. Dargestellt sind Mittelwerte, die Intragenotyp-Variabilitäten sind fettgedruckt und die dazugehörigen Spannweiten, welche nur für Nukleotid-Unterschiede angegeben sind, stehen in Klammern. Für den Genotyp GA7 wurde konnte die Intragenotyp-Variabilität nicht berechnet werden, da er nur einmal nachgewiesen wurde.

3.2.3 Typ B-Genotypen

Die 65 Typ B-Sequenzen konnten mittels phylogenetischer Analyse in vier Genotypen eingeteilt werden. Dabei wurden 16 dem Genotyp SAB3 (7,6 %), 45 dem Genotyp BA (21,3 %) und eine dem Genotyp GB3 (0,5 %) zugeordnet. Drei (1,4 %) Sequenzen bildeten ein eigenes Cluster, welches als neuer Genotyp (siehe unten) anzusehen ist und im folgenden mit dem Akronym BWUE bezeichnet wurde (Tab. 7). Die BA-Sequenzen enthielten eine Duplikation einer Länge von 60 Nukleotiden. Alle Sequenzen des Genotyps BWUE wiesen eine Duplikation von neun Nukleotiden auf. Eine Sequenz des SAB3-Genotyps wies eine Duplikation von sechs Nukleotiden auf. Die untersuchte Nukleotid-Sequenz verlängerte sich jeweils um die Länge der Duplikation.

Insgesamt traten bei den untersuchten Typ B-Sequenzen 94 Nukleotid-Substitutionen auf, woraus eine mittlere Variabilität von 5,2 % resultierte. Die Sequenzen unterschieden sich in maximal 11 % von der Nukleotidabfolge des 1962 in den USA isolierten B-Prototyps 18537 (Genotyp GB1). Die Intra- und Intergenotyp-Variabilitäten sind in Tabelle 9 dargestellt.

	Nukleotid-Unterschiede				Aminosäuren-Unterschiede			
	SAB3	GB3	BWUE	BA	SAB3	GB3	BWUE	BA
SAB3	4,5 (0,0-8,1)				7,7			
GB3	8,0	-			9,0	-		
BWUE	8,0	7,0	2,9 (0,0-3,9)		13,0	10,0	6,7	
BA	-	-	-	4,0 (0,0-8,6)	-	-	-	5,0

Tabelle 9. Pairwise distances auf Nukleotid-Ebene (links) und AS-Ebene (rechts) der Typ B-Genotypen angegeben in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Intra-genotyp-Variabilitäten sind fettgedruckt und die dazugehörigen Spannweiten stehen in Klammern. Der Genotyp BA wurde mit den anderen Genotypen aufgrund der großen Verschiedenheit durch die 60-Nukleotid-Duplikation nicht verglichen, da die Berechnung der Pairwise distances auf einem Nukleotid-Substitutionsmodell beruht. Für den Genotyp GB3 wurde konnte die Intragenotyp-Variabilität nicht berechnet werden, da er nur einmal nachgewiesen wurde.

3.3 Aminosäuren-Sequenzen

3.3.1 Längendifferenzen bei Typ A- und B-Genotypen

Aus den untersuchten Nukleotid-Fragmenten des RSV-G-Gens wurden die AS-Sequenzen abgeleitet. Die Typ A-AS-Sequenzen bestanden aus 90 AS. Die Typ B-AS-Sequenzen hatten unterschiedliche Längen, deren Ausmaß durch das Vorliegen einer Duplikation bestimmt wurde: Die SAB3-Sequenzen hatten 90 AS-Reste – eine Sequenz bildete durch eine Duplikation mit sechs Nukleotiden mit 92 AS-Reste eine Ausnahme; alle BA-Sequenzen wiesen 110 AS-Reste auf, die drei BWUE-Sequenzen bestanden jeweils aus 93-AS-Resten. Bei den Typ A-Viren führten 47 %, bei den Typ B-Viren 50 % der Nukleotid-Substitutionen zu AS-Substitutionen.

3.3.2 Variabilitäten bei Typ A- und B-Genotypen

Die mittlere AS-Variabilität der Typ A-Sequenzen betrug 13,0 %, die Intra- und Intergenotyp-Variabilitäten sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Variabilität auf AS-Ebene war immer größer als auf Nukleotid-Ebene. Bei den Typ B-Sequenzen wurde eine mittlere AS-Variabilität von 7,9 % festgestellt, die Intra- und Intergenotyp-

Variabilitäten sind in Tabelle 9 aufgeführt. Auch hier war die Variabilität auf AS-Ebene immer größer als auf Nukleotid-Ebene.

3.4 Zeitliche Zirkulationsmuster der Typen und Genotypen

Insgesamt zeigten Typ A-Viren (69,5 %) eine höhere Prävalenz als Typ B-Viren (30,5 %) (Tab. 7, Abb. 6). Über den beobachteten Zeitraum hinweg traten diese mit wechselnder Prävalenz auf. In der Saison 2002-2003 wurden 22 % der Infektionen durch Typ A-Viren und 78 % durch Typ B-Viren verursacht. In der darauf folgenden Saison nahm der Anteil der Typ A-Viren auf 80 % zu, der Anteil der Typ B-Viren nahm dementsprechend ab. Der beobachtete Unterschied zwischen Saison 2002-2003 und 2003-2004 hinsichtlich der Verteilung der Typ A und B-Viren war im Chi-Quadrat-Test signifikant ($p < 0,001$; $\alpha = 0,05$).

Von Saison 2003-2004 auf Saison 2004-2005 nahm der Anteil der Typ A-Viren auf 90 % zu. Der Unterschied zwischen den Saisons 2003-2004 und 2004-2005 hinsichtlich der Verteilung der Typen A und B-Viren war allerdings nicht signifikant ($p = 0,277$).

Von der Saison 2004-2005 auf die Saison 2005-2006 konnte ein signifikanter Unterschied der Verteilung der Typ A- und Typ B-Viren im Chi-Quadrat-Test festgestellt werden. ($p < 0,001$; $\alpha = 0,05$). Dieser Unterschied äußert sich in einer Abnahme der Typ A-Viren auf einen Anteil von 63 % aller Infektionen.

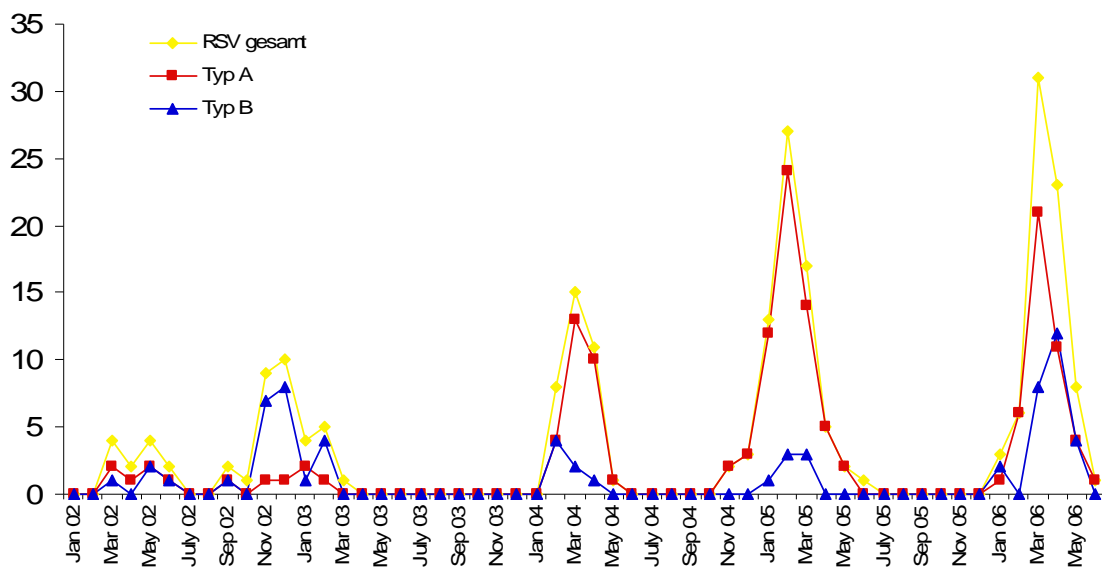


Abbildung 6. Saisonale Gesamtverteilung und Betrachtung der Typenverteilung; die Ordinate gibt Absolutwerte an

Von besonderem Interesse war die Verteilung der zirkulierenden Genotypen (Tab.7, Abb. 7). Es zeigten sich bei den Typ A-Stämmen und auch bei den Typ B-Stämmen jeweils zwei Genotypen (GA2 und GA5 bzw. SAB3 und BA) für 98 % der Infektionen verantwortlich.

So zirkulierten diese vier Genotypen in fast allen Saisons. Lediglich in der letzten Saison waren keine SAB3-Stämme zu finden. Daher beschränkt sich die weitere statistische Auswertung nur auf diese vier Genotypen.

Während der Saison 2002-2003 waren Gruppe B-Viren der SAB3- und BA-Stämme mit 37 % und 33 % deutlich häufiger als die Gruppe A-Viren der GA2- und GA5-Stämme mit 7 % und 15 %. Im Vergleich dazu änderte sich die Verteilung der Genotypen in der Saison 2003-2004 signifikant (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$; $\alpha = 0,05$). Während dieser Saison dominierten GA5-Stämme (71 %) über GA2 (9 %), SAB3 (6 %) und BA (14 %).

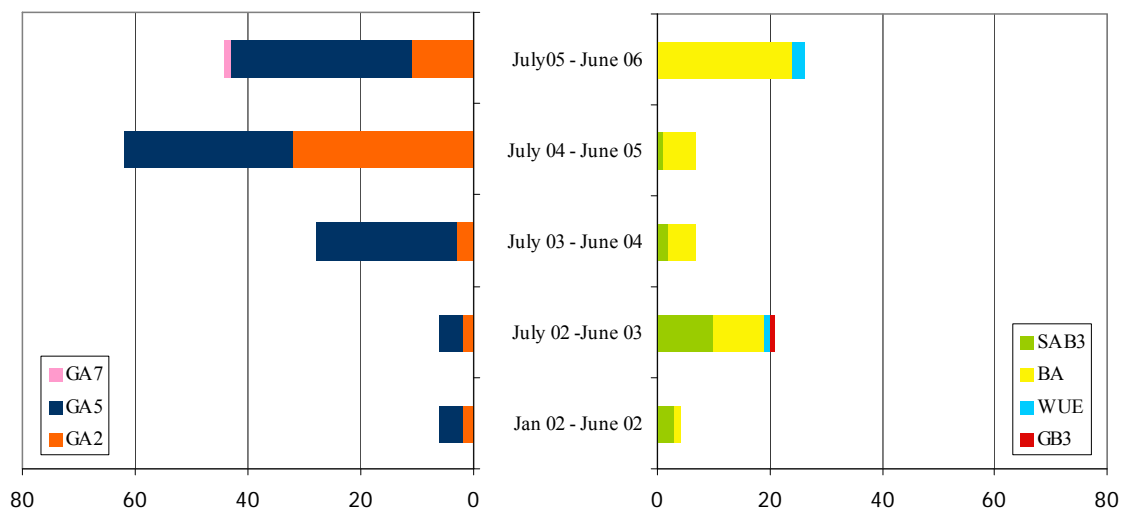


Abbildung 7. Verteilung der Genotypen. Die Zahlen in der Abszisse geben die Absolutwerte an

Während Saison 2004-2005 wurden fast alle Infektionen zu gleichen Teilen durch GA2 und GA5-Stämme verursacht (46 % und 44 %). In der letzten Saison konnten die meisten Stämme den Genotypen GA5 (46 %) und BA (34 %) zugeteilt werden. Die beobachteten Unterschiede der Genotypen-Verteilung zwischen Saison 2003-2004 und 2004-2005 bzw. 2004-2005 und 2005-2006 konnten aufgrund einer zu geringen

Gruppengröße statistisch nicht bewertet werden. Es konnte festgestellt werden, dass sich die Saison 2002-2003 bezüglich der Verteilung der Genotypen signifikant von den Saisons 2003-2004, 2004-2005 und 2005-2006 unterscheidet (im Chi-Quadrat-Test jeweils $p < 0,001$; $\alpha = 0,05$).

Im beobachteten Zeitraum traten jeweils nur ein einziger GA7-Stamm und ein GB3-Stamm auf. Der neue Genotyp BWUE trat in der zweiten und auch in der letzten Saison auf. Über alle Saisons hinweg erhielt der Genotyp BA immer mehr Anteil an den Typ B-Viren, im Gegenzug nahm die Prävalenz des Genotyps SAB3 stetig ab. (Tab. 10).

Die erste, nur zur Hälfte untersuchte Saison (Januar bis Juni 2002) wurde nicht in die statistische Auswertung einbezogen, um eventuelle Verfälschungen aufgrund des kürzeren Beobachtungszeitraums zu vermeiden.

Saison	Typ A	GA2	GA5	Typ B	SAB3	BA
05 - 06	100	25	73	100	0	92
04 - 05	100	52	48	100	14	86
03 - 04	100	11	89	100	29	71
02 - 03	100	33	67	100	48	43
02	100	33	67	100	75	25

Tabelle 10. Dargestellt sind die Prävalenzen der am häufigsten vorkommenden Genotypen bezogen auf die Typen und in Prozent angegeben. Die Typen A und B sind als Referenz auf 100 % gesetzt.

3.5 Erkrankungen – URTI und LRTI

Für 203 der 211 untersuchten NRS lagen die Patientendaten vor. In der Gesamtheit traten 20 Erkrankungen des oberen (URTI) und 189 Erkrankungen des unteren (LRTI) Respirationstraktes auf (Tab. 11). Die URTI wurden jeweils zu 50 % durch Typ A- bzw. Typ B-Viren verursacht. Die LRTI wurden zu 71 % durch Typ A-Viren, und zu 29 % durch Typ B-Viren verursacht, was ungefähr der allgemeinen Verteilung der Typen gleichkam (70 % zu 30 %; Tab. 7). Für die Fragestellung, ob es einen Unterschied im Auftreten der Krankheitsbilder URTI und LRTI in Abhängigkeit davon gab, welcher

Typ die Infektion verursachte, konnten statistische Tests aufgrund des selektierten Patientenkollektivs nicht sinnvoll angewendet werden.

Die URTI wurden zum großen Teil durch GA5 und BA-Genotypen verursacht. Die LRTI wurden ungefähr im gleichen Verhältnis durch die Genotypen GA2, GA5, SAB3 und BA verursacht wie diese insgesamt auftraten (Tab. 7 und 11). Für die Fragestellung, ob es einen Unterschied im Auftreten der Krankheitsbilder URTI und LRTI in Abhängigkeit davon gab, welcher Genotyp für die Infektion verantwortlich war, waren auch hier aufgrund des selektierten Patientenkollektivs statistische Tests nicht sinnvoll anwendbar.

Das mediane Alter der mit Typ A wie der mit Typ B infizierten Kinder betrug gleichermaßen 0,72 Jahre. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Altersverteilung bezüglich Typ A- und Typ B-Infektionen (p-Value = 0,5612; Mann-Whitney-Test)

	Gesamt	Typ A		Typ B					
		Typ A	Typ B	GA2	GA5	SAB3	BA	WUE	GB3
URTI	20	50	50	11	39	0	44	6	0
LRTI	189	71	29	25	46	9	18	1	1

Tabelle 11. Verteilung der Typen und Genotypen auf die Erkrankungsbilder URTI und LRTI; Angaben in Prozent. Für den Patienten, der an RSV Genotyp GA7 erkrankt war, war die Krankengeschichte nicht verfügbar.

3.6 Identische Sequenzen

Von den 146 Typ A-Sequenzen kamen 43 einmalig vor, d.h. sie unterschieden sich von allen anderen Sequenzen durch mindestens eine Substitution. Die übrigen 103 Sequenzen konnten in 32 Gruppen identischer Sequenzen eingeteilt werden (Tab. 12 im Anhang). Die meisten Gruppen beinhalteten Sequenzen, welche innerhalb derselben Saison auftraten. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass identische Sequenzen über mehrere Saisons hinweg vorkamen. In einer Gruppe identischer Sequenzen blieb die

Nukleotid-Abfolge sogar über vier Saisons stabil. Von den 65 Typ B-Sequenzen kamen 30 einmalig vor, die übrigen 34 Sequenzen bildeten 13 Gruppen identischer Sequenzen (Tab. 13 im Anhang). Auch hier konnte gezeigt werden, dass sich bei vier Sequenzen, welche über vier Saisons hinweg auftraten, die Nukleotid-Abfolge nicht änderte.

RS-Viren mit identischer Nukleotid-Sequenz der untersuchten zweiten variablen Region verursachten beide Krankheitsbilder URTI und LRTI (Tab. 12 u. Tab.13 im Anhang).

3.7 Infektionen bei Geschwistern und Reinfektionen

Unter den 221 RSV positiven NRS wurden 24 von Geschwisterpaaren entnommen, wovon acht Zwillingspaare waren (Tab. 14). Der Zeitpunkt der NRS-Entnahme erfolgte bei den Paaren in kurzen Abständen (Median = 0,5 d; Spannweite = 0-7 d). Beinahe alle Paare wiesen eine Infektion mit jeweils identischer Nukleotid-Sequenz auf. Lediglich bei Geschwisterpaar Nummer zwölf wies das ältere Kind eine Infektion mit dem Genotyp GA5, das jüngere mit dem Genotyp BA auf; der Abstand der NRS-Gewinnung betrug hier fünf Tage. Zehn der Geschwisterpaare erkrankten an einer LRTI, ein Paar erkrankte an einer URTI. Eine Ausnahme bildete das sechste Geschwisterpaar: bei dem einen Säugling wurde eine URTI, und bei dem anderen Säugling eine LRTI festgestellt. Es konnte in dem Patientenkollektiv eine Reinfektion festgestellt werden. Die Erstinfektion fand im Alter von zwölf Monaten, die Reinfektion im Alter von 28 Monaten statt. Beides mal erkrankte das Kind an einer LRTI. Sowohl bei der Erstinfektion als auch bei der Reinfektion wurde der Genotyp GA5 nachgewiesen. Die Sequenzen der beiden Stämme unterschieden sich an 5 Nukleotid- und 2 AS-Positionen.

Paar	Probennummer	Abstand der NRS-Entnahme	Genotyp	URTI / LRTI	Nukleotid- Substitutionen
1	2002011722	2	GA5	LRTI	0
	2002011974		GA5	LRTI	
2	2003003022	2	BA	URTI	0
	2003003163		BA	URTI	
3	2004003199	0	GA5	LRTI	0
	2004003197		GA5	LRTI	
4	2004004759	0	BA	LRTI	0
	2004004760		BA	LRTI	
5	2004004638	7	BA	LRTI	0
	2004005222		BA	LRTI	
6	2004007584	0	GA5	URTI	0
	2004007639		GA5	LRTI	
7	2004008512	2	GA5	LRTI	0
	2004008745		GA5	LRTI	
8	2004028046	0	GA2	LRTI	0
	2004028047		GA2	LRTI	
9	2004031680	0	GA2	LRTI	0
	2004031678		GA2	LRTI	
10	2006006913	0	GA5	LRTI	0
	2006006914		GA5	LRTI	
11	2006007001	1	GA5	LRTI	0
	2006007107		GA5	LRTI	
12	2006009161	5	GA5	LRTI	nicht berechnet ¹
	2006009303		BA	LRTI	

Tabelle 14. Infektionen bei Geschwistern. In Spalte drei ist das Zeitintervall zwischen den NRS-Entnahmen in Tagen angegeben.

¹ nicht berechnet, da unterschiedliche Genotypen vorliegen

4 Diskussion

4.1 Zirkulationsmuster und Prävalenz bei Typ A- und B-Viren

Die vorliegende Arbeit untersucht die genetische Variabilität bei RSV im Raum Würzburg anhand einer variablen Region des G-Gens. Beginn und Dauer der fünf beobachteten Saisons folgten dem in früheren Studien für Europa beschriebenen Zwei-Jahres-Zyklus [Terletskaia-Ladwig et al., 2005].

Weiter wurde festgestellt, dass Typ A-Viren insgesamt häufiger vorkommen, was im Einklang mit aktuellen und auch früheren Studien steht (Tab. 15) [Galiano et al., 2005; Hall et al., 1990; Mentel et al., 2005; Parveen et al., 2006b; Sato et al., 2005; Trento et al., 2006]. Die These, dass in Europa häufiger Typ B-Infektionen auftreten, konnte durch die vorliegende Studie nicht unterstützt werden [Black, 2003; Freymuth et al.]. Es wurde in vier von fünf Saisons eine Praedominanz der Typ A-Viren festgestellt. In früheren Studien wurde über eine jährlich alternierende Praedominanz der Typen A und B berichtet [Black, 2003; Hall et al., 1990; Peret et al., 1998; Sato et al., 2005], hierbei wurden jedoch häufig nicht alle RSV positiven NRS genotypisiert, bisweilen nicht einmal 30 % pro Saison [Sato et al., 2005]. Weiter wurden diejenigen Proben, welche für die Genotypisierung verwendet wurden, nur bei Galiano et al. randomisiert ausgewählt [Galiano et al., 2005]. Daher wäre es denkbar, dass die beobachtete Biannualität der Typ A- und Typ B-Prävalenz bei Peret et al. und Sato et al. zufällig zustande gekommen ist [Peret et al., 1998; Sato et al., 2005]. Diese These wird durch andere Studien unterstützt, welche eine Biannualität nicht nachweisen konnten [Galiano et al., 2005; Parveen et al., 2006b].

4.2 Genotypen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass in dem beobachteten Zeitraum sieben Genotypen – drei Typ A- und vier Typ B-Genotypen – zirkulierten und einige auch zeitgleich im Umlauf waren. So waren die Genotypen mit der größten Prävalenz – GA2, GA5, SAB3 und BA – in fast jeder Saison vertreten, jedoch mit wechselnder Häufigkeit. Diese vier Genotypen werden auch in den Studien aus Japan (2001-2004) und Indien (2001-2004) als zirkulierende angeführt, dort waren GA5 und BA für das Gros der Infektionen verantwortlich [Parveen et al., 2006b; Sato et al., 2005].

Studie	Kinder	Saisons	Probenzahl	Typ A, B gesamt ¹
Hall et al., 1990 (USA)	a, h	15 (1975-1990)	1209 p 1209 t 214 g	71 % Typ A, 29 % Typ B Typ A dominiert neun Jahre, ähnliche Prävalenz der Typen über vier Jahre, Typ B dominiert zwei Jahre
Freymuth et al., 1991 (Frankreich)	h	8 (1982-1990)	p unbekannt 374 t	38 % Typ A 62 % Typ B
Peret et al., 1998 (USA)	h	5 (1990-1995)	539 p 204 g	Jährlicher Wechsel des Typs und des Genotyps
Galiano et al., 2005 (Argentinien)	h	7 (1995-2001)	129 p 129 t 57 g	74 % Typ A 26 % Typ B
Mentel et al., 2005 (Deutschland)	h	1,5 (2000-2001)	94 p 76 t	87 % Typ A 9 % Typ B
Sato et. al, 2005 (Japan)	h	3 (2001-2004)	185 p 185 g	65 % Typ A 35 % Typ B Jährlicher Wechsel des Typs
Parveen et al., 2006 (Indien)	a, h	3 (2001-2004)	48 p 48 g	77 % Typ A 23 % Typ B (alle gehören dem Genotyp BA an)

Tabelle 15. Gegenüberstellung von früheren Studien

¹ bezogen auf alle typisierten Proben

a = ambulante Kinder

h = hospitalisierte Kinder

p = RSV positiv getestet

t = typisiert in Typ A und B

g = genotypisiert in die bekannten Genotypen

Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, wonach dieselben Genotypen gleichzeitig in unterschiedlichen geographischen Regionen im Umlauf waren. Die Autoren schlossen daraus, dass es entweder eine parallele Evolution der Genotypen an verschiedenen Orten zur gleichen Zeit gibt, oder dass neue Genotypen sehr schnell verbreitet werden, sobald sie neu in Erscheinung getreten sind [Cane and Pringle, 1995; Garcia et al., 1994]

Die Genotypen GB3 und GA7 erreichten in anderen aktuellen Studien ähnlich niedrige Prävalenzen oder traten gar nicht auf [Parveen et al., 2006b; Sato et al., 2005]. In dem beobachteten Zeitraum von 2002 bis 2006 zeichnete sich ab, dass ein neuer Genotyp auftauchte und der Genotyp SAB3 allmählich verschwand. Damit konnten Beobachtungen früherer Untersuchungen bestätigt werden, wonach immer wieder neue Genotypen entstehen und die alten Genotypen ersetzen [Cane and Pringle, 1995].

In der vorliegenden Untersuchung konnte nicht bestätigt werden, dass mit jeder Saison der dominierende Genotyp wechselt. Peret et al. beobachteten alternierende Genotypen; erklärt wurde dieses Phänomen damit, dass nach einer Saison in einer Population eine Herdenimmunität gegen den praedominanten Genotyp vorliegt und in der darauffolgenden Saison dessen Zirkulation gehemmt wird [Peret et al., 1998]. Ein neuer Genotyp, für den noch keine Herdenimmunität besteht, erlangt dadurch die Dominanz über die anderen [Cane, 2001; Peret et al., 1998].

Gegen die Notwendigkeit der jährlichen Genotypen-Änderung spricht, dass dieses Phänomen in bisher keiner aktuellen Studie nachvollzogen werden konnte. Zudem war in der vorliegenden Untersuchung der Genotyp GA5 über mehrere Saisons sehr stark vertreten. Dies legt den Schluss nahe, dass erfolgreiche Stämme durchaus in der Lage sind mehr als eine Saison dominant zu bleiben. Weiter erwies sich der Genotyp GA5 mit einer mittleren genetischen Diversität von 2,5 % und einer AS-Diversität von 3,3 % innerhalb des Genotyps als wenig variabel. Daraus kann gefolgert werden, dass es nicht unbedingt nötig ist, auf Nukleotid-Ebene große Veränderungen hervorzurufen, um über aufeinander folgende Saisons eine konstant hohe Prävalenz zu halten.

4.3 Genetische und antigenetische Variabilität

Aus den Daten der genetischen und antigenetischen Variabilität beim Genotyp GA5 lässt sich erkennen, dass bei RSV ein Großteil der Mutationen auf Nukleotid-Ebene auch AS-Veränderungen nach sich zieht. Bei Betrachtung aller in Würzburg vorkommenden Sequenzen wurde festgestellt, dass bei den Typ A-Viren im Mittel 47 % und bei den Typ B-Viren im Mittel 50 % der Nukleotid-Substitutionen auch zu AS-Substitutionen führen. Dies bestätigt die Beobachtungen einer früheren Studie für Typ A-Viren (50 %) [Sullender, 2000]. Bei Venter et al. lag der mittlere Anteil an Nukleotid-Substitutionen, welcher zu AS-Substitutionen führte, sogar bei 71 % und 67 % für Typ A- und B-Viren

[Venter et al., 2001]. Dies lässt darauf schließen, dass ein positiver Selektionsdruck auf der zweiten variablen Region des G-Proteins lastet, wahrscheinlich in Form eines immunologischen Druckes, da AK gegen diese Region gebildet werden [Cane and Pringle, 1995; Garcia et al., 1994; Sato et al., 2005]. Aufgrund dieses Selektionsdrucks tragen schon geringe genetische Veränderungen zu antigenetischer Variabilität bei. Damit lässt sich die hohe Prävalenz des Genotyps GA5 über mehrere Saisons erklären. Generell war die Variabilität auf AS-Ebene größer als auf Nukleotid-Ebene, was auch schon in früheren Untersuchungen festgestellt worden war [Venter et al., 2001]. Die Untersuchung der Sequenzen zeigt auch, dass die mittlere genetische Variabilität der Typ A-Viren größer als die der Typ B-Viren war. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit anderen Studien [Galiano et al., 2005; Parveen et al., 2006b; Peret et al., 1998], was mit der Praedominanz der Typ A-Viren weltweit im Zusammenhang stehen könnte [Parveen et al., 2006b].

4.4 Genotyp BA

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine immer stärker werdende Prävalenz des Genotyps BA unter den B-Genotypen festgestellt mit einem Anstieg von 25 % (2002) auf 92 % (2005-2006), wobei in der ersten Saison nur ein BA-Stamm registriert wurde. Dasselbe Bild zeichnet sich auch in anderen aktuellen Studien ab, wo der BA-Typ bisweilen andere B-Genotypen fast vollständig verdrängt hat [Parveen et al., 2006b; Sato et al., 2005; Trento et al., 2006]. Aus unseren Daten ergab sich kein Anhalt dafür, dass die BA-Stämme mit neuen klinischen Eigenschaften oder größerer Virulenz assoziiert sind. Zum selben Ergebnis kamen auch Sato et al. [Sato et al., 2005].

Der Genotyp BA, welcher erstmals 1999 in Argentinien nachgewiesen worden ist [Trento et al., 2003; Venter et al., 2001], hat sich weltweit verbreitet und wurde seither in Europa, Afrika und Asien beschrieben [Parveen et al., 2006b; Sato et al., 2005; Scott et al., 2004; Trento et al., 2006; Zlateva et al., 2005].

Bei den ursprünglichen BA-Genotyp-Stämmen lässt sich eine Duplikation von 60 Nukleotiden in der zweiten variablen Region nachweisen [Trento et al., 2003; Venter et al., 2001]. Es wurden keine Deletionen festgestellt, welche das Hinzukommen der 60-Nukleotid-Duplikation kompensieren könnten [Trento et al., 2006]. Mittlerweile sind bei beinahe allen isolierten Stämmen weltweit sowohl innerhalb des als Kopiervorlage

dienenden Segments als auch innerhalb der Duplikation viele Nukleotid-Substitutionen aufgetreten [Trento et al., 2006]. Diese Veränderung des G-Gens wurde auch bei den Würzburger Stämmen beobachtet.

Die schnelle globale Verbreitung und die Dominanz, mit welcher die BA-Stämme auftreten, lässt darauf schließen, dass dieser Genotyp einen selektiven Vorteil gegenüber den anderen Genotypen besitzt [Sato et al., 2005; Trento et al., 2006].

In weiteren Studien wird sich zeigen, ob der Genotyp BA dauerhaft dominant über andere Typ B-Viren bleibt, oder ob neue B-Typen ihn in den nächsten Jahren verdrängen werden.

4.5 Genotyp BWUE

Während des Untersuchungszeitraums sind in Würzburg drei Typ B-Stämme beobachtet worden, welche ein eigenes Cluster bildeten. Die bei der Blast-Suche identifizierte G-Gen-Sequenz mit der größten Homologie wies 93,3 % Ähnlichkeit zu jenen drei Stämmen auf, und wurde in einer früheren Studie dem Genotyp GB3 zugeordnet.

Die anderen bisher bekannten Genotypen unterschieden sich immer in ungefähr 7 % ihrer Nukleotid-Sequenz bezogen auf die zweite variable Region; die mittlere Variabilität des neuen Genotyps BWUE zu den anderen Genotypen betrug 7-8 %. Der Verzweigungsknoten, von welchem das neue Cluster abzweigt, wurde mit einem Konfidenzwert von 86 % unterstützt. Daher wurde dieses Cluster als neuer Genotyp bezeichnet: nach dem Entdeckungsort mit dem Akronym BWUE. Die drei BWUE-Stämme enthielten zusätzlich eine Duplikation von neun Nukleotiden Länge, welche bei der Berechnung der Variabilität und der Stammbaum-Rekonstruktion nicht berücksichtigt wurden (Nukleotid-Substitutions-Modell).

Mit Erscheinen des neuen Genotyps im Raum Würzburg konnte bestätigt werden, dass die RSV-Evolution dynamisch ist und neue Varianten durch die Immunselektion in der menschlichen Population auftreten [Garcia et al., 1994]. Es bleibt abzuwarten, ob sich der Genotyp BWUE behaupten und sich in den Folgejahren – vielleicht auch in anderen geographischen Regionen der Welt – weiter verbreiten kann. Möglicherweise ist er bereits in anderen geographischen Regionen aufgetreten ohne Eingang in phylogenetische Analysen zu finden, bevor er jetzt im Raum Würzburg beschrieben wurde. Der Genotyp BWUE ist erstmals 2003 und dann drei Jahre später erneut

aufgetreten; dies steht im Einklang mit Beobachtungen in früheren Studien, wonach G-Gen-Sequenzen mit Duplikation oder Deletion von ein oder zwei Triplets sporadisch auftraten, um dann in den folgenden Jahren wieder zu verschwinden [Melero et al., 1997; Trento et al., 2006; Zlateva et al., 2005].

4.6 Unterschiede zwischen den RSV-Stämmen hinsichtlich der Virulenz

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte nicht abgeleitet werden, dass ein Typ oder Genotyp häufiger zu einem schwereren Verlauf der RSV-Infektion führt. Kinder mit einem milden Verlauf wurden vermutlich weniger oft in der Universitätsklinik vorstellig, folglich gingen hauptsächlich die bereits schwer Erkrankten in die Betrachtung ein. Weiter wurden in der vorliegenden Untersuchung bei Isolaten mit identischer Sequenz sowohl schwere Verläufe als auch milde Verläufe festgestellt.

Es liegen frühere Studien vor, welche keinen Unterschied im klinischen Schweregrad der Infektion aufzeigen konnten [Cane, 2001]. Die Studie von Hall et. al, welche in einem Beobachtungszeitraum von 15 Jahren sowohl hospitalisierte als auch ambulant vorstellige Kinder untersuchte, berichtete aber, dass Typ A-Isolate mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert waren [Hall et al., 1990]. Dieser Auffassung folgte Walsh et al. in einer dreijährigen Studie mit hospitalisierten Kindern [Walsh et al., 1997].

4.7 Reinfektion

Im beobachteten Zeitraum trat eine Reinfektion auf. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass eine Infektion nicht zu dauerhafter Immunität führt. Reinfektionen sind infolge dessen jederzeit möglich, verlaufen aber milder als die Erstinfektion [Black, 2003]. Die Würzburger Patientin erkrankte beide Male an einem unteren Atemwegsinfekt und beide Male mit einem Virus des Genotyp GA5. Da es sich bei der Patientin um ein ehemaliges Frühgeborenes (26. SSW) mit einer bronchopulmonalen Dysplasie handelt, erklärt sich die schwere Manifestation bei Reinfektion.

Bisher war man der Ansicht, dass nach einer Typ A-Infektion die Reinfektion durch einen Typ B-Virus verursacht wird [Cane, 2001]. In einer japanischen und in einer

indischen Studie wurde aber festgestellt, dass ein Großteil der Reinfektionen durch GA5 verursacht wurden [Parveen et al., 2006a; Sato et al., 2005].

Ob dieser Umstand darin begründet liegt, dass GA5 häufiger Reinfektionen verursacht oder diese Reinfektionen in der Dominanz von GA5 begründet liegen, bleibt abzuwarten.

Die große Variabilität des G-Proteins sorgt dafür, dass bei einer Reinfektion die Effektivität der bei Erstinfektion gebildeten AK reduziert wird [Black, 2003]. Bei der Patientin der vorliegenden Studie wurden beim reinfizierenden Virus zwei AS-Substitutionen registriert. Da schon eine einzige AS-Substitution das Verhalten gegenüber neutralisierenden AK verändern kann [Garcia et al., 1994], könnte die doppelte AS-Substitution in der vorliegenden Studie eine Reinfektion ermöglicht haben. Damit würde auch der These von Peret et al. widersprochen, dass in jeder Saison ein anderer Genotyp dominant ist, um an der Herdenimmunität vorbei in einer Population zu Infektionen führen zu können [Peret et al., 1998].

Bei der Patientin aus der vorliegenden Arbeit wäre angesichts der pulmonalen Dysplasie auch eine Erregerpersistenz denkbar, sodass nach Erstinfektion durch Mutation die fünf Nukleotid-Substitutionen aufgetreten sind. In aktuellen Untersuchungen konnte RSV sowohl bei stabiler als auch bei exazerbierter chronic obstructive pulmonary disease (COPD) nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist eine RSV-Persistenz bei zugrunde liegender COPD. Hierfür stehen endgültige Beweise noch aus [Falsey et al., 2006; Sikkil et al., 2008].

Daher erscheint bei der Patientin dieser Arbeit die Möglichkeit der reinen Reinfektion wahrscheinlicher. Über die allgemeine Häufigkeit von RSV-Reinfektionen kann aus der vorliegenden Studie keine Aussage gemacht werden. Da Patienten mit Reinfektionen aufgrund der für gewöhnlich geringeren Ausprägung der Erkrankung beim niedergelassenen Kinderarzt vorstellig werden oder erst gar nicht das medizinische Versorgungssystem in Anspruch nehmen müssen, wurden derartige Fälle in dieser Studie nicht erfasst.

4.8 Problematik unterschiedlicher Genotypisierungsmethoden

Das Gros der phylogenetischen Studien in den letzten Jahren wurde in Anlehnung an Peret et al. durch Analyse der zweiten variablen Region durchgeführt [Peret et al.,

1998]. Allerdings wird der Vergleich phylogenetischer Studien teilweise dadurch erschwert, dass einige Autoren die besagte Region noch weiter verkürzten [Parveen et al., 2006b] oder für die Analyse fast die gesamte Länge des G-Gens heranzogen [Zlateva et al., 2005] und eine neue Einteilung der Genotypen postulierten.

Struck et al. sequenzierten für die phylogenetische Analyse die erste variable Region und können daher nur indirekt unter Bezugnahme auf die Referenzgenotypen von Peret et al. mit anderen Studien verglichen werden [Peret et al., 1998; Struck et al., 2004]. Für eine Zusammenschau der Studien weltweit wäre es jedoch dienlicher, wenn sich alle auf eine gemeinsame Grundlage beziehen: den gleichen Genlokus.

Uneinigkeiten ergeben sich auch bei der Einführung neuer Genotypen. Die Einteilung der Genotypen ist bisher uneinheitlich [Cane, 2001]; d.h. es gibt keinen Konsens darüber, wie viele Basenaustausche stattfinden müssen, damit ein neuer Genotyp begründet ist. So wurden bei Kuroiwa et al. phylogenetisch scheinbar neue Cluster ohne Beweisführung unter Einbeziehung der Nukleotid-Variabilitäten als neue Genotypen postuliert [Kuroiwa et al., 2005]. Auch Peret et al., welcher die Einteilung in GA1-GA5 und GB1-GB4 hervorbrachte, bringt keinen Beleg für die Methodik, die der Einteilung zugrunde liegt [Peret et al., 1998]. Lediglich in einer Studie aus Südafrika waren die Autoren bemüht, die Festlegung neuer Genotypen unter Einbeziehung von Bootstrap-Werten und Variabilitäten zu begründen [Venter et al., 2001]. Vor dem Hintergrund dieser methodischen Unterschiede erscheint die Einführung standardisierter Methoden zur RSV-Genotypisierung sinnvoll, um den Vergleich der zirkulierenden Genotypen weltweit zu erleichtern.

4.9 Einschränkungen der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Studie unterliegt bei aller Sorgfalt in der Durchführung dennoch Einschränkungen, welche bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Zum Ersten handelt es sich um eine retrospektive Studie. Weiter wurden nur hospitalisierte Patienten berücksichtigt, sodass dann eine Selektion von Patienten mit schwerem Verlauf zu erwarten ist. Es wurden alle aus der Universitätskinderklinik eingegangenen Proben, die im Immunfluoreszenz-Screening positiv für RSV-Antigen waren, in die phylogenetische Untersuchung aufgenommen. Das Immunfluoreszenz-Screening besitzt eine geringere Sensitivität als eine PCR, sodass möglicherweise einige

RSV-positive Proben nicht als solche erkannt wurden [Reis et al., 2008]. Darüber hinaus war die Gesamtzahl der Einsendungen, die von vielen Faktoren beeinflusst wird, im Untersuchungszeitraum von Jahr zu Jahr sehr unterschiedlich.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Infektionen mit dem Respiratory Syncytial Virus (RSV) sind die häufigste virale Ursache für respiratorische Erkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern. Reinfektionen treten lebenslang auf. Es wurden zwei Typen (A und B) und mehrere Genotypen beschrieben. Die vorliegenden Daten über die molekulare Epidemiologie von RSV in Deutschland sind nur begrenzt.

Material und Methoden: Zwischen Januar 2002 und Juli 2006 wurden 221 Nasenrachensekrete (NRS) von Kindern, welche in der Universitätskinderklinik Würzburg behandelt wurden, durch Routine-Untersuchung mit einem Immunfluoreszenztest auf RSV-Antigen positiv befunden. Die phylogenetische Analyse wurde aus Restmaterial von 211 NRS durchgeführt, indem die zweite variable Region des G-Gens amplifiziert und sequenziert wurde.

Ergebnisse: Insgesamt war die Prävalenz von Typ A-Viren mit 69,5 % größer als die der Typ B-Viren mit 30,5 %. RSV Typ A war das dominierende Virus in allen Saisons außer in der Saison 2002-2003. Über den gesamten Beobachtungszeitraum traten drei A-Genotypen (GA2, GA5 und GA7) und vier B-Genotypen (GB3, SAB3, BA und ein neuer Genotyp) auf. Die Genotypen GA2, GA5, SAB3 und BA waren am häufigsten im Umlauf und in beinahe allen Saisons prävalent. Unter den B-Genotypen nahm der Anteil des Genotyps BA von 25 % (2002) auf 92 % (2005-2006) zu. Drei Typ B-Sequenzen wurden einem neuen Genotyp zugeordnet, welcher BWUE benannt wurde. Es wurde eine Reinfektion mit demselben Genotyp (GA5) bei einem Kind beobachtet, welches im Alter von 12 und 28 Monaten mit einer RSV-Infektion hospitalisiert war.

Schlußfolgerung: Die Ergebnisse unserer Studie stehen in Einklang mit der molekularen Epidemiologie von RSV in anderen geographischen Regionen. Wir beobachteten sowohl Genotypen, welche über mehrere Saisons prävalent waren, als auch Genotypen, welche über den beobachteten Zeitraum zunehmend dominanter werdend andere Genotypen verdrängten. Zudem wurde ein neuer B-Genotyp entdeckt.

6 Abkürzungsverzeichnis

RSV	Respiratory Syncytial Virus
CCA	Chimpanzee Coryza Agent
NRS	Nasenrachensekret
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
AS	Aminosäure
URTI	upper respiratory tract infection (Oberer Atemwegsinfekt)
LRTI	lower respiratory tract infection (Unterer Atemwegsinfekt)
cDNA	copyDNA
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
nt	Nukleotide
COPD	chronic obstructive pulmonary disease

7 Literaturverzeichnis

- Black CP. 2003. Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Respir Care* 48(3):209-231; discussion 231-203.
- Cane PA. 2001. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 11(2):103-116.
- Cane PA, Pringle CR. 1995. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J Virol* 69(5):2918-2925.
- Collins PL, Channock RM, Murphy BR. 2001. Respiratory Syncytial Virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields' Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins. p 1443-1485.
- Falsey AR. 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *Exp Lung Res* 31 Suppl 1:77.
- Falsey AR, Formica MA, Hennessey PA, Criddle MM, Sullender WM, Walsh EE. 2006. Detection of respiratory syncytial virus in adults with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 173(6):639-643.
- Falsey AR, Walsh EE. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev* 13(3):371-384.
- Freymuth F, Petitjean J, Pothier P, Brouard J, E. N. 1991. Prevalence of Respiratory Syncytial Virus A und B in France 1982 to 1990. *J Clin Microbiol* 29(3):653-655.
- Galiano MC, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. 2005. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *J Clin Microbiol* 43(5):2266-2273.
- Garcia O, Martin M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, Hortal M, Perez-Brena P, Martinez I, Garcia-Barreno B, et al. 1994. Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol* 68(9):5448-5459.

- Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, Anderson LJ. 1990. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis* 162(6):1283-1290.
- Haller OA, Mertens T, Klenk H-D. 2004. Respiratory Syncytial Virus. In: Haller OA, Mertens T, Klenk H-D, editors. *Diagnostik und Therapie von Viruserkrankungen*. 2nd ed. München: Elsevier GmbH, München. p 253-259.
- Kreth HW, Schuster V. 2005. Respiratory-Syncytial-Virus-Infektionen. In: Speer CP, Gahr M, editors. *Pädiatrie*. 2nd ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg. p 447-448.
- Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Yui I, Kase T, Nakayama T, Tsutsumi H. 2005. A phylogenetic study of human respiratory syncytial viruses group A and B strains isolated in two cities in Japan from 1980-2002. *J Med Virol* 76(2):241-247.
- McCarthy CA, Hall CB. 1995. Respiratory Syncytial Virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practise of Infectious Disease*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone Inc. p 1501-1518.
- McIntosh K. 2000. Respiratory Syncytial Virus. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. *Nelson Textbook of pediatrics*. 16th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. p 991-993.
- Mejias A, Chavez-Bueno S, Jafri HS, Ramilo O. 2005. Respiratory syncytial virus infections: old challenges and new opportunities. *Pediatr Infect Dis J* 24(11 Suppl):S189-196, discussion S196-187.
- Melero JA, Garcia-Barreno B, Martinez I, Pringle CR, Cane PA. 1997. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol* 78 (Pt 10):2411-2418.
- Mentel R, Ilgert U, Wegner U, Zimmerman K, Bruns R, Gurtler L. 2005. Molecular and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections in hospitalized children. *Med Microbiol Immunol* 194(1-2):67-71.
- Parveen S, Broor S, Kapoor SK, Fowler K, Sullender WM. 2006a. Genetic diversity among respiratory syncytial viruses that have caused repeated infections in children from rural India. *J Med Virol* 78(5):659-665.

- Parveen S, Sullender WM, Fowler K, Lefkowitz EJ, Kapoor SK, Broor S. 2006b. Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *J Clin Microbiol* 44(9):3055-3064.
- Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. 1998. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol* 79 (Pt 9):2221-2229.
- Piedra PA, Englund JA, Glezen WP. 2002. Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Viruses. In: Richman DD, Withley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical Virology*. 2nd ed. Washington: ASM Press. p 763-790.
- Reis AD, Fink MC, Machado CM, Paz Jde P, Jr., Oliveira RR, Tateno AF, Machado AF, Cardoso MR, Pannuti CS. 2008. Comparison of direct immunofluorescence, conventional cell culture and polymerase chain reaction techniques for detecting respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates from infants. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50(1):37-40.
- Sato M, Saito R, Sakai T, Sano Y, Nishikawa M, Sasaki A, Shobugawa Y, Gejyo F, Suzuki H. 2005. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J Clin Microbiol* 43(1):36-40.
- Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, Nokes DJ, Medley GF, Cane PA. 2004. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J Med Virol* 74(2):344-354.
- Sikkel MB, Quint JK, Mallia P, Wedzicha JA, Johnston SL. 2008. Respiratory syncytial virus persistence in chronic obstructive pulmonary disease. *Pediatr Infect Dis J* 27(10 Suppl):S63-70.
- Struck A, Forster J, Ihorst G, Werchau H, Konig W, Konig B. 2004. Respiratory syncytial virus: G gene genotype and disease severity. *Pediatr Infect Dis J* 23(11):1000-1002.
- Sullender WM. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev* 13(1):1-15, table of contents.
- Terletskaja-Ladwig E, Enders G, Schalasta G, Enders M. 2005. Defining the timing of respiratory syncytial virus (RSV) outbreaks: an epidemiological study. *BMC Infect Dis* 5(1):20.

- Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, Garcia-Barreno B, Melero JA, Palomo C. 2003. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol* 84(Pt 11):3115-3120.
- Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, Melero JA. 2006. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. *J Virol* 80(2):975-984.
- Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. 2001. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol* 82(Pt 9):2117-2124.
- Walsh EE, McConnochie KM, Long CE, Hall CB. 1997. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J Infect Dis* 175(4):814-820.
- Zlateva KT, Lemey P, Moes E, Vandamme AM, Van Ranst M. 2005. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol* 79(14):9157-9167.

8 Anhang

Tabelle 12. Identische Typ A-Sequenzen

Die fettgedruckten Sequenzen sind im phylogenetischen Baum dargestellt, darunter stehen die identischen Sequenzen, welche im Baum nicht erscheinen

Sequenz	Monat	Saison	URTI/LRTI
2004006529	Mar 04	3	LRTI
2006009150	Apr 06	5	-
2006003303	Feb 06	5	LRTI
2006007308	Mar 06	5	LRTI
2003001347	Jan 03	2	LRTI
2004007526	Mar 04	3	LRTI
2006005068	Feb 06	5	LRTI
2003004520	Feb 03	2	LRTI
2004009676	Apr 04	3	LRTI
2006005327	Mar 06	5	LRTI
2005005676	Mar 05	4	LRTI
2004003197	Feb 04	3	LRTI
2004003199	Feb 04	3	LRTI
2002026580	Nov 02	2	LRTI
2004007585	Mar 04	3	LRTI
2006006414	Mar 06	5	LRTI
2006008494	Apr 06	5	LRTI
2002006394	Mar 02	1	URTI
2006007001	Mar 06	5	LRTI
2002011722	May 02	1	LRTI
2002011974	May 02	1	LRTI
2002028871	Dec 02	2	LRTI
2004003701	Feb 04	3	LRTI
2006006563	Mar 06	5	LRTI
2006012163	May 06	5	URTI
2004009359	Apr 04	3	LRTI

2004009359	Apr 04	3	LRTI
2005008666	Apr 05	4	LRTI
2005004412	Feb 05	4	LRTI
2005004514	Feb 05	4	URTI
2005009148	Apr 05	4	LRTI
2006006086	Mar 06	5	LRTI
2006007107	Mar 06	5	LRTI
2006004741	Feb 06	5	LRTI
2006007889	Mar 06	5	-
2006003304	Feb 06	5	LRTI
2006008492	Apr 06	5	LRTI
2005002001	Jan 05	4	LRTI
2005005479	Feb 05	4	LRTI
2006012943	May 06	5	LRTI
2006013828	June 06	5	LRTI
2004007584	Mar 04	3	URTI
2004007639	Mar 04	3	LRTI
2005008527	Apr 05	4	LRTI
2005003039	Feb 05	4	LRTI
2005002271	Jan 05	4	LRTI
2005001330	Jan 05	4	LRTI
2005003040	Feb 05	4	LRTI
2005003890	Feb 05	4	LRTI
2005003983	Feb 05	4	LRTI
2005005916	Mar 05	4	LRTI
2006006910	Mar 06	5	-
2006004815	Feb 06	5	URTI
2006011863	May 06	5	LRTI
2006008217	Apr 06	5	LRTI
2006006913	Mar 06	5	LRTI
2006006914	Mar 06	5	LRTI
2004006252	Mar 04	3	LRTI
2004009411	Apr 04	3	LRTI

2004011291	May 04	3	LRTI
2004008745	Apr 04	3	LRTI
2004008512	Apr 04	3	LRTI
2005008662	Apr 05	4	LRTI
2006008791	Apr 06	5	LRTI
2005006140	Mar 05	4	URTI
2004007728	Mar 04	3	LRTI
2004006337	Mar 04	3	LRTI
2004006936	Mar 04	3	LRTI
2006006182	Mar 06	5	LRTI
2006009813	Apr 06	5	LRTI
2006009161	Apr 06	5	LRTI
2006002402	Jan 06	5	LRTI
2006005515	Mar 06	5	LRTI
2005006101	Mar 05	4	LRTI
2005005236	Feb 05	4	LRTI
2005003461	Feb 05	4	-
2006005800	Mar 06	5	LRTI
2006009374	Apr 06	5	LRTI
2006007991	Mar 06	5	LRTI
2006007479	Mar 06	5	LRTI
2006008527	Apr 06	5	LRTI
2006012716	May 06	5	LRTI
2005005915	Mar 05	4	LRTI
2004030780	Dec 04	4	LRTI
2005006330	Mar 05	4	LRTI
2005006137	Mar 05	4	LRTI
2005000546	Jan 05	4	LRTI
2005007847	Mar 05	4	LRTI
2005007198	Mar 05	4	LRTI
2005001803	Jan 05	4	LRTI
2005005474	Feb 05	4	LRTI
2005008313	Mar 05	4	LRTI

2005002322	Jan 05	4	LRTI
2004028046	Nov 04	4	LRTI
2004028047	Nov 04	4	LRTI
2005001294	Jan 05	4	LRTI
2005003945	Feb 05	4	LRTI
2005007604	Mar 05	4	LRTI
2005008167	Mar 05	4	LRTI
2005002178	Jan 05	4	LRTI
2005002977	Feb 05	4	URTI
2004031678	Dec 04	4	LRTI
2004031680	Dec 04	4	LRTI
2005000443	Jan 05	4	LRTI

Tabelle 13. Identische Typ B-Sequenzen

Die fettgedruckten Sequenzen sind im phylogenetischen Baum dargestellt, darunter stehen die identischen Sequenzen, welche im Baum nicht erscheinen.

Sequenz	Monat	Saison	URTI/LRTI
2006010407	Apr 06	5	LRTI
2006009455	Apr 06	5	LRTI
2006005496	Mar 06	5	LRTI
2002027760	Nov 02	2	-
2006001290	Jan 06	5	LRTI
2006010512	May 06	5	LRTI
2006011056	May 06	5	-
2006008741	Apr 06	5	LRTI
2006009606	Apr 06	5	LRTI
2004005222	Mar 04	3	LRTI
2004004638	Feb 04	3	LRTI
2006008091	Apr 06	5	LRTI
2006010493	May 06	5	LRTI

2006006728	Mar 06	5	LRTI
2006009143	Apr 06	5	LRTI
2006005941	Mar 06	5	LRTI
2006006729	Mar 06	5	LRTI
2002027255	Nov 02	2	URTI
2002027433	Nov 02	2	LRTI
2002030116	Dec 02	2	LRTI
2002026704	Nov 02	2	URTI
2002028290	Dec 02	2	URTI
2003003022	Feb 03	2	URTI
2003003163	Feb 03	2	URTI
2004004759	Feb 04	3	LRTI
2004004760	Feb 04	3	LRTI
2006006835	Mar 06	5	LRTI
2006007325	Mar 06	5	URTI
2003002932	Feb 03	2	LRTI
2002028077	Nov 02	2	LRTI
2002030138	Dec 02	2	LRTI
2002029159	Dec 02	2	LRTI
2002027137	Nov 02	2	LRTI
2004004862	Feb 04	3	LRTI
2004008237	Apr 04	3	LRTI

9 Danksagung

Wenn ich an meine Zeit im Diagnostiklabor des Instituts für Virologie und Immunbiologie zurückschaue, dann fallen mir folgende Mitarbeiter ein, welche in der einen oder anderen Form für mich sehr wichtig waren: Barbara Würz, Barbara Scheiner, Birgit Steinmetz, Desiree Loos, Eonika Löscher-Hotz, Irina Hensel, Julia Braun, Karin Sell, Michaela Fleck, Miriam Mildner, Sabine Pohli, Ulla Herre, und Jörg Schubert. Weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der Universitätskinderklinik Kerstin Blessing und Prof. Dr. med. H. W. Kreth. Für die Hilfe bei statistischen Fragestellungen bin ich Wiebke Bruhn zu großem Dank verpflichtet.

Besonders danke ich Benedikt Weißbrich und Florian Neske, welche mir eine hervorragende Betreuung zukommen ließen.

Ich bedanke mich bei dem Referenten Prof. Dr. med. Axel Rethwilm und dem Koreferenten Prof. Dr. med. Johannes Liese für die Übernahme dieser Aufgabe.

Großer Dank gilt meinen Eltern Monika und Josef Schneiderbanger, die mich während meines Studiums in jeder Hinsicht liebevoll unterstützten, und damit den Grundstein für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit setzten. Meinen Brüdern Marc und Dirk danke ich dafür, dass sie mir immer ein Vorbild waren und mir jederzeit mit Rat zur Seite standen.