

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. L. Gürtler)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald

Thema:
Molekulare Charakterisierung von Enteroviren und Assoziation mit
klinischen Syndromen

Inaugural - Dissertation
zur

Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Medizinischen Fakultät
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2004

vorgelegt von:
Anke Reißmann
geb. am 23.02.1979
in Greifswald

Dekan: Prof. Dr. H. K. Kroemer

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. R. Mentel

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. H. W. Doerr

(3. Gutachter:)

Ort, Raum: Greifswald, Konferenzraum Medizinische Mikrobiologie

Tag der Disputation: 17.06.2004

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Enteroviren	5
1.1.1.	Aufbau und Eigenschaften	5
1.1.2.	Pathogenese, Klinik und Therapie	13
2.	Zielstellung	22
3.	Material und Methoden	23
3.1.	Patientengut	23
3.2.	Antikörperbestimmung	24
3.3.	Qualitativer Nachweis von Enterovirus RNA mittels RT-PCR	25
3.3.1.	Virus-RNA-Extraktion	25
3.3.2.	Allgemeine Enterovirus spezifische nRT-PCR	26
3.3.2.1.	Primer-Set	28
3.3.2.2.	Arbeitsschema	30
3.3.3.	Coxsackievirus B spezifische nRT-PCR	32
3.3.3.1.	Primer-Set	32
3.3.3.2.	Arbeitsschema	32
3.4.	Quantitativer Nachweis von Enterovirus RNA mittels Real-time PCR	34
3.4.1.	Primer-Set	35
3.4.2.	Arbeitsschema	35
3.5.	Sequenzierung	37

3.5.1.	Amplifikation der RNA	37
3.5.1.1.	Primer-Set	37
3.5.1.2.	Arbeitsschema	37
3.5.2.	Reinigung der PCR Produkte	39
3.5.3.	Sequenzreaktion	40
3.5.3.1.	Arbeitsschema	40
3.5.4.	Ethanol-fällung	41
3.5.5.	Automatische Sequenzanalyse	41
4.	Ergebnisse	43
4.1.	Nachweis Enterovirus spezifischer Sequenzen mittels nRT-PCR in Patientenmaterialien	43
4.2.	Bestimmung des Anteils von Coxsackievirus B mittels Coxsackievirus B spezifischer nRT-PCR	47
4.3.	Quantifizierung der Virusmenge mittels Real-time PCR	49
4.4.	Bestimmung des Enterovirus Serostatus	52
4.5.	Alters- und Geschlechtsverteilung von Patienten mit einer Enterovirus Infektion	54
4.6.	Saisonale Verteilung der Hospitalisierung auf Grund von Infektionen mit Enterovirus Ätiologie	55
4.7.	Assoziation der Enterovirusinfektionen mit klinischer Symptomatik	57
4.8.	Genotypische Charakterisierung der zirkulierenden Enteroviren	62
4.9.	Assoziation der Serotypen mit klinischer Symptomatik	70

5.	Diskussion	73
6.	Zusammenfassung	85
7.	Quellenverzeichnis	87
8.	Anhang	107
	Eidesstattliche Erklärung	107
	Lebenslauf	108
	Danksagung	109

Abkürzungsverzeichnis

CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CB	Coxsackievirus B
DAF	Decay-accelerating Faktor
EC	ECHO-Virus
ELISA	Enzyme-Linked-Immunnosorbent-Assay
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
GCG	Genetic Computer group
ICAM	Intercellular-Adhesion-Molecule
IDDM	Insulin-Dependent-Diabetes-Mellitus
II	Interleukin
IRES	Internal Ribosome Entry Side
NPEV	Non-Polio-Enteroviren
NTR	Non-Translated-Region
OD	Optische Dichte
RVC-domain	RNA-virus-capsid-domain
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TNF	Tumornekrosefaktor
VP	virales Protein
VPg	virales Protein genomassoziiert
ZNS	Zentralnervensystem

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	Seite
Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Coxsackieviren B	5
Abb. 2: Aufbau des Enteroviruskapsid; Kapsidproteine VP1,VP2 und VP3 mit Canyonregion	6
Abb. 3: Struktur der Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 unter Darstellung der RVC-Domäne	7
Abb. 4: Sekundärstruktur der 5`-NTR mit IRES-Region	9
Abb. 5: Aufbau des RNA-Genoms	10
Abb. 6: Strukturformel Pleconaril	20
Abb. 7: Nachweisgrenze der Enterovirus nRT-PCR mit den Primern CX3/10 und CX8/9; Serienverdünnung von RNA gewonnen aus Coxsackievirus B4 infizierten Zellkulturen	43
Abb. 8: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit PCR-Produkten aus Patientenmaterial (Liquor cerebrospinalis), amplifiziert mit dem Enterovirus Primerset CX3/10 und CX8/9	44
Abb. 9: Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit PCR-Produkten aus Patientenmaterial (Liquor cerebrospinalis), amplifiziert mit dem für Coxsackievirus B spezifischen Primerset CX4/7 und CX2/3	47

Abb. 10: Amplifikationskurven der Enterovirus Real-Time PCR, Serienverdünnung von Coxsackievirus B3 cDNA 26 ng bis 2,6 pg mit Ct-Werten von 16.6, 19.8, 24.2, 26.2, 30.0	49
Abb. 11: Standardkurve, Korrelationskoeffizient 0,995	50
Abb. 12: Amplifikationskurven von Serumproben in der Real-time PCR	51
Abb. 13: Amplifikationskurven von Stuhlproben in der Real-time PCR	51
Abb. 14: Altersverteilung von Patienten mit einer Enterovirus Infektion	54
Abb. 15: Geschlechtsverteilung der Patienten mit einer Enterovirus Infektion	55
Abb. 16: Monatsverteilung der Enterovirus Infektionen im analysierten Zeitraum von Juni 1999 bis Dezember 2001	56
Abb. 17: Aufteilung der Enterovirus Infektionen auf einsendende Institutionen	57
Abb. 18: Enteroviruspezifische nRT-PCR unter Verwendung der Sequenzierungsprimer P2/4 und P6/9 von Proben	63
Abb. 19: Elektropherogramm der Patientenprobe 3	64

- Abb. 20: Dendrogramm der Coxsackievirus B Isolate von Patienten (G) und Coxsackievirus B Prototype-Strains (CB1 Gen- Bank M16560, CB2 AF081485, CB3 M16572, CB4 D00149, CB5 X67706, CB6 AF114384) 67
- Abb. 21: Vergleich der Aminosäuresequenzen der 5`-NTR von ECHO- Virus 6 Isolaten bei einem Meningitisausbruch und Referenzstamm (U16283) 68
- Abb. 22: Dendrogramm der ECHO-Virus Isolate von Patienten (G) und ECHO-Virus Prototype-Strains (E5 AF083069, E6 U16283, E9 X84981, E11-1 X80059, E11-2 AF447477, E17 AF 412366) 69

<u>Tabellenverzeichnis</u>	Seite
Tab. 1: Mit Enteroviren bisher assoziierte Krankheitsbilder	16
Tab. 2: Art und Anzahl des analysierten Materials	23
Tab. 3: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer und Probes	29
Tab. 4: Ergebnisse der Enterovirus Screening-PCR	45
Tab. 5: Ergebnisse der Enterovirus Screening-PCR bei gleichzeitig untersuchten Liquor- und Serumproben	46
Tab. 6: Ergebnisse der Coxsackievirus B spezifischen PCR	48
Tab. 7: Spezifische Enterovirus Antikörper von 209 Serumproben	52
Tab. 8: Monitoring des Enterovirus Antikörperstatus von 15 Patienten	53
Tab. 9: Patienten mit virologischer Diagnose Enterovirus Infektion und mitgeteilten Arbeitsdiagnosen (n=211)	59
Tab. 10: Serotypenzugehörigkeit der Enterovirus Isolate	65
Tab. 11: Krankheitsbilder und assoziierte Serotypen	70
Tab. 12: Monitoring einer Enterovirus Infektion eines knochenmarktransplantierten Patienten	71

1. Einleitung

Die Zahl der Viren, die ätiologisches Agens von Infektionen des Zentralnervensystems (ZNS) sein können, ist durch die Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten, insbesondere durch die Einführung molekularer Techniken, ständig gewachsen.

Häufig sind Infektionen mit Viren aus den Familien der Herpesviridae, Picornaviridae und Flaviviridae. Des Weiteren können Adenoviren, besonders Typ 3 und 7, Orthomyxoviren, Paramyxoviren, Arenaviren, Togaviren, Rabiesvirus und die Retroviren HIV 1 und HIV 2 sowie HTLV 1 mögliches Agens sein. Zu den in Europa nicht endemischen Viren, die an ZNS-Infektionen beteiligt sind, gehören u. a. Viren aus der Familie der Flaviviren, der Bunyaviren und der Togaviren (Doerr et al., 2002).

Die klinischen Symptome der ZNS-Infektion sind in der Regel wenig virusspezifisch. Meist bestehen Kopfschmerzen, erhöhte Temperaturen und Nackensteifigkeit, seltener Erbrechen, Lichtempfindlichkeit und Vigilanzstörungen.

Bei einigen Viren lassen anamnestische Daten wie Auslandsaufenthalte, Zeckenbiss beim FSME-Virus oder der Biss durch ein erkranktes Tier beim Rabiesvirus Rückschlüsse auf den Erreger zu.

Auch vorausgegangene oder Begleiterkrankungen wie die Herpangina bei Coxsackievirus Infektionen, Parotitis, Pankreatitis und Orchitis bei Mumpsvirus oder Symptome der infektiösen Mononukleose bei Epstein-Barr-Virus Infektionen können differentialdiagnostisch hinsichtlich des ätiologischen Agens von Bedeutung sein.

Eine negative Virusdiagnostik schließt bei entsprechender Klinik eine Virusinfektion nicht aus. Beweisend ist jedoch der Erregernachweis.

Die Herpesvirus bedingte Enzephalitis ist von hoher Relevanz, da die Infektion unbehandelt eine Letalität von 70% aufweist (Masuhr et al., 1998). Hier ist eine Virusdiagnostik bei der Führung der antiviralen Therapie wichtig.

Im Genus Enteroviren lag bis zur Einführung der Poliovakzine 1954 die Hauptbedeutung bei den Polioviren (Kayser et al., 1998). Bei etwa 1-2% der Infizierten kommt es zu einer aseptischen Meningitis mit Muskelkrämpfen und Rückenschmerzen. Von diesen entwickeln bis zu 2% das typische Bild der Poliomyelitis mit schlaffen Lähmungen. 80% der so Erkrankten behalten Dauerschäden in Form von Paresen unterschiedlichen Ausmaßes. 10% dieser Verläufe enden letal. Diese Komplikationen einer manifesten Infektion waren der entscheidende Impuls für die Entwicklung eines Impfstoffes (Hahn et al., 1999).

Durch die Schutzimpfung konnte die Zahl der Polioerkrankungen in Deutschland von 4461 Fällen 1961 auf 2-4 Fälle pro Jahr in den achtziger Jahren gesenkt werden. Die letzten beiden durch Wildviren verursachten Poliofälle wurden 1986 und 1990 beobachtet, die letzten zwei importierten Poliomyelitiserkrankungen wurden 1992 registriert (Jilg et al., 2000).

Seit dem 21. Juni 2002 gilt Europa als poliomyelitisfrei (WHO, 2002). In nur noch 6 Staaten weltweit werden Infektionen durch zirkulierende Wildviren registriert. 90% aller Poliofälle fallen auf Indien, Nigeria und Pakistan (Poliomyelitiseradication Organisation, 2002).

Die anderen Viren des Genus Enteroviren, Cocksackieviren A und B, ECHO-Viren und Enteroviren 68 bis 71, auch als Non-Polio-Enteroviren (NPEV) bezeichnet, haben inzwischen auf Grund verbesserter Diagnostik an Bedeutung gewonnen.

Verschiedene Faktoren von Seiten des Virus und des Wirtes beeinflussen den Verlauf der Infektion und die Art der Symptome.

Da keine Meldepflicht besteht, ist die Inzidenz nur schätzbar. In den USA geht man von einer jährlichen Inzidenz von 4,4/100.000 Einwohner aus. Für Deutschland gibt es keine einheitlichen Daten. Für Sachsen wird die jährliche Inzidenz mit 1,8/100.000 Einwohner angegeben (Böttner et al., 2002).

NPEV verursachen nicht nur weltweit endemisch Virusinfektionen, sondern auch epidemische Ausbrüche. Die letzten größeren Epidemien in Deutschland waren 1997 in Frankfurt am Main verursacht durch ECHO-Virus 30 (Buxbaum et al., 2001) und 2000 in Leipzig verursacht durch ECHO-Virus 13 (Böttner et al., 2002). Kleinere Ausbrüche durch ECHO-Virus 6 sind auch im Nordosten beobachtet worden (Mentel et al., 2002).

NPEV können ein breites Spektrum von Erkrankungen verursachen. Sie sind die Hauptursache für aseptische Meningitis. In 80–92% aller Fälle mit diagnostiziertem Erreger ist das ätiologische Agens NPEV (Sawyer et al., 2002).

Zahlreiche Daten weisen auf eine Assoziation von NPEV mit Myokarditis hin (Heim et al., 1997, Pauschinger et al., 1998). 67% der Fälle von viralen Infektionen mit kardiovaskulären Symptomen sind NPEV-bedingt (Why et al., 1995).

Enterovirus Infektionen haben in der Regel eine gute Prognose. Das trifft jedoch nicht auf die Erkrankung von Neugeborenen zu. Hier liegt die Letalität auf Grund disseminierter Infektion bei bis zu 42% (Abzug et al., 2001).

Die inzwischen bestehende Möglichkeit, lebensbedrohliche NPEV Infektionen mittels Pleconaril spezifisch zu therapieren, zeigt, dass einer schnellen Diagnostik Enterovirus bedingter Erkrankungen eine große Bedeutung zukommt (Hayden et al., 2002).

Ein großer Fortschritt wurde dabei durch die Einführung molekularer Methoden erreicht.

Der Nachweis der RNA mittels RT-PCR ist von hoher Sensitivität und für die Untersuchung unterschiedlicher Materialien geeignet (Romero et al., 1999). Durch nachfolgendes Sequenzieren der Amplifikate kann unter Nutzung variabler Regionen eine Serotypisierung erreicht werden.

1.1. Enteroviren

1.1.1. Aufbau und Eigenschaften

Die Enteroviren gehören zur Familie der Picornaviridae. Der Genus Enterovirus ist unterteilt in Polioviren mit 3 Serotypen, Coxsackieviren A und B mit 23 bzw. 6 Serotypen und ECHO-Viren mit 29 Serotypen sowie die Enteroviren 68, 69, 70 und 71.

Alle Enteroviren zeigen einen ähnlichen Aufbau. Sie bestehen aus einem unbehüllten ikosaedrischen Nukleokapsid von ca. 30 nm Durchmesser (Abb. 1). Im Inneren befindet sich eine einzelsträngige RNA von ca. 7,4 kb Länge. Das gesamte Virion hat ein Molekulargewicht von ca. $8,5 \times 10^6$ kDa. 30% entfallen auf die genomische RNA.

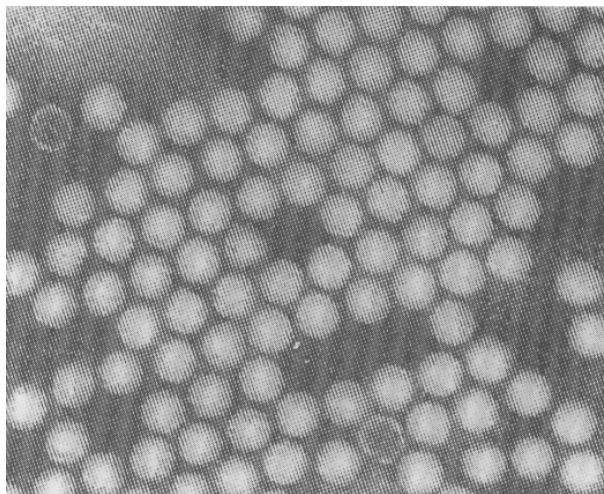


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Coxsackieviren B (Schwarz et al., 1996)

Das Kapsid setzt sich aus 60 Untereinheiten, bestehend aus den Strukturproteinen VP1, VP2, VP3 und VP4, zusammen. VP4 ist an der Innenseite des Kapsids lokalisiert und interagiert mit dem Genom. VP1, VP2 und VP3 bilden die Außenflächen des Icosaeders. Der Hauptanteil entfällt dabei auf VP1. An den Icosaederecken befindet sich jeweils eine grabenähnliche Vertiefung, der Canyon, welcher durch Wechselwirkung von VP1, VP2 und VP3 entsteht (Abb. 2).

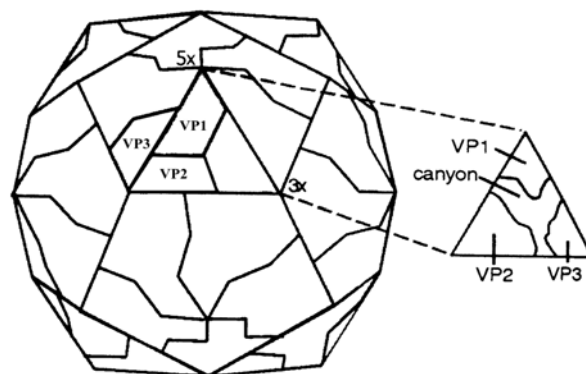


Abb. 2: Aufbau des Enteroviruskapsid; Kapsidproteine VP1,VP2 und VP3 mit Canyonregion (Fields et al., 2001)

Über die Aminosäurereste, die mit ihren funktionellen Gruppen die Seitenwände des Canyons bilden, wird die Bindung an spezielle Zellrezeptoren realisiert.

Zunächst nahm man an, dass neutralisierende Antikörper wegen ihrer Größe und Struktur nicht in der Lage sind, in den Canyon einzudringen, sondern nur an oberflächliche Epitope binden und so sterisch die Adsorption des Virus behindern. Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass Überlappungen im Bereich der Rezeptorbindungsstelle und der Bindungsstellen der Antikörper vorliegen (Rossmann et al., 2002).

Über eine am Canyonboden befindliche Pore besteht eine Verbindung in das Partikelinnere. In der Porenregion findet sich ein Pocket-Factor, der zur Stabilisierung der Viruskapside beitragen soll (Rossmann et al., 2002).

Durch die Adsorption an die Wirtszelle erfolgen strukturelle Umlagerungsprozesse des Viruskapsids, die zu einer Destabilisierung führen und die Ausschleusung viraler RNA über die Ikosaederecken ermöglichen.

Röntgenstrukturanalysen haben ergeben, dass die Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 der verschiedenen Virustypen sehr ähnliche Faltungsmuster aufweisen. Diese sogenannte RNA-virus-capsid-domain (RVC-domain) setzt sich aus acht antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen zusammen, die über Aminosäureschleifen so miteinander verbunden sind, dass sie die Seitenflächen eines Keiles bilden (Abb. 3).

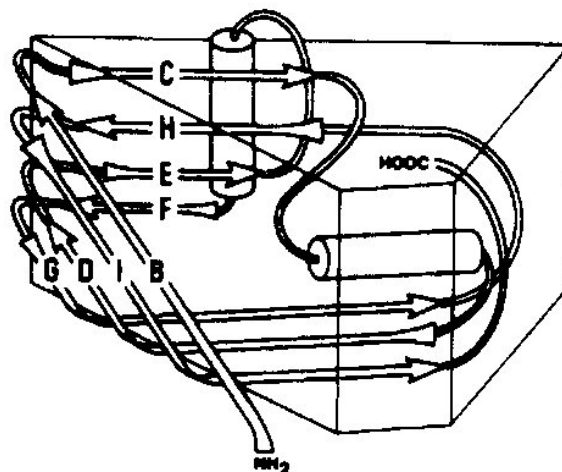


Abb. 3: Struktur der Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 unter Darstellung der RVC-domain (Modrow et al., 2003)

Die verbindenden Aminosäureschleifen sind in ihrer Länge und Sequenz sehr variabel und enthalten Epitope, gegen die bei Infektion neutralisierende Antikörper gebildet werden. Die aminoterminalen Regionen der Kapsidproteine liegen im Inneren und bilden dort ein Netzwerk.

Die RNA lässt sich funktionell in drei Abschnitte gliedern: die 5'-nichttranslatierte Region (NTR), die Kodierungsregion (P1, P2, P3) und die 3'-nichttranslatierte Region (NTR) einschließlich Poly-A-tail.

Die 5'-NTR ist mit 711 bis 750 Nukleotiden wesentlich länger als die 3'-NTR mit 69 bis 106 Nukleotiden (Rotbart et al., 1995). An das 5'-Ende ist ein kleines viruskodiertes Protein, VPg (virales Protein genomassoziiert), von ca. 22 Aminosäuren Länge kovalent gebunden. Es wurde für das VPg eine Primerfunktion bei der RNA-Synthese postuliert.

Die virale RNA hat Plusstrangpolarität und kann sofort translatiert werden. Bei der mRNA ist nur das VPg abgespalten.

Für die Translation hat die 5'-NTR eine entscheidende Bedeutung. Die Nukleotide liegen hier zu einem hohen Prozentsatz in intramolekularer Basenpaarung vor, so dass dieser Abschnitt eine ausgeprägte Sekundärstruktur besitzt (Abb. 4).

Die 5'-NTR hat auf diese Weise die Aktivität einer Internal Ribosome Entry Site (IRES) und erlaubt die Bindung von Ribosomen unabhängig von der gewöhnlich bei eukaryotischen mRNA-Molekülen vorliegenden 5'-Cap-Struktur.

Alle Enteroviren weisen in diesem etwa 650 Nukleotide umfassenden Bereich der 5'-NTR ein hohes Maß an Homologie auf, so dass er eine geeignete Matrix zur Selektion von Primern für eine Screening-PCR bildet (Romero et al., 1999, Georgopoulou et al., 2001).

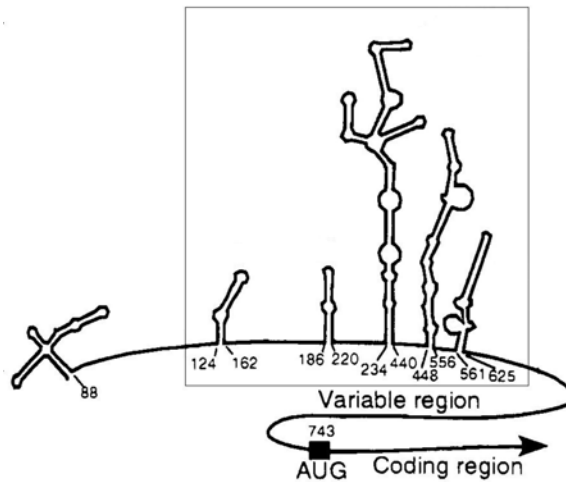


Abb. 4: Sekundärstruktur der 5`-NTR mit IRES-Region (Fields et al., 2001)

Im Anschluss folgt eine variable Region. Mutationen in dieser Region können Translatierbarkeit und Virulenz stark beeinflussen. Experimentell wurde bei Viren, die Nucleotidverluste im 3`-Grenzbereich der IRES-Region aufwiesen, eine Abnahme der Virulenz und der Wachstumsgeschwindigkeit in der Zellkultur gezeigt (Rotbart et al., 1995).

Das Genom der Enteroviren enthält einen offenen Leserahmen, welcher für ein großes Polyprotein kodiert. Dieses Polyprotein beinhaltet sowohl Strukturproteine als auch Nichtstrukturproteine und umfasst mehr als 2100 Aminosäuren. Es wird noch während der Synthese in verschiedene Proteine gespalten (Abb. 5).

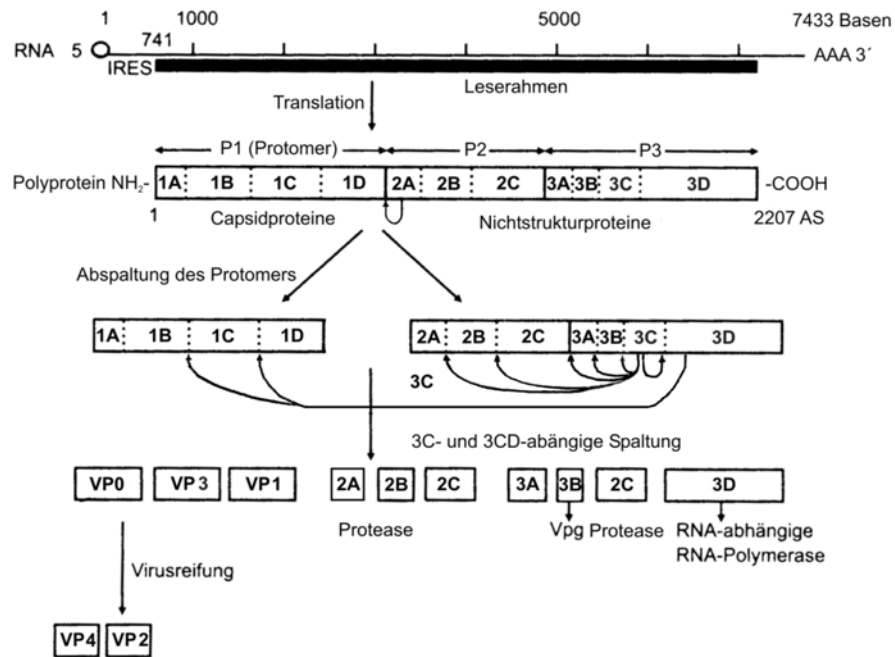


Abb. 5: Aufbau des RNA-Genoms (Modrow et al., 2003)

Man unterscheidet drei große Bereiche P1, P2 und P3.

P1 umfaßt die späteren Kapsidproteine und ist im aminoterminalen Bereich lokalisiert. Die einzelnen Abschnitte für die späteren Proteine werden mit 1A bis 1D bezeichnet. Aus Abschnitt 1A resultiert VP4, aus 1B VP2, aus 1C VP3 und aus 1D VP1.

Im mittleren Teil P2 sind die Nichtstrukturproteine 2A bis 2C lokalisiert. Sie dienen vorwiegend der Modulation des Wirtszellstoffwechsels und besitzen teilweise proteolytische Aktivität.

Der am carboxyterminalen Ende liegende Bereich P3 umfaßt die Proteine 3A bis 3D, aus denen dann die enzymatisch aktiven Komponenten und einige Nichtstrukturproteine entstehen.

Zuerst wird das Protomer, bestehend aus den Proteinen VP0, VP3 und VP1, synthetisiert, welche sofort durch die direkt nachfolgend synthetisierte Cysteinprotease 2A abgespalten werden.

Die Prozessierung von Protein VP0 führt zu den Kapsidproteinen VP2 und VP4. Die Spaltung von VP0 erfolgt erst sehr spät im Rahmen der Virusreifung, da hierfür eine enge Wechselwirkung von viralem RNA-Genom und noch unreifem Partikel notwendig ist. Die proteolytische Wirkung geht dabei von einem Serinrest an Position 10 des VP2-Anteils aus. Eine Base des Genoms dient als Protonendonator.

Die 2A-Protease bewirkt neben der Protomerabspaltung auch ein Cleavage in zellulären Proteinen. Sie induziert den Abbau des Wirtsproteins p220, welches Teil des Cap-Bindungskomplexes ist, der für die Translationsinitiation essentiell ist. Dies bewirkt eine Hemmung der zellulären Proteinsynthese (Modrow et al., 2003).

Experimente haben gezeigt, dass das Protein 2B an der Replikation des Genoms beteiligt ist und durch Porenbildung in Plasmamembranen zu einer Modifikation der Permeabilität führt (Van Kuppeveld et al., 1996, De Jong et al., 2003).

Das Protein 2C besitzt eine NTP-Bindungsstelle und ist funktionell mit der Initiation der RNA-Synthese sowie der Enkapsidierung verbunden. Mutationen im Bereich der NTP-Bindungsstelle sind für die Viren letal.

Beim Protein 3A handelt es sich um den hydrophoben Teil zur Membranverankerung des 3AB-Vorläufermoleküls. Das 3A-Protein beeinflusst die Uridinylierung von Protein 3B, welches dem VPg entspricht. Über den Uridinrest ist VPg am 5'-Ende des Genoms verestert.

Protein 3C ist eine Protease, welche sich autokatalytisch aus dem Polyprotein abspaltet. Sie führt alle übrigen Spaltungen im Polyprotein außer der Protomerabspaltung durch und ist am spezifischen Abbau zellulärer Komponenten beteiligt.

Beim Protein 3D handelt es sich um eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, mit der ein RNA-Strang mit Negativorientierung

synthetisiert wird, der dann als Matrix für neue positiv orientierte Genome dient. Die 3D-Polymerase weist eine hohe Fehlerrate auf, da sie keine Korrekturaktivität besitzt (Oprisan et al., 2002).

Enteroviren bleiben bei pH 3 über mehrere Stunden stabil. Bei pH 4 bis 8 können sie mehrere Tage aktiv bleiben. In ihrem Temperaturverhalten sind sie, abgesehen von einer Stabilisierung durch Magnesiumchlorid, relativ hitzelabil. Im CsCl₂ Gradienten zeigen sie eine Dichte von 1,34 g/ml. Auf Grund des Fehlens einer Hülle sind Enteroviren gegenüber einer Reihe von desinfizierenden Substanzen wie 70%igem Alkohol und Äther unempfindlich. Eine komplette Inaktivierung wird durch Behandlung mit 0,1 N Salzsäure oder 0,3%igem Formaldehyd erreicht.

1.1.2. Pathogenese, Klinik und Therapie

Enteroviren kommen weltweit vor. Ihr natürliches Reservoir ist der Mensch. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich auf fäkal-oralem Weg, aber auch Tröpfcheninfektionen sind von Bedeutung. Die Infektionen treten im gemäßigten Klima gehäuft während der Sommerperiode und im Frühherbst, in tropischen Gebieten ganzjährig auf. Die Inkubationszeit ist sehr variabel und reicht von 12 Stunden bis zu 35 Tagen. Bei Art, Ausprägung und Verlauf von Enterovirusinfektionen sind einige demographische Faktoren wie Alter, Geschlecht und sozio-ökonomischer Status von Bedeutung.

Die meisten Enterovirus Infektionen betreffen jüngere Kinder im Alter zwischen 1 und 4 Jahren (Stalkup et al., 2002). 53-63% der Klinik-einweisungen von Kindern mit akuten fieberhaften Erkrankungen im Sommer und Herbst sind mit Enteroviren assoziiert. Etwa die Hälfte dieser Kinder bietet Symptome einer Meningitis (Romero et al., 2001).

Häufig verlaufen die Erkrankungen bei jüngeren Kindern milder als bei älteren Kindern und Erwachsenen, was zu einer Überrepräsentation der höheren Altersgruppen in den Fällen mit Komplikationen führt (Fields et al., 2001).

Bei Neugeborenen können Enteroviren zu einer fulminanten Sepsis mit Hepatitis, Myokarditis und Encephalitis führen.

Männer sind von Enterovirusinfektionen bis 2,5 mal häufiger betroffen als Frauen (Fields et al., 2001).

Zentrale Bedeutung bei der Infektabwehr von Enteroviren hat die Bildung neutralisierender Antikörper. Abwehrgeschwächte insbesondere Patienten mit Agammaglobulinämie zeigen eine höhere Manifestationsrate bei Enterovirus Infektionen. Die Verläufe gestalten sich

hier häufig chronisch im Sinne einer chronischen Meningo-encephalitis, Dermatomyositis, Hepatitis und/oder Arthralgie (Halliday et al., 2003). Gleiches gilt für Patienten mit sekundärer Immunschwäche wie nach Stammzelltransplantation (Reusser et al., 2002) oder Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (Moschovi et al., 2002).

Chronische Infektionen wurden auch bei Patienten mit normalem Immunglobulinlevel beobachtet, die nicht in der Lage waren, spezifische neutralisierende Antikörper gegen Coxsackieviren zu bilden (Moschovi et al., 2002).

Faktoren, die die Persistenz von Enteroviren in Geweben ermöglichen, sind die Nutzung spezieller Zellrezeptoren z. B. DAF und Mutationen in der 5'-NTR der Viren gekoppelt mit Mutationen an weiteren Stellen des Genoms.

Die Persistenz von Coxsackieviren im menschlichen Herzmuskelgewebe wird als eine Ursache der chronischen Myokarditis bzw. der dilatativen Kardiomyopathie angesehen (Frisk et al., 2001). In biotischem Material konnte Coxsackievirus RNA nachgewiesen werden (Pauschinger et al., 1999).

Nach Aufnahme der Enteroviren über den Nasenrachenraum bzw. den Gastrointestinaltrakt findet eine erste Virusvermehrung in den Halslymphknoten und in den Peyerschen Plaques des Darmes statt. Zur Adhäsion an die Zellen nutzen Coxsackieviren Rezeptoren der Immunglobulinsuperfamilie wie ICAM-1 und den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR). ECHO-Viren nutzen den CD55-Rezeptor und Proteine aus der Rezeptorfamilie der Integrine (Rossmann et al., 2002, Karttunen et al., 2003).

Häufig kommt die Infektion bei der ersten Vermehrung durch das Wirtsimmunsystem zum Stillstand (Modlin et al., 1995, Archer et al.,

2001). Folgt nach der ersten Vermehrung im lymphatischen Gewebe eine zweite Virämie, erreichen die Viren via Blutstrom bzw. infizierte Lymphozyten die jeweiligen Zielorgane (Mena et al., 1999). In infizierter Muskulatur entstehen fokale Nekrosen. Die Zellen zerfallen schollenartig. Gleiches gilt für infizierte Neurone und Gliazellen (Modrow et al., 2003).

Die Enteroviren selbst führen durch Abschalten der Wirtszellproteinsynthese und Auslösung apoptotischer Vorgänge zur Zellyse. Zytotoxische T-Zellen können auch die Lyse infizierter Zellen hervorrufen (Fields et al., 2001). Die Infiltration des Gewebes mit Monozyten und Lymphozyten sowie die Produktion von Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL } 1\beta$ und $\text{IL } 6$ führt über die Ausbildung einer Entzündungsreaktion ebenfalls zur Zellyse.

Die Elimination der Viren erfolgt über neutralisierende Antikörper vom Typ IgM, IgG und IgA.

Enteroviren verursachen eine Vielzahl von Erkrankungen, die neben einfachen respiratorischen und Magen-Darm-Infektionen, Enzephalitis, Myokarditis und Hepatitis umfassen (Tab. 1).

Ein Serotyp kann mit verschiedenen klinischen Bildern assoziiert sein. Umgekehrt kann ein klinisches Krankheitsbild von mehreren Serotypen hervorgerufen werden.

Im Rahmen der Manifestation einer Enterovirus Infektion sind Fieber, Übelkeit und Erbrechen, allgemeine Schwäche und Unwohlsein, respiratorische Zeichen, Durchfall sowie Exanthem häufige Symptome. Für Enteroviren spezifische Krankheitsbilder sind Hand-Fuß-Mund-Krankheit, Herpangina und Pleurodynie.

Tab. 1: Mit Enteroviren bisher assoziierte Krankheitsbilder ^{1, 2, 3, 4}

Organsystem	Krankheitsbilder
ZNS	Meningitis Encephalitis Lähmungen Guillain-Barré-Syndrom
Skelett- und Herzmuskel	Myokarditis und Perikarditis Pleurodynne Myalgie
Haut- und Schleimhaut	Herpangina Hand-Fuß-Mund-Krankheit makulopapulöses Exanthem
Atemwege	Schnupfen, Erkältung Sommergrippe Krupp Bronchitis, Bronchiolitis Pneumonie Pharyngitis Otitis media
Verdauungstrakt	Gastroenteritis Hepatitis
Auge	hämorrhagische Konjunktivitis
Neugeborene	Sepsis

¹ Hahn et al., 1999; ² Modrow et al., 2003; ³ Schwarz et al., 1996,

⁴ Brandis et al., 1994

In den USA analysierte Fälle von Infektionen durch NPEV waren nach der Häufigkeit 35% Meningitis, 21% respiratorische Infektionen, 11% Encephalitis, 6% fieberhafte Erkrankungen, 4% Exanthem und 1% Erkrankungen mit Paresen (Strikas et al., 1986, Pichichero et al., 1998).

Bei der Manifestation am ZNS werden drei große Erscheinungsformen unterschieden: Meningitis, Encephalitis und schlaffe Paresen. Die häufigste dieser drei Formen ist die aseptische Meningitis.

Die NPEV-Meningitis zeigt klinisch einen biphasischen Verlauf. Neurologische Symptome sind eher selten. Höchstens 5% der Patienten zeigen bei klinischer Untersuchung Auffälligkeiten im neurologischen Status. Die Krankheitsdauer beträgt bei Kindern bei einem unkomplizierten Verlauf maximal eine Woche. Erwachsene haben eine längere Rekonvaleszenzzeit. Es gibt noch keine kontrollierten Studien über das Outcome von Erwachsenen nach NPEV-Meningitis. Bei älteren Kindern lassen Studien möglicherweise auf Lernschwierigkeiten nach Infektion schließen (Rotbart et al., 1995).

Mit dem Krankheitsbild einer aseptischen Meningitis sind häufig die ECHO-Viren 11, 9, 30, 4 und 6 sowie die Coxsackieviren B5, B2, B4 und B3 assoziiert.

Im Gegensatz zum Herpes simplex Virus kommt es bei der Enterovirus Encephalitis zu einem generalisierten Befall des Gehirns und einer damit verbundenen generalisierten neurologischen Depression.

Die Ursache für den differenten Neurotropismus bei den Serotypen können Basenänderungen in der 5'-NTR sein, die zu höherer Homologie mit Polioviren und damit höherer Virulenz führen (Rotbart et al., 1995).

Bei Enterovirus Infektionen von Neugeborenen ist die Prognose auf Grund einer Generalisierung häufig schlecht. Risikofaktoren sind Frühgeburtlichkeit, ein niedriges Geburtsgewicht, männliches Geschlecht und eine Enteroviruserkrankung der Mutter weniger als zwei Wochen vor der Geburt (Aradottir et al., 2001, Sawyer et al., 2002).

Die Enterovirus Infektionsrate von Schwangeren beträgt etwa 42%, wobei viele Infektionen asymptomatisch ablaufen (Brown et al., 1971, Rotbart et al., 1995).

In einer Studie über Coxsackievirus Infektionen wurde eine Inzidenz von 50/100000 Lebendgeborene ermittelt. Bei Herpes simplex Virus waren es 12/100000 Lebendgeborene (Kaplan et al. 1983; Sun et al., 1993).

Bei Infektionen von Neugeborenen werden in 50-70% ECHO-Viren insbesondere die Serotypen 6, 11 und 19 nachgewiesen. Der Anteil an Coxsackievirus B betrug 20-30%, der Anteil an Coxsackievirus A 5% (Gilbert et al., 1991, Daley et al., 1998). In einer niederländischen Studie machten die Enteroviren 68-71 7% der Infektionen aus (Verboon-Maciolek et al., 2002).

In den letzten Jahren wurde eine Assoziation von NPEV Infektionen mit der Manifestation eines Diabetes mellitus Typ I (IDDM) diskutiert (Hyöty et al., 1998, Sadeharju et al., 2003).

Insgesamt scheint die Enterovirus Infektionsrate bei Kindern, die später einen Typ I Diabetes entwickeln, höher zu sein (Hyöty et al., 1995).

Desweiteren geht man von einer genetischen Disposition aus, da eine Assoziation von IDDM mit den HLA-Typen DR und DQ gezeigt werden konnte (Nepom et al., 1998, Djoulah et al., 1999).

In Mäusen mit diabetogener genetischer Disposition konnte durch eine Coxsackievirus B4 Infektion eine Induktion von Autoantikörpern gegen β -Zell-Antigene ausgelöst werden (Hyöty et al., 1995).

Einige Coxsackievirus B4 Varianten sind in der Lage direkt β -Zellen zu zerstören (Chehadeh et al., 2000). Durch die Zelllyse werden Antigene den autoreaktiven T-Zellen zugänglich und eine Induktion von Autoantikörpern möglich (Horwitz et al., 2002).

Weiterhin wurde eine Kreuzreaktivität zwischen Enterovirusantigenen (2C-Protein) und β -Zell-Antigenen (Glutaminsäuredecarboxylase) gefunden (Lonnrot et al., 1996, Vreugdenhil et al., 1998).

Vermutlich liegt eine Kombination der verschiedenen Pathomechanismen vor, bei der Enteroviren eine Triggerfunktion zukommen könnte.

Therapeutisch stand bislang die supportive Behandlung im Vordergrund.

Da die Elimination von Enteroviren durch Antikörper erfolgt, wurden Immunglobuline prophylaktisch und therapeutisch appliziert. Bei Neugeborenen wurde durch Immunglobulingabe eine Reduktion des Virustiters erreicht (Abzug et al., 1993).

Für Patienten mit Antikörpermangel konnte gezeigt werden, dass bei Behandlung mit Immunglobulinen weniger chronische Verläufe auftraten (Webster et al., 1993).

1996 wurde eine Substanz, Pleconaril, ein Oxadiazol, entwickelt, die spezifisch gegen Enteroviren wirkt (Abb. 6).

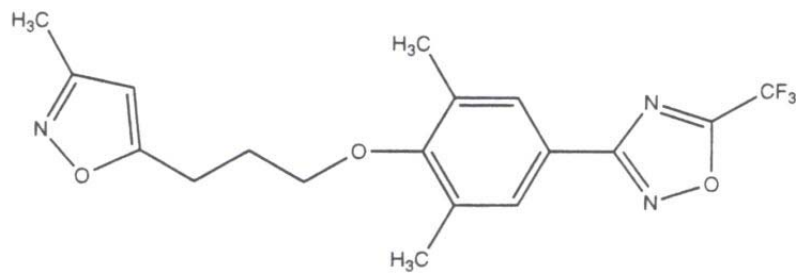


Abb. 6: Strukturformel Pleconaril (Pevear et al., 1999)

Die völlige Strukturaufklärung durch Computerkristallographie hatte ein Drug-Design ermöglicht. Pleconaril bindet in der hydrophoben Tascheder Canyon-Region des Enteroviruskapsids und verhindert die Virusreplikation durch Hemmung des Virusattachment an den Wirtszellrezeptor sowie Blockade des Uncoating.

Pleconaril besitzt eine hohe orale Bioverfügbarkeit und ist gut ZNS-gängig (Rotbart et al., 2002).

Im Maus-Modell konnte eine Reduktion des Virustiters in allen häufig infizierten Organen nachgewiesen werden (Pevear et al., 1999).

Schiff et al. 1996 konnten in einer Studie an 33 mit Coxsackievirus A21 infizierten Freiwilligen eine signifikante Reduktion der Infektionssymptome belegen.

Bei Kindern mit durch Enteroviren bedingter Meningitis fanden Sawyer et al. 1999 eine Reduktion der Kopfschmerzdauer. Bereits 24 Stunden nach Therapiebeginn war eine Verbesserung zu verzeichnen.

Bei Erwachsenen mit Enterovirus Meningitis wurde eine Verkürzung der Krankheitsdauer um 48 Stunden beobachtet (Shafran et al., 1999).

Patienten mit chronischer Enterovirus Encephalitis bei Antikörpermangelsyndrom zeigten ein verbessertes Outcome, ebenso Neugeborene mit Sepsis (Rotbart et al., 2001, Aradottir et al., 2001).

Geringe Nebeneffekte wie Übelkeit und Anstieg des Serumcholesterols sind bei Pleconarilbehandlung beobachtet worden (Hayden et al., 2002).

Experimentell konnten resistente Virusmutanten bei Coxsackievirus B3 entwickelt werden (Groarke und Pevear, 1999). Bisher wurden keine resistenten Stämme bei Versagen der Therapie nachgewiesen (Rotbart et al., 2002).

Weitere klinische Studien laufen (Hayden et al., 2002).

2. Zielstellung

Die Entwicklung molekularer Analysetechniken hat die Virusdiagnostik revolutioniert. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine schnelle und zuverlässige Möglichkeit zur Virusdiagnostik aus einer Vielzahl von Materialien.

Der Vorteil der PCR ist der geringe Materialbedarf bei hoher Sensitivität und Spezifität. Im Gegensatz dazu geben serologische Marker häufig erst Hinweise, wenn die akute Symptomatik abgeklungen ist.

Der schnelle Nachweis einer Enterovirusinfektion mittels PCR hilft auf Grund der guten Prognose die Dauer des Krankenhausaufenthaltes zu verkürzen und unnötige Antibiotikatherapie zu reduzieren bzw. ganz zu vermeiden. Darüberhinaus wird die Notwendigkeit einer Enterovirus Diagnostik insbesondere bei Neugeborenen und Immunsupprimierten durch die neue therapeutische Option mit Oxadiazolen deutlich.

Zielstellung der Arbeit war es, Informationen über die Prävalenz von Enterovirus Infektionen im Patientengut des Klinikums zu erhalten und damit über ihre Bedeutung als Hospitalisierungsursache.

Mittels anamnestischer, klinischer und virologischer Befunde sollten Daten über eine Assoziation der Enterovirusinfektionen mit den verschiedenen Krankheitsbildern gewonnen werden. Im Vordergrund stand die Frage des Anteils der ZNS-Infektionen.

Eine weitere Aufgabe war die Aktualisierung der epidemiologischen Datenlage hinsichtlich Altersverteilung und Saisonalität.

Darüberhinaus war eine Zielstellung die molekulare Charakterisierung zirkulierender Stämme. Für diese Aufgabe erfolgte eine partielle Sequenzierung eines variablen Bereiches der 5'-NTR.

3. Material und Methoden

3.1. Patientengut

In die Analyse wurden Materialien von 975 Patienten mit klinischen Zeichen einer möglichen Virusinfektion einbezogen. Es wurden 838 Proben von Liquor cerebrospinalis und 362 Serumproben evaluiert. Weitere untersuchte Materialien zeigt Tabelle 2. Die Proben wurden im Zeitraum vom 1. Juni 1999 bis 31. Dezember 2001 im Klinikum Greifswald und in der SANA-Klinik in Bergen entnommen.

Die Materialien wurden entweder sofort analysiert oder bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Tab. 2: Art und Anzahl des analysierten Materials

Material	Probenanzahl
Liquor cerebrospinalis	838
Serum	362
EDTA-Blut	36
Stuhl	64
Urin	23
Rachenspülwasser	11
Abstrich	8
Erbrochenes	3
Bronchoalveoläre Lavage	3
Sputum	2
Gewebeproben (Pathologie)	22

3.2. Antikörperbestimmung

Die Bestimmung der Antikörper erfolgte mittels ELISA (Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim).

Er ermöglicht den qualitativen Nachweis von Enterovirus spezifischen IgM und IgG Antikörpern und den semiquantitativen Nachweis von spezifischen IgG Antikörpern.

Auf Mikrotiterstreifen fixierte Antigene bilden mit den spezifischen Antikörpern Immunkomplexe. Überschüssige Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines mit Peroxidase gekoppelten Anti-human-IgM- bzw. IgG-Antikörpers. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe einer Tetramethylbenzidin-Lösung als Substrat wird durch das Enzym Peroxidase ein blauer Farbstoff gebildet, welcher nach Zugabe einer säurehaltigen Stopplösung (Citrat-Stopplösung) in Gelb umschlägt und dann über einen bestimmten Zeitraum stabil bleibt.

Die Auswertung erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD) der einzelnen Proben.

Beim IgG-ELISA wird im Unterschied zum IgM-ELISA die Probe jeweils in einem well beschichtet mit einem Antigengemisch virusinfizierter Zellkulturen und einem well beschichtet mit einem Antigengemisch nicht infizierter Zellkulturen analysiert. Die Extinktionsdifferenz wird mit der cut-off-Kontrolle ins Verhältnis gesetzt.

Für IgG ist eine bedingte Quantifizierung möglich. Die Konzentration wird in Virotech Einheiten (VE) angegeben. Die cut-off-Kontrolle ist mit 10 VE definiert. Die VE der Patientenserum berechnet sich wie folgt:

$$\text{folgt: } VE = \frac{\text{Differenz}(\text{Testwert} - \text{Referenzwert des Patientenserum})}{\text{Differenz}(\text{Testwert} - \text{Referenzwert der cut - off - Kontrolle})} \times 10$$

Bei jeder Bestimmung wird eine positive und negative Kontrolle mitgeführt.

3.3. Qualitativer Nachweis von Enterovirus RNA mittels RT-PCR

Für die Amplifikation von RNA-Virussequenzen sind drei Hauptschritte erforderlich. Nach der spezifischen Extraktion der RNA ist zunächst eine reverse Transkription (RT) der genomischen RNA in cDNA erforderlich. Die Umschreibung kann entweder separat mit Random Primer oder kombiniert in einem one-step-Verfahren mit spezifischen Primern simultan in der ersten PCR erfolgen. Anschließend werden die DNA-Sequenzen in einer Nested PCR (n-PCR) amplifiziert.

3.3.1. Virus-RNA-Extraktion

Für die Isolierung der viralen RNA wurde der QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) genutzt. Zur Präparation sind RNase freie Eppendorfröhrchen und Pipettenspitzen erforderlich.

Zuerst erfolgt die Zugabe der Carrier RNA zum Lysispuffer (AVL). Dieser Ansatz bleibt im Kühlschrank für 6 Monate stabil. Kristalle müssen vor Gebrauch bei 80°C aufgelöst werden. Die Waschpuffer AW 1 und AW 2 werden mit der entsprechenden Menge 96%igem Ethanol (AW1: 25 ml; AW2: 30 ml) versetzt und sind danach ca. 1 Jahr haltbar.

Zur RNA-Präparation werden 140 µl Probe mit 560 µl AVL-Puffer 15 sec auf dem Vortex gemischt. Anschließend folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min und ein kurzes Anzentrifugieren (8000 U/min). Nach der Zugabe von 560 µl Ethanol (96%) werden die

Proben erneut für 15 sec auf dem Vortex gemischt. 630 µl der Proben werden auf je eine QIAamp Säule gegeben und für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen, die Säule auf ein neues Tube gesetzt und der Rest der Probe auf die Säule aufgetragen. Nun wird erneut für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert, das Filtrat wieder verworfen und die Säule auf ein neues Tube gesetzt. Dann werden 500 µl Waschpuffer AW1 auf die Säule gegeben und 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen und die Säule auf ein neues Tube gesetzt. Im Anschluss werden 500 µl Waschpuffer AW2 auf die Säule aufgetragen und 3 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Die Säule wird auf ein neues Tube gesetzt und erneut für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert.

Die Elution erfolgt auf einem 1,5 ml RNase freien Eppendorfröhrchen durch Inkubation mit 60 µl AVE-Puffer für 1 min. Anschließend wird für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert.

Die RNA befindet sich im Eluat. Bei anschließender Transkription erfolgt die Aufbewahrung bei 4°C, für längere Zeit erfolgt die Lagerung bei -20°C.

3.3.2. Allgemeine Enterovirus spezifische nRT-PCR

Für die PCR werden zwei Oligonukleotidprimer verwendet, die sich von den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden DNA ableiten und damit deren Länge definieren. Für die Reaktion sind weiterhin die Nukleinsäurematrix, Desoxynukleotide, ein entsprechendes Puffersystem sowie die Taq-DNA-Polymerase nötig.

Die Reaktion umfasst in der Regel drei Schritte:

- Denaturierung
- Primer-Annealing
- Elongation

Diese Teilschritte werden 20 bis 40 Mal wiederholt.

Die Denaturierung erfolgt durch Inkubation der Ziel-DNA bei Temperaturen von größer 90°C. An die entstandenen DNA-Einzelstränge lagern sich im zweiten Schritt die Primer im Sinne einer komplementären Basenpaarung an. Diese Reaktion erfordert ein durch den Schmelzpunkt der jeweiligen Primer bestimmtes Temperaturoptimum. Allgemein wird eine Annealingtemperatur von 5°C unter der Schmelztemperatur gewählt. Das Temperaturoptimum liegt zwischen 55°C und 72°C. Der entstandene kurze doppelsträngige DNA-Abschnitt dient der DNA-Polymerase als Startpunkt. Danach erfolgt die Verlängerung des komplementären DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase.

Die Verwendung der thermostabilen Taq-Polymerase mit einem Temperaturoptimum bei ca. 75°C, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, ermöglicht das kurzzeitige Arbeiten in Temperaturbereichen über 90°C. Damit ist eine einmalige Zugabe des Enzyms ausreichend und Automatisierungsmöglichkeit gegeben.

Im ersten Zyklus entstehen Amplifikate mit durch die Primer definiertem 5'-Ende und durch den beliebigen Polymerisationsabbruch undefiniertem 3'-Ende. Da sich die Konzentration der Ausgangsmatrix nicht verändert, steigt die Zahl dieser DNA-Amplifikate maximal linear. Ab dem zweiten Zyklus dienen auch die Amplifikate als Matrix, so dass Produkte mit definiertem 5'-und 3'-Ende entstehen und eine exponentielle Zunahme dieser Produkte erfolgt. Geht man vom Idealfall einer Verdopplung der Ziel-DNA aus, ergibt sich eine Reaktionsausbeute von 2^n Molekülen, wobei n der Anzahl der Zyklen entspricht. Die Vervielfältigungsraten liegen bei 10^6 bis 10^9 .

Die Amplifikate lassen sich im Längenscreening mittels Gelelektrophorese im Vergleich zu einem mitgeführten Molekulargewichtsstandard nachweisen.

Bei der nested PCR (n-PCR) ist zur Erhöhung von Sensitivität und Spezifität eine zweite PCR nachgeschaltet. Dabei liegt die Bindungsstelle des zweiten Primerpaares innerhalb des Reaktionsproduktes der ersten PCR. Wird nur ein Primer verändert, handelt es sich um ein seminested Verfahren. Die Empfindlichkeit lässt sich dadurch so steigern, dass der Nachweis eines einzelnen Zielmoleküls in einem 10^{12} -bis 10^{13} -fachen Überschuss begleitender DNA möglich wird.

Für die erste PCR wurde der Qiagen One Step RT-PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet.

Die Reaktion erfolgte auf dem Cycloer Gene Amp PCR 2400 Roche Diagnostics®.

3.3.2.1. Primer-Set

Die verwendeten Primersequenzen CX3, CX10, CX8 und CX9 leiten sich von einem hochkonservierten Bereich der 5`-NTR ab (Severini et al., 1993). Tabelle 3 zeigt Sequenz und Position der verwendeten Oligonukleotide.

Tab. 3: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer und Probes

PCR	Primer	Sequenz	Position
Screening	1. PCR	5'-CGGTGGCTGCCGTTGGCGGCC-3'	354-373
		5'-ATTGTGACCCATAAGCAGCCA-3'	599-580
	2. PCR	5'-AAACACGGACACCCAAAGTA-3'	563-544
		5'-GGCCCCTGAATGCGGCTAAT-3'	451-470
Coxsackie- virus B	1. PCR	5'-CCCCGGACTGAGTATCAATA-3'	180-199
		5'-GCAGTTAGATTAGCCGCAT-3'	479-460
	2. PCR	5'-CGCATTACAGGGCCGGAGGA-3'	464-445
		5'-CGGTGGCTGCCGTTGGCGGCC-3'	354-373
Real-Time		5'-CCCCTGAATGCGGCTAATC-3'	451-469
		5'-ATTGTCACCATTAAGCAGCCA-3'	596-577
		5'-FAM-CGGAACCGACTACTTTGGTGCCGT-TAMRA-3'	532-557
Sequenzie- rung	1. PCR	5'-CGGTACCTTTGTGCCCTGT-3'	63-82
		5'-TTAGGATTAGCCGCATTCAG-3'	475-457
	2. PCR	5'-GCACCTTCTGTACCCC-3'	168-183
		5'-TCAATAGACTCTTCGGCAC-3'	433-416

3.3.2.2. Arbeitsschema

Der Ansatz der 1. PCR wird in der folgenden Reihenfolge pipettiert:

RNAse freies Wasser	4,5 µl
5 x Puffer	10 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Q-Solution	10 µl
Primer CX3 (30 pmol)	5 µl
Primer CX10 (30 pmol)	5 µl
RNAse-Inhibitor	1,5 µl
RT-PCR Enzym-Mix	2 µl
Proben-RNA	10 µl

Das Zyklusprofil umfaßt:

30 min bei 50°C	Umschreibung
15 min bei 95°C	Denaturierung der Revertase
40 sec bei 94°C	} 40 Zyklen
1 min bei 53°C	
1 min bei 72°C	
10 min bei 72°C	

Der Ansatz für die n-PCR wird wie folgt pipettiert:

Aqua dest.	29 µl
10 x Puffer	8 µl
dNTP (12,5 mM)	8 µl
Primer CX8 (30 pmol)	1 µl
Primer CX9 (30 pmol)	1 µl
Taq-Polymerase (2,5 IE)	1 µl

Das Zyklusprofil umfaßt:

5 min bei 94°C	}	30 Zyklen
40 sec bei 94°C		
1 min bei 55°C		
1 min bei 72°C		
7 min bei 72°C		
∞ bei 10°C		

Nach Amplifikation ergibt sich ein Fragment von 113 bp (Severini et al., 1993).

Die Amplifikate werden auf einem mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel (Agarose MS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) elektrophoretisch aufgetrennt.

Hierzu werden je 3 µl Probenpuffer und 10 µl Amplifikat in ein well einer 96-well-Mikrotiterplatte gegeben und vorsichtig gemischt. Die Proben werden in je eine Tasche des Gels pipettiert. Um eine Größenzuordnung zu ermöglichen wird ein Molekulargewichtsstandard bestehend aus 3 µl Probenpuffer, 8 µl Aqua dest. und 2 µl Marker VIII (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), der den Bereich von 19 bis 1114 bp umfaßt, mitgeführt. Die Laufzeit der Elektrophorese beträgt 20 min bei 150 V und 50 mA (Consort E 861). Die Detektion erfolgt mittels UV-Licht. Die Banden auf dem Gel werden fotografiert (Gel-Doc GATEWAY 2000).

3.3.3. Coxsackievirus B spezifische nRT-PCR

3.3.3.1. Primer-Set

Die verwendeten Primersequenzen CX4, CX7, CX2 und CX3 leiten sich von einem für Coxsackievirus B hochkonservierten Bereich der 5'-NTR ab (Severini et al., 1993). Sequenz und Position zeigt Tabelle 3.

3.3.3.2. Arbeitsschema

Der Ansatz der 1. PCR wird in der folgenden Reihenfolge pipettiert:

RNAse freies Wasser	4,5 µl
5 x Puffer	10 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Q-Solution	10 µl
Primer CX4 (30 pmol)	5 µl
Primer CX7 (30 pmol)	5 µl
RNAse-Inhibitor	1,5 µl
RT-PCR Enzym-Mix	2 µl
Proben-RNA	10 µl

Das Zyklusprofil umfaßt:

30 min bei 50°C	Umschreibung
15 min bei 95°C	Denaturierung der Revertase
40 sec bei 94°C	} 40 Zyklen
1 min bei 53°C	
1 min bei 72°C	
10 min bei 72°C	

Der Ansatz für die n-PCR wird wie folgt pipettiert:

Aqua dest.	29 µl
10 x Puffer	8 µl
dNTP (12,5 mM)	8 µl
Primer CX2 (30 pmol)	1 µl
Primer CX3 (30 pmol)	1 µl
Taq-Polymerase (2,5 IE)	1 µl

Das Zyklusprofil umfaßt:

5 min bei 94°C	}	30 Zyklen
40 sec bei 94°C		
1 min bei 55°C		
1 min bei 72°C		
7 min bei 72°C		
∞ bei 10°C		

Nach Amplifikation ergibt sich ein Fragment von 112 bp (Severini et al., 1993).

Die Amplifikate werden auf einem mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel (Agarose MS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) elektrophoretisch aufgetrennt.

Hierzu werden je 3 µl Probenpuffer und 10 µl Amplifikat in ein well einer 96-well-Mikrotiterplatte gegeben und vorsichtig gemischt. Die Proben werden nun in je eine Tasche des Gels pipettiert. Um eine Größenordnung zu ermöglichen wird ein Molekulargewichtsstandard bestehend aus 3 µl Probenpuffer, 8 µl Aqua dest. und 2 µl Marker VIII (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), der den Bereich von 19 bis 1114 bp umfaßt, mitgeführt. Die Laufzeit der Elektrophorese beträgt 20 min bei 150 V und 50 mA (Consort E 861).

Die Detektion erfolgt mittels UV-Licht. Die Banden auf dem Gel werden fotografiert (Gel-Doc GATEWAY 2000).

3.4. Quantitativer Nachweis von Enterovirus RNA mittels Real-time PCR

Die hier eingesetzte Version der Real-time PCR basiert auf der Markierung einer Sonde mit Fluoreszenzfarbstoffen.

Die virale RNA wird in einem ersten Schritt in eine cDNA umgeschrieben. Im zweiten Schritt erfolgt die Amplifikation mittels PCR.

Die fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonde, die sich im Bereich zwischen den Primern an die DNA-Matrize anlagert, ist am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencherfarbstoff 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) markiert. Durch die räumliche Nähe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe wird bei Anregung durch einen Argonlaser die Energie des Reporterfarbstoffes auf den Quencherfarbstoff übertragen, so dass nur der Quencherfarbstoff Licht emittiert. Während der PCR erfolgt dann die Elongation bis zur Sonde, die mit Hilfe der 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Man-Polymerase abgebaut wird. Dadurch wird die räumliche Nähe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe aufgehoben und der Reporterfarbstoff ist in der Lage Licht zu emittieren. Diese Fluoreszenz wird bei 518 nm detektiert und ist proportional zur Menge der gebildeten DNA.

3.4.1. Primer-Set

Die verwendeten Primersequenzen EV2 (forward) und EV-CSF-R (reverse) sowie die markierte probe EV3 liegen im hochkonservierten Bereich der 5'-NTR (Corless et al., 2002). Sequenz und Position zeigt Tabelle 3.

3.4.2. Arbeitsschema

Für die Umschreibung in cDNA wurde TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die Reagenzien wurden in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:

RNAse freies Wasser	2,85 µl
10 x TaqMan-RT-Puffer	1,00 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,20 µl
dNTP (10 mM)	2,00 µl
Random Hexamer (50 µM)	0,50 µl
RNAse-Inhibitor (20 U/µl)	0,20 µl
Multi-Reverse-Transcriptase (50 U/µl)	0,25 µl
Proben-RNA	1,00 µl

Dieser Ansatz wird ca. 30 sec bei 13000 U/min zentrifugiert und anschließend auf dem Cycler (Gene Amp PCR 2400 Roche Diagnostics®) inkubiert.

Das Zyklusprofil umfaßt:

- 10 min bei 25°C
- 30 min bei 48°C
- 5 min bei 95°C
- ∞ bei 10°C

Die entstandene cDNA wird in einem PCR-Ansatz auf dem iCycler (iQ Real-Time Detection System Vers. 2.3. BIO-RAD) inkubiert.

PCR Ansatz:

Taq Man Universal MM	25,0 μ l
(Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey)	
Aqua dest.	12,0 μ l
Primer EV2 (100 pmol)	1,0 μ l
Primer EV-CSF-R (100 pmol)	1,0 μ l
Primer EV3 probe (30 pmol)	1,0 μ l
cDNA	10,0 μ l

Der Ansatz wird ca. 30 sec bei 8000 U/min zentrifugiert.

Das Zyklusprofil umfaßt:

2 min bei 50°C	
10 min bei 95°C	
15 sec bei 95°C	} 50Zyklen
1 min bei 60°C	
∞ bei 10°C	

3.5. Sequenzierung

3.5.1. Amplifikation der RNA

Für die Sequenzierung wird als Basisreaktion eine nRT-PCR mit speziellen Primern aus einem variablen Bereich der 5'-NTR durchgeführt.

3.5.1.1. Primer-Set

Die Primersequenzen P2, P4, P6 und P9 und deren Position zeigt Tabelle 3 (Nairn et al., 1999).

3.5.1.2. Arbeitsschema

Der Ansatz der 1. PCR wird in der folgenden Reihenfolge pipettiert:

RNAse freies Wasser	4,5 µl
5 x Puffer	10 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Q-Solution	10 µl
Primer P2 (40 pmol)	5 µl
Primer P4 (40 pmol)	5 µl
RNAse-Inhibitor	1,5 µl
RT-PCR Enzym-Mix	2 µl
Proben-RNA	10 µl

Das Zyklusprofil umfaßt:

30 min bei 50°C		Umschreibung
15 min bei 95°C		Denaturierung der Revertase
50 sec bei 94°C	}	35 Zyklen
50 sec bei 55°C		
1 min 10 sec bei 72°C		
10 min bei 72°C		
∞ bei 10°C		

Der Ansatz für die n-PCR wird wie folgt pipettiert:

Aqua dest.	29 µl
10 x Puffer	8 µl
dNTP (12,5 mM)	8 µl
Primer P6 (40 pmol)	1 µl
Primer P 9 (40 pmol)	1 µl
Taq-Polymerase (2,5 IE)	1 µl

Das Zyklusprofil umfaßt:

1 min bei 94°C		
50 sec bei 94°C	}	25 Zyklen
50 sec bei 55°C		
1 min 10 sec bei 72°C		
10 min bei 72°C		
∞ bei 10°C		

Es entsteht ein Fragment von 265 bp (Nairn et al., 1999).

Die Amplifikate werden auf ein mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel (Agarose MS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Hierzu werden je 3 µl Probenpuffer und 10 µl Amplifikat in ein well einer 96-well-Mikrotiterplatte gegeben und vorsichtig gemischt. Die

Proben werden nun in je eine Tasche des Gels pipettiert. Um eine Größenordnung zu ermöglichen wird ein Molekulargewichtsstandard bestehend aus 3 µl Probenpuffer, 8 µl Aqua dest. und 2 µl Marker VIII (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), der den Bereich von 19 bis 1114 bp umfaßt, mitgeführt. Die Laufzeit der Elektrophorese beträgt 20 min bei 150 V und 50 mA (Consort E 861). Die Detektion erfolgt mittels UV-Licht. Die Banden auf dem Gel werden fotografiert (Gel-Doc GATEWAY 2000).

3.5.2. Reinigung der PCR Produkte

Da überschüssige dNTP und Primer die Sequenzierung stören, müssen die Amplifikate vor der Sequenzierungsreaktion gereinigt werden. Zur Reinigung wurde der Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

Die Amplifikate werden mit 50 µl Aqua dest. versetzt und in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen pipettiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 500 µl 5fach PB-Puffer. Dieser Ansatz wird auf eine Zentrifugations säule gegeben und bei 13000 U/min 60 sec zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen und 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und nochmals 60 sec bei 13000 U/min zentrifugiert. Die Säule wird auf ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen gestellt und mit 20 µl EB-Puffer versetzt, für 1 min inkubiert und für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Man erhält etwa 18 µl Eluat für die Sequenzreaktion.

Um die Sequenzreaktion zu optimieren, wird der DNA-Gehalt des Eluates semiquantitativ bestimmt. Dazu wird ein Teil des Eluates auf ein Agarosegel aufgetragen und mit einem DNA-Standard (Marker VIII, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Bereich von 19 bis 1114 bp) verglichen.

3.5.3. Sequenzreaktion

In der Sequenzreaktion erfolgt die Elongation mit fluoreszenzmarkierten Di-Desoxynucleotiden. Je Probe werden 2 Reaktionen durchgeführt, eine mit dem 5'-Primer und eine mit dem 3'-Primer.

3.5.3.1. Arbeitsschema

Für die Sequenzreaktion wird der Prism Ready Reaction Dyedexy Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Überlingen) benutzt.

Es wird folgender Mix pipettiert:

Aqua dest.	x µl
Primer P6 bzw. P9 (40 pmol)	1 µl
Prämix	4 µl
DNA-Eluat (20–500 ng)	x µl

Der Prämix enthält die fluoreszenzmarkierten Di-Desoxynucleotide. Innerhalb eines Gesamtreaktionsvolumens von 20 µl ist das Volumen des DNA-Eluates entsprechend der Nukleinsäurekonzentration in den Reaktionen jeweils individuell zu berechnen und das entsprechende Volumen Aqua dest. zu ergänzen.

Das Zyklusprofil umfaßt:

10 sec bei 96°C	} 25 Zyklen
5 sec bei 55°C	
4 min bei 60°C	

3.5.4. Ethanolfällung

Für die Ethanolfällung werden 80 µl steril filtrierte Aqua dest. zum Sequenzansatz hinzugefügt und in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt. Nach Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,6), steril filtrierte, und 250 µl 100% Ethanol, steril filtrierte, wird der Ansatz mindestens 30 sec gründlich gemixt und danach 15 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Innenrand des Röhrchens wird markiert, um das zu erhaltende Pellet nicht zu zerstören. An der Innenseite wird das Ethanol vorsichtig abpipettiert. Dann werden 300 µl 70% Ethanol (frisch angesetzt) dazugegeben und 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Die markierte Seite wird dabei wieder nach innen gestellt, um nach Zentrifugation das Ethanol wieder abpipettieren zu können. Das erhaltene Pellet wird bei 37°C ca. 1-3 Stunden getrocknet.

Zur Sequenzanalyse wird das Pellet in 25 µl Formamid gelöst.

3.5.5. Automatische Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem ABI PRISM Automatic Sequencer (Perkin-Elmer).

Die vier zur Termination führenden Nukleotide sind jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Das Gerät erfaßt gleichzeitig vier verschiedene Wellenlängen, die den Emissionswellen der Fluoreszenzfarbstoffe entsprechen. Das emittierte Licht wird an einem Beugungsgitter aufgespalten. Der Reaktionsansatz läuft in einer Spur. Das Gel wird mit einem Argonlaser beleuchtet und die Fluoreszenzstrahlung registriert. Die DNA-Sequenz ergibt sich aus der Farbe der jeweiligen Bande, die den Detektor passiert.

Die Rohdaten werden zu einem Elektropherogramm verarbeitet. Mit der enthaltenen Software wird den Signalen dann ein Nukleotid zugeordnet und eine Basenfolge erstellt. Eine manuelle Bearbeitung der Elektropherogramme dient der Kontrolle und Gültigkeit der determinierten Daten.

Die weitere Analyse erfolgt mittels des Genetic Computer Group (GCG) Software Paketes. Dendrogramme wurden mittels des Programms Clustal X erstellt. Die Sequenzen von Standardstämmen wurden von der Gen Bank Database erhalten.

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis Enterovirus spezifischer Sequenzen mittels nRT-PCR in Patientenmaterialien

Für die Analyse standen 1372 Proben von 975 hospitalisierten Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer Virusinfektion zur Verfügung. Diese wurden in einer nRT-PCR mit Primern aus einem hochkonservierten Bereich der 5'-NTR von Enteroviren untersucht. Die Nachweisgrenze der nRT-PCR ausgehend von einer infizierten Zellkultur lag bei einer Verdünnung von 10^{-9} (Abb. 7).

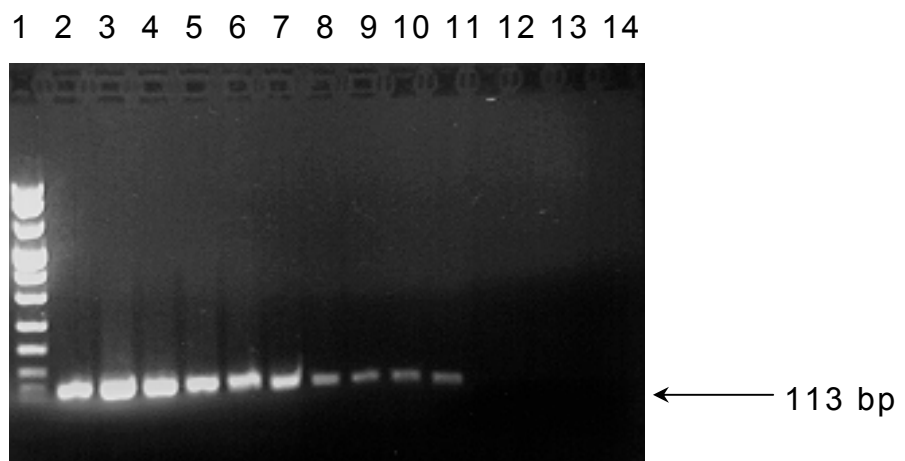


Abb. 7: Nachweisgrenze der Enterovirus nRT-PCR mit den Primern CX3/10 und CX8/9; Serienverdünnung von RNA gewonnen aus Cocksackievirus B4 infizierten Zellkulturen (1: Molekulargewichtsstandard VIII Bereich 19-1114 bp; 2: unverdünnt; 3-14: Verdünnung 10^{-1} - 10^{-12} ; 2-11: Nachweis enteroviruspezifischer PCR-Sequenzen mit der erwarteten Länge von 113 bp)

341 (24,9%) der Proben zeigten Signale von Enterovirus Sequenzen. Die positiven Proben leiten sich von 266 Patienten ab. In Abbildung 8 ist das Analyseergebnis von Patientenproben dargestellt.

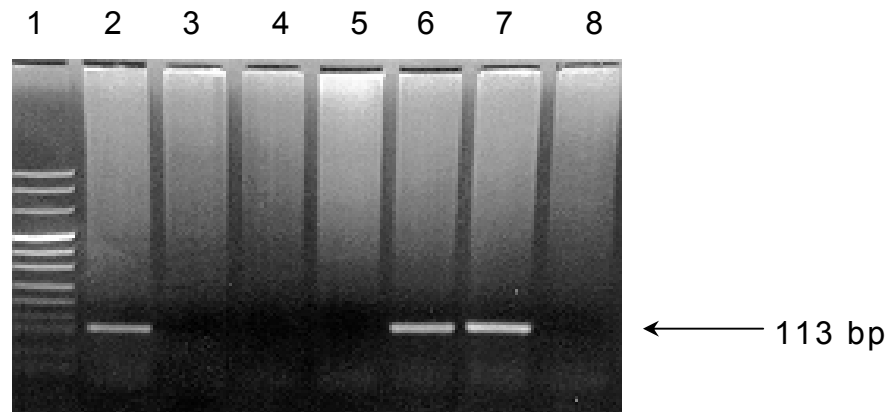


Abb. 8: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit PCR-Produkten aus Patientenmaterial (Liquor cerebrospinalis), amplifiziert mit dem Enterovirus Primerset CX3/10 und CX8/9 (1: Molekulargewichtsstandard VIII Bereich 19-1114 bp; 2: positive Kontrolle; 3: negative Kontrolle; 4-8: Patientenmaterial; 6 und 7: Enterovirus-spezifische Sequenzen der erwarteten Länge 113 bp)

Die positiven Materialien wurden auch hinsichtlich Herpes simplex Virus mittels PCR untersucht. Alle Proben waren negativ.

Eine Aufschlüsselung der analysierten Proben nach Untersuchungsmaterial zeigt Tabelle 4. Den Hauptanteil bilden Liquor cerebrospinalis und Serum mit 838 und 362 Proben. Weitere Materialien waren Stuhl, Urin, EDTA-Blut sowie Gewebeschnitte.

Der hohe Anteil der positiven Proben bei den Gewebeschnitten ist durch die Untersuchung von mehreren Organen (Hirn, Leber, Niere, Milz, Lunge und Herz) eines Patienten zu erklären.

Tab. 4: Ergebnisse der Enterovirus Screening-PCR

Material	Anzahl		%
	n	positiv	
Liquor cerebrospinalis	838	203	59,5
Serum	362	95	27,9
EDTA-Blut	36	4	1,2
Stuhl	64	18	5,3
Urin	23	5	1,5
Rachenspülwasser	11	3	0,9
Abstrich	8	2	0,6
Erbrochenes	3	0	0,0
Bronchoalveoläre Lavage	3	0	0,0
Sputum	2	1	0,3
Gewebeschnitte*	22	10	2,9
insgesamt analysierte Proben	1372	341	

*post mortem entnommen

In 94 Fällen wurde gleichzeitig Liquor und Serum zur Untersuchung eingesandt (Tab. 5). Bei 19 Proben waren beide Materialien positiv. In 17 Fällen war die Liquorprobe allein positiv. In 10 Proben waren Enterovirus Sequenzen nur im Serum nachweisbar. Beide Materialien waren in 48 Fällen negativ.

Tab. 5: Ergebnisse der Enterovirus Screening-PCR bei gleichzeitig untersuchten Liquor- und Serumproben

Serum \ Liquor	PCR		Summe	
	positiv	negativ		
PCR	positiv	19	10	29
	negativ	17	48	65
Summe	36	58	94	

4.2. Bestimmung des Anteils von Coxsackievirus B mittels Coxsackievirus B spezifischer nRT-PCR

Von 269 der 341 in der Enterovirus PCR positiv ermittelten Proben stand Material für eine PCR zur Bestimmung der Coxsackievirus B Gruppe zur Verfügung. 186 (69,1%) der Proben zeigten positive Signale für Coxsackievirus B. Abbildung 9 demonstriert Analyseergebnisse einer Coxsackievirus B spezifischen PCR von Patientenmaterial.

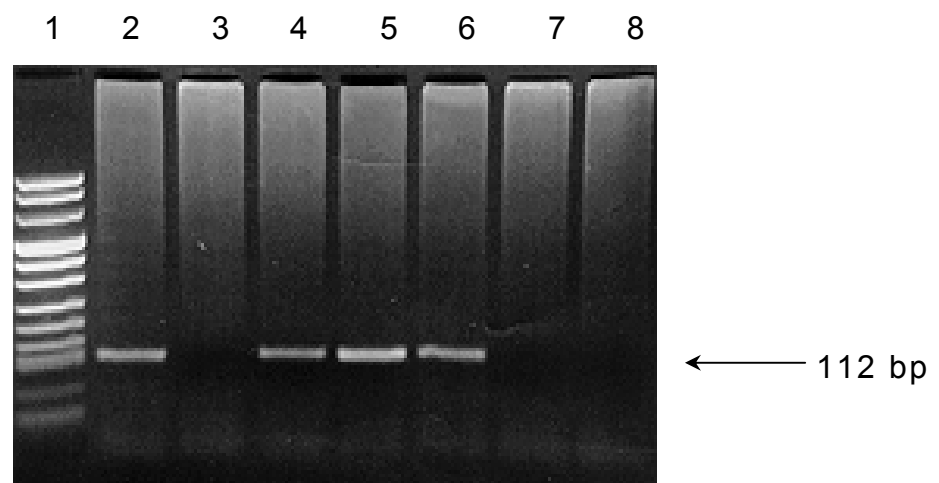


Abb. 9: Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit PCR-Produkten aus Patientenmaterial (Liquor cerebrospinalis), amplifiziert mit dem für Coxsackievirus B spezifischen Primerset CX4/7 und CX2/3 (1: Molekulargewichts-standard VIII Bereich 19-1114 bp; 2: positive Kontrolle; 3: negative Kontrolle; 4-8: Patienten-material; 4, 5, 6: Coxsackievirus B spezifische Sequenzen mit der erwarteten Länge von 112 bp)

Damit war Coxsackievirus B die dominierende Virusgruppe.

In Tabelle 6 sind die Analyseergebnisse in Assoziation mit dem Untersuchungsmaterial zusammengefaßt.

Die Gewebeschnitte stammen von nur einem Patienten.

Tab. 6: Ergebnisse der Coxsackievirus B spezifischen PCR

Material	Anzahl		%
	n	positiv	
Liquor cerebrospinalis	182	115	61,8
Serum	79	64	34,4
Stuhl	3	2	1,1
EDTA-Blut	1	1	0,5
Gewebeschnitte*	4	4	2,2
insgesamt analysierte Proben	269	186	

*post mortem entnommen

4.3. Quantifizierung der Virusmenge mittels Real-time PCR

Um eine Relation zur Virusmenge zu erhalten wurde ein Teil der Proben mittels Real-Time PCR untersucht.

Primer und Probe leiten sich aus einem hochkonservierten Bereich der 5'-NTR ab.

Zunächst wurde eine Standardkurve basierend auf einer Serienverdünnung von Coxsackievirus B3 cDNA erstellt (Abb. 10). Es bestand Linearität über einen Bereich von 26 ng bis 2,6 pg mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,995 (Abb. 11).

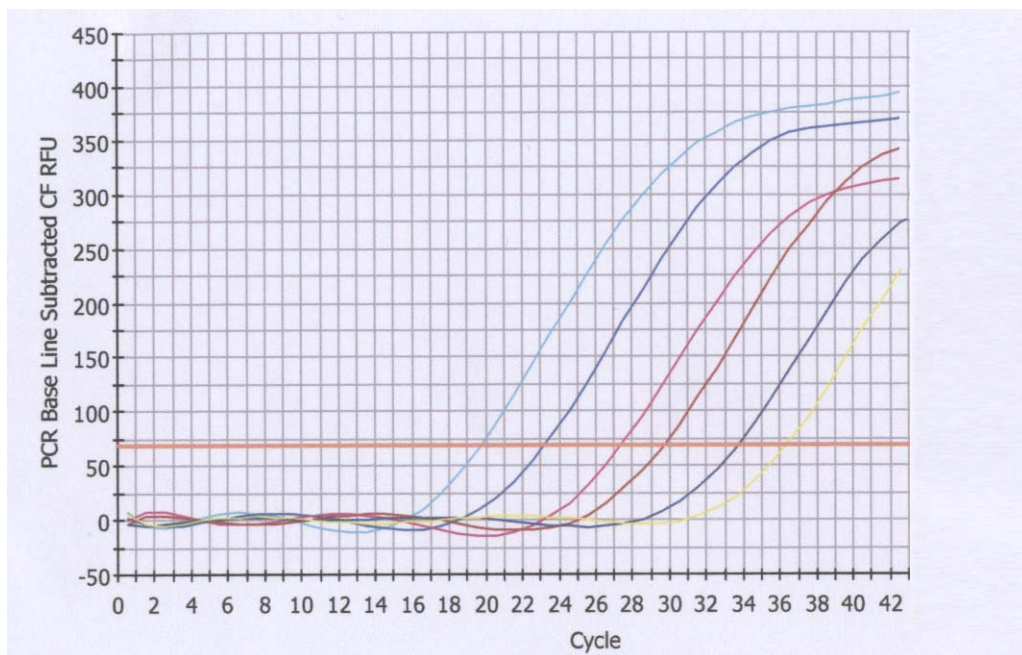


Abb. 10: Amplifikationskurven der Enterovirus Real-Time PCR, Serienverdünnung von Coxsackievirus B3 cDNA 26 ng bis 2,6 pg mit Ct-Werten von 16.6, 19.8, 24.2, 26.2, 30.0

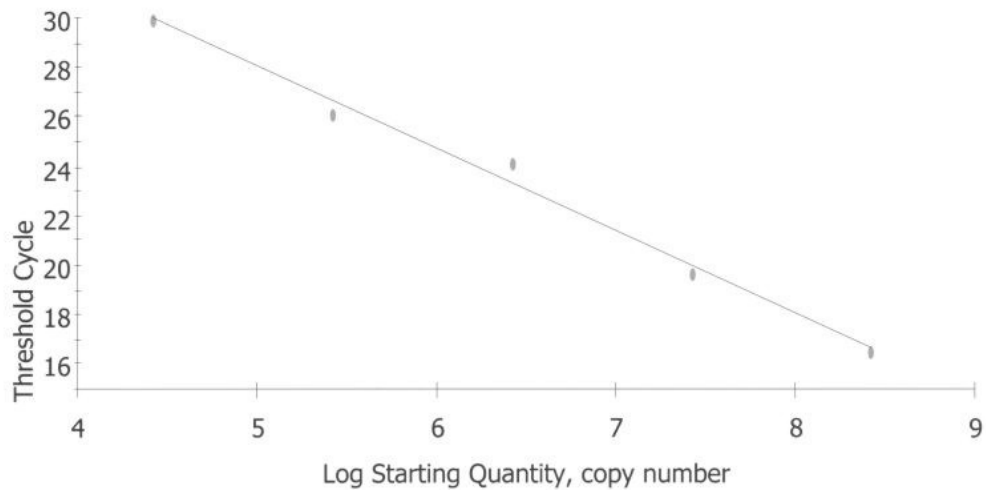


Abb. 11: Standardkurve, Korrelationskoeffizient 0,995

Amplifikationskurven von Patientenmaterialien, Serum und Stuhl, sind in den Abbildungen 12 und 13 demonstriert.

Die Virusmenge war bei den verschiedenen Proben different. Im Serum lagen die Ct-Werte zwischen 38.6 und 39.6. Bei Stuhlproben wurden Ct-Werte zwischen 25.4 und 37.7 ermittelt.

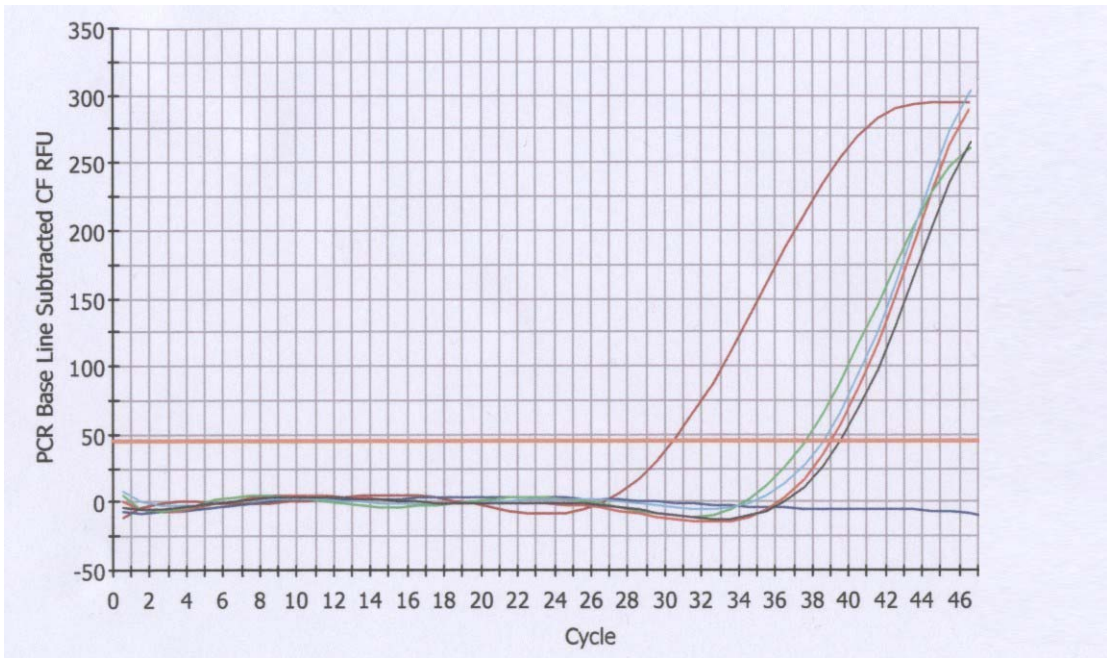


Abb. 12: Amplifikationskurven von Serumproben in der Real-time PCR

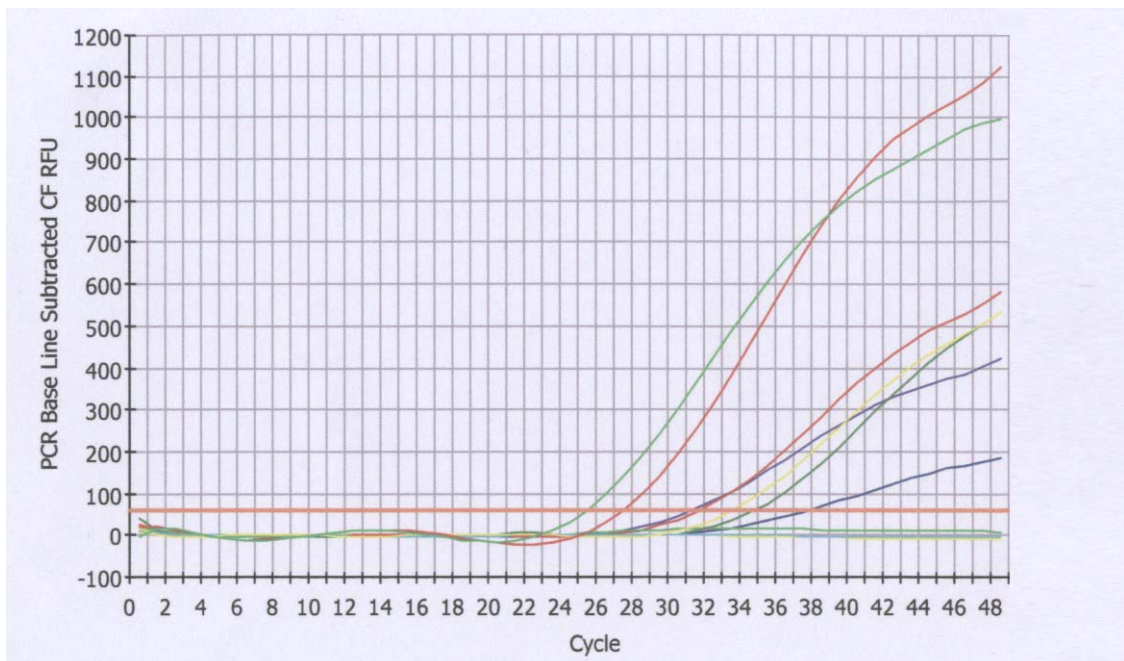


Abb. 13: Amplifikationskurven von Stuhlproben in der Real-time PCR

4.4. Bestimmung des Enterovirus Serostatus

209 Proben wurden auf Enterovirus spezifische Antikörper mittels IgM- und IgG-ELISA untersucht. Die Anzahl der evaluierten Proben entspricht einer Patientenanzahl von 193.

Ein Serostatus für eine akute Infektion mit positivem Nachweis von IgM und IgG Antikörpern wurde in 11 Fällen gefunden. Bei 4 Fällen bestand ein isolierter IgM Befund. Ein grenzwertiger IgM Befund lag in 7 Fällen vor.

Eine abgelaufene Infektion mit positivem IgG Nachweis konnte in 66 Fällen bestätigt werden. Grenzwertige IgG Titer ergaben sich für 32 Proben (Tab. 7).

Tab. 7: Spezifische Enterovirus Antikörper von 209 Serumproben

IgG \ IgM	IgM		
	positiv	grenzwertig	negativ
positiv	11	4	51
grenzwertig	2	2	28
negativ	2	1	108

Von 15 Patienten wurden Proben zum Antikörpermonitoring eingesandt (Tab. 8).

Eine Serokonversion mit positivem IgM Titer als Zeichen einer akuten Infektion zeigten die Patienten 4, 8 und 12. Patient Nummer 15 hatte bereits zum Zeitpunkt der ersten Probeentnahme einen positiven IgM Befund und reagierte im weiteren Verlauf mit einem steigenden IgG

Titer. Ein im Grenzbereich liegender IgG Wert war bei den Patienten 5 und 10 zu beobachten (Tab. 8).

Tab. 8: Monitoring des Enterovirus Antikörperstatus von 15 Patienten

Patienten Nummer	Zeitabstand der Entnahme (Tage)	Probe 1		Probe 2	
		IgM	IgG	IgM	IgG
1	7	negativ	positiv	negativ	positiv
2	22	negativ	positiv	negativ	positiv
3	13	negativ	grenzwertig	negativ	negativ
4	12	grenzwertig	grenzwertig	positiv	positiv
5	3	negativ	negativ	negativ	grenzwertig
6	13	negativ	negativ	negativ	negativ
7	5	negativ	negativ	negativ	negativ
8	4	negativ	positiv	positiv	positiv
9	2	negativ	positiv	negativ	positiv
10	6	negativ	negativ	negativ	grenzwertig
11	7	negativ	positiv	negativ	grenzwertig
12	9	negativ	negativ	positiv	negativ
13	14	negativ	positiv	negativ	positiv
14	11	negativ	negativ	negativ	negativ
15	7	positiv	grenzwertig	positiv	positiv

4.5. Alters- und Geschlechtsverteilung von Patienten mit einer Enterovirus Infektion

Das Alter der Patienten mit einer Enterovirus Infektion lag zwischen einem Tag und 87 Jahren (Abb. 14). Das Durchschnittsalter betrug 29 Jahre.

Kinder im Alter bis 12 Jahre bilden mit 39,2% den Hauptanteil der Patienten. In dieser Gruppe überwiegen Kinder bis 5 Jahre mit 63,5%.

Als nächste Gruppe folgen die 21 bis 40 jährigen mit 21,1%. Die 41 bis 60 jährigen haben einen Anteil von 18,0%, die 13 bis 20 jährigen von 11,3% und die über 60 jährigen von 10,5%.

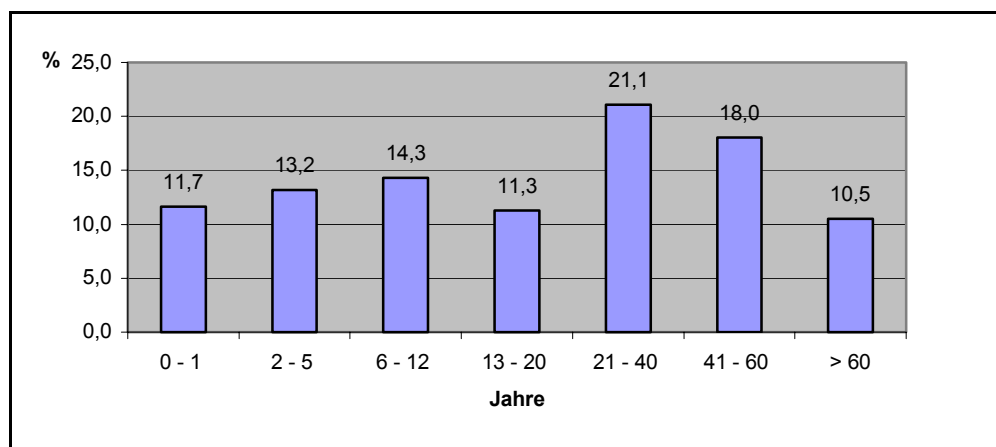


Abb. 14: Altersverteilung von Patienten mit einer Enterovirus Infektion

Bei den analysierten Patienten waren 136 (51,1%) dem männlichen Geschlecht und 130 (48,9%) dem weiblichen Geschlecht zuzuordnen (Abb. 15).

In den Altersgruppen 0 bis 1 Jahr, 2 bis 5 Jahre, 6 bis 12 Jahre sowie 21 bis 40 Jahre zeigt sich eine leicht erhöhte Zahl männlicher

Patienten. Bei den 41 bis 60 jährigen und den über 60 jährigen überwiegt die Anzahl der weiblichen Patienten. In der Gruppe der 13 bis 20 jährigen besteht ein ausgeglichenes Verhältnis.

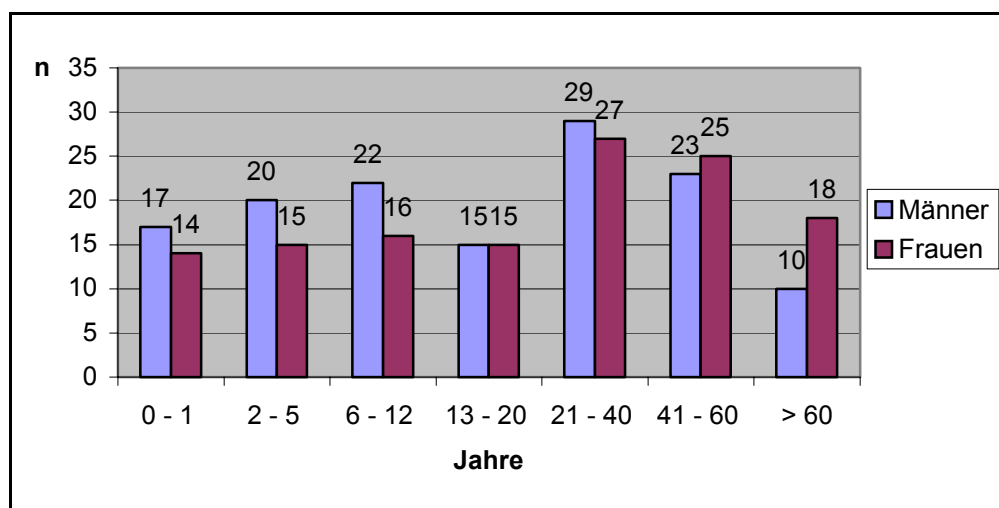


Abb. 15: Geschlechtsverteilung der Patienten mit einer Enterovirus Infektion

4.6. Saisonale Verteilung der Hospitalisierung auf Grund von Infektionen mit Enterovirus Ätiologie

Die saisonale Verteilung im Zeitraum von Juni 1999 bis Dezember 2001 ist in Abbildung 16 dargestellt.

Sie zeigt, dass außer im November 1999 und im Januar/Februar 2000 kontinuierlich Hospitalisierungen auf Grund von Infektionen mit Enteroviren erfolgten.

Peaks wurden 1999 und 2000 im September mit 14 und 10 Fällen beobachtet.

2001 war neben dem September mit 27 Erkrankungsfällen ein Peak im Juni mit 33 Fällen.

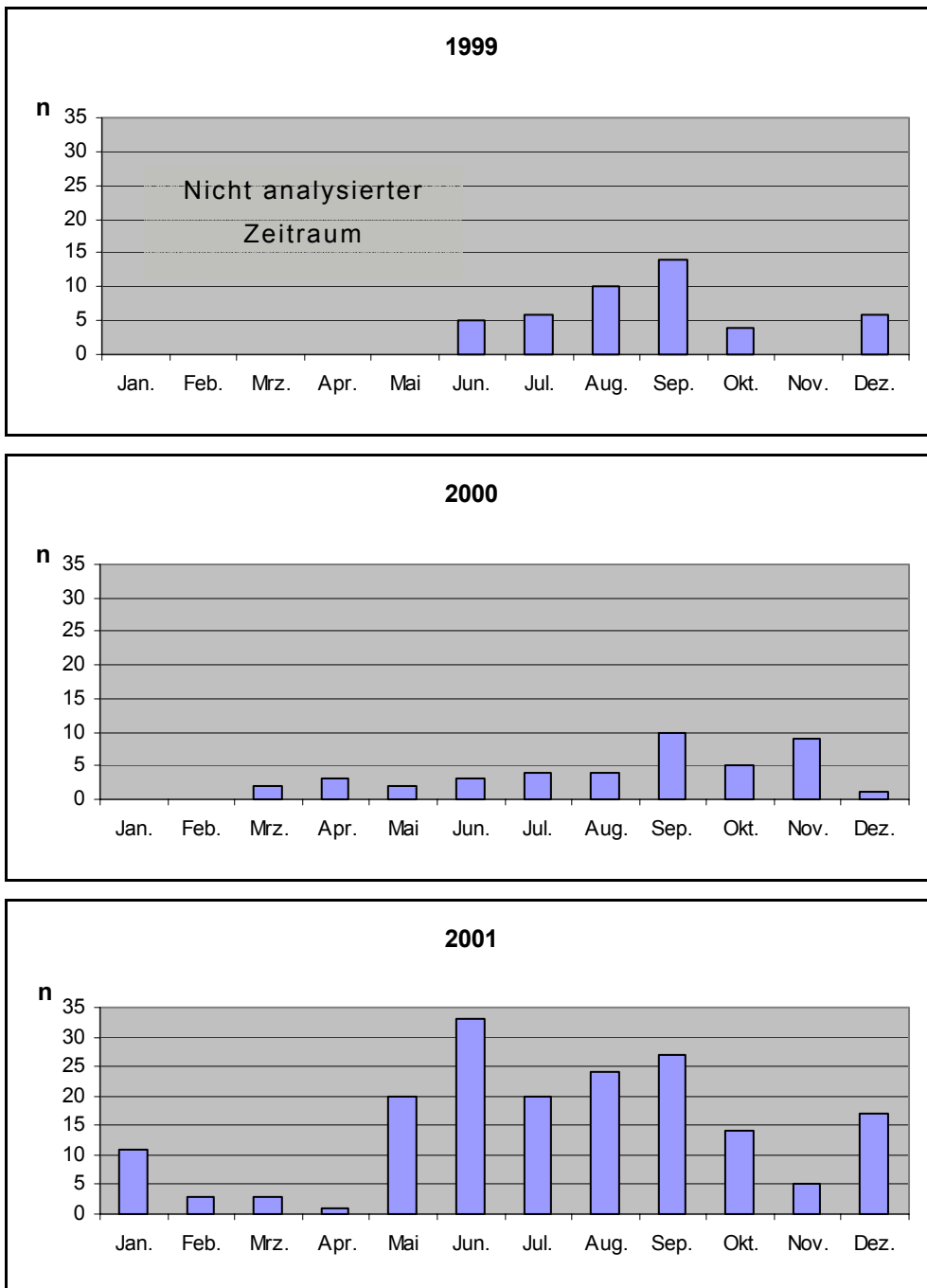


Abb. 16: Monatsverteilung der Enterovirus Infektionen im analysierten Zeitraum von Juni 1999 bis Dezember 2001

4.7. Assoziation der Enterovirusinfektionen mit klinischer Symptomatik

Die Verteilung der Patienten mit der Virusdiagnose Enterovirus Infektion auf die einsendenden Klinikbereiche ist in Abbildung 18 dargestellt. 94% der Einsendungen waren aus dem Universitätsklinikum. 6% der Materialien waren aus der SANA-Klinik Bergen Insel Rügen.

Die Mehrzahl der Einsendungen des Klinikums, 43%, war aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin. 27% waren der Klinik für Neurologie, 15% dem Zentrum für Innere Medizin und 6% der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Krankheiten, Kopf- und Hals-Chirurgie zuzuordnen.

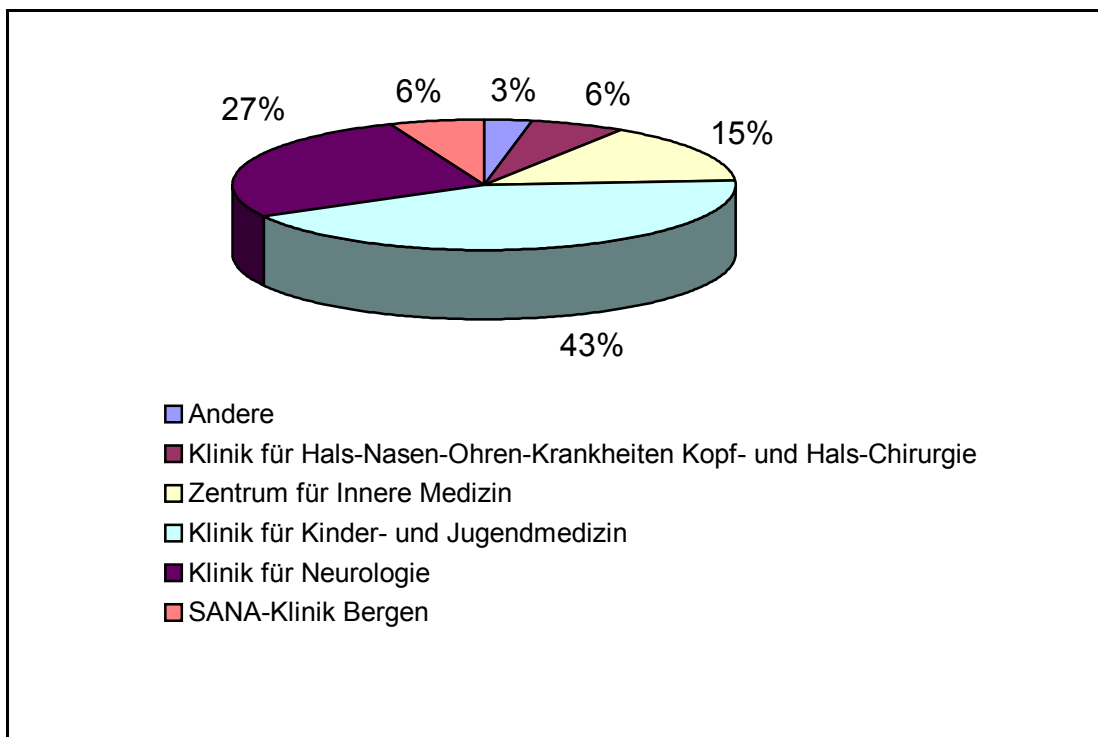


Abb. 17: Aufteilung der Enterovirus Infektionen auf einsendende Institutionen

Von 211 der Patienten, für die die virologische Diagnose Enterovirus Infektion gestellt werden konnte, waren klinische Arbeitsdiagnosen verfügbar (Tab. 9).

131 (62,1%) Patienten wurden wegen einer ZNS-Symptomatik hospitalisiert. Die Arbeitsdiagnosen waren Encephalitis, Meningitis, Verdacht auf Multiple Sklerose, Paresen, Myelitis, Kopfschmerz und Verdacht auf Guillain-Barré-Syndrom.

Bei 75 der 91 Patienten mit Zeichen einer Encephalitis/Meningitis konnten weitere Details aus dem Archiv des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin entnommen werden. Die Analyse zeigte, dass die Krankheitsbilder gehäuft mit respiratorischen oder gastroenteritischen Symptomen assoziiert waren. In 7 Fällen wurde eine Herpangina diagnostiziert. Desweiteren fand sich häufig die Angabe einer Otitis media und Entzündungen der Nasennebenhöhlen.

Bei den 7 Patienten mit der Angabe Parese wurden schlaffe und spastische Paresen beobachtet. In drei Fällen bestand eine Hemiparese, in drei Fällen Hirnnervenausfälle und in einem Fall eine Parese beider Beine mit Blasenentleerungsstörung. Alle paretischen Kasuistiken waren Coxsackievirus B Infektionen.

34 (16,1%) Patienten zeigten Atemwegserkrankungen, Gastroenteritis und Fieber unklarer Genese.

Das Spektrum der Atemwegsinfektionen reichte von Stomatitis und Angina bis zur Pneumonie. Im Rahmen der gastroenteritischen Symptomatik war bei drei Patienten eine Leberbeteiligung vorhanden. In einem dieser Fälle wurde eine chronische Hepatitis unklarer Genese diagnostiziert. In allen Fällen, in denen eine Leberbeteiligung vorlag, ergab die Subdifferenzierung eine Coxsackievirus B Infektion.

Tab. 9: Patienten mit virologischer Diagnose Enterovirus Infektion und mitgeteilten Arbeitsdiagnosen (n=211)

Arbeitsdiagnose	RT-PCR positiv	
	Enterovirus spezifisch	Coxsackievirus B spezifisch
ZNS-Erkrankungen		
Infektion des ZNS	16	10
Encephalitis	50	28
Meningitis	41	23
Verdacht auf Multiple Sclerose	9	5
Paresen	7	7
Myelitis	3	2
Kopfschmerz	3	2
Verdacht auf Guillain-Barré-Syndrom	2	2
Gesamt	131	79
Atemwege und Gastrointestinaltrakt		
Fieber unklarer Genese	14	8
Atemwegsinfektion	12	6
Gastroenteritis	8	5
Gesamt	34	19
Seltene Krankheitsbilder		
Sepsis	8	6
Schwindel unklarer Genese	6	3
Präeklampsie/HELLP-Syndrom	3	3
Koma unklarer Genese	2	2
Andere	27	20

Gesamt	46	34
--------	----	----

Von 14 Patienten mit der Angabe Fieber unklarer Genese waren 7 Patienten mit Zustand nach Knochenmarkstransplantation. Bei 3 dieser Patienten ergab die Subdifferenzierung eine Coxsackievirus B Infektion.

Unter 8 Patienten mit dem klinischen Bild einer Sepsis befanden sich 4 Kinder im Alter unter 2 Wochen. In zwei Fällen handelte es sich um Frühgeborene in der 28. SSW bzw. in der 29. SSW. Die anderen beiden Kinder waren reife Neugeborene.

Eines der Frühgeborenen zeigte einen nicht-hämolytischen Hydrops bei Geburt und verstarb wenige Tage nach Geburt durch intraventrikuläre Blutung und Ateminsuffizienz. In den Gewebeschnitten von Hirn, Leber, Niere, Milz, Lunge und Herz wurde Enterovirus RNA nachgewiesen. Die Subdifferenzierung ergab Coxsackievirus B.

Bei den beiden reifgeborenen Kindern mit septischem Krankheitsbild wurde eine Coxsackievirus B Infektion bestimmt.

Bei den anderen 4 Patienten mit dem Bild einer Sepsis handelt es sich um Erwachsene. 3 Patienten befanden sich in der Altersgruppe der 41 bis 60 jährigen und 1 Patient war über 60 Jahre alt.

Bei 3 der erwachsenen Patienten wurde eine Coxsackievirus B Infektion nachgewiesen und bei einem ein Leberversagen diagnostiziert.

Bei den Einsendungen aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Krankheiten Kopf- und Hals-Chirurgie war die häufigste Angabe Schwindel unklarer Genese. In einem Fall mit Hörsturz wurde virologisch eine Coxsackievirus B Infektion bestimmt. Ein Patient mit Tinnitus zeigte in der virologischen Diagnostik eine Enterovirus Infektion. Beide Fälle sind in Tabelle 9 in der Gruppe Andere aufgeführt.

Bei 2 Patienten mit Koma unklarer Genese wurde die virologische Diagnose einer Coxsackievirus B Infektion gestellt. Die Patienten waren 58 und 76 Jahre alt.

Bei 3 Patienten mit Verdacht auf HELLP-Syndrom bzw. Präeklampsie wurde eine Coxsackievirus B Infektion bestimmt.

In der Gruppe Andere befinden sich 2 Patienten mit einer für Enteroviren typischen Symptomatik. Bei einem Patient bestand Hand-Fuß-Mund-Krankheit und bei einem Patient Pleurodynie. Bei beiden Patienten wurde virologisch eine Coxsackievirus B Infektion diagnostiziert.

4.8. Genotypische Charakterisierung der zirkulierenden Enteroviren

Um Informationen über die am Infektionsgeschehen beteiligten Serotypen zu erhalten, wurde bei Materialverfügbarkeit an ausgewählten Proben eine direkte Sequenzierung zur Charakterisierung mit anschließendem multiplen alignment der Amplikons mit den publizierten humanen Enterovirus Sequenzen durchgeführt.

Für die Analyse standen 59 Materialien von 59 Patienten zur Verfügung.

Ein PCR-Ergebnis von ausgewählten Patienten in der nRT-PCR mit Sequenzierungsprimer zur Gewinnung von DNA zur Sequenzierung zeigt Abbildung 18. Es ist eine klare Bande der erwarteten Größe von 256 bp erkennbar.

Ein Elektropherogramm der Patientenprobe 3 ist in Abbildung 19 demonstriert.

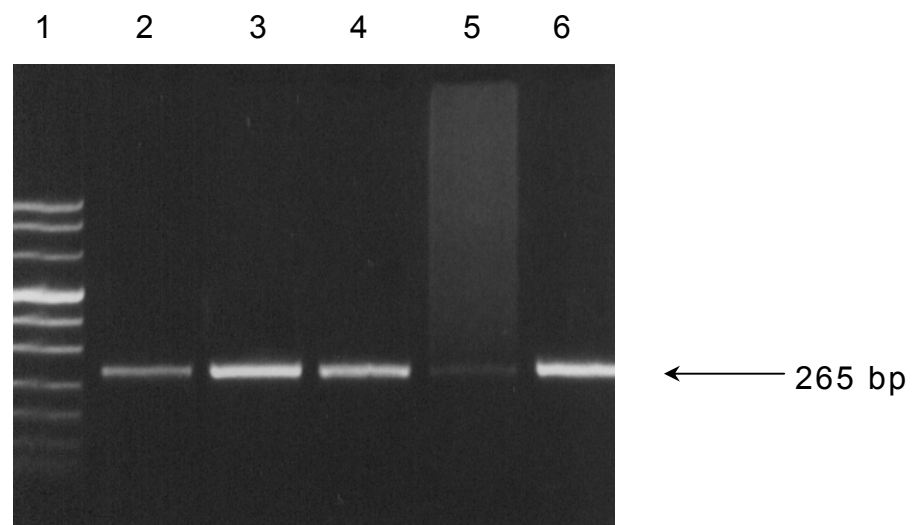


Abb. 18: Enteroviruspezifische nRT-PCR unter Verwendung der Sequenzierungsprimer P2/4 und P6/9 von Proben (1: Molekulargewichtsstandard VIII Bereich 19-1114 bp; 2,3,4,5,6: Patientenproben mit der erwarteten 265-bp-Bande)

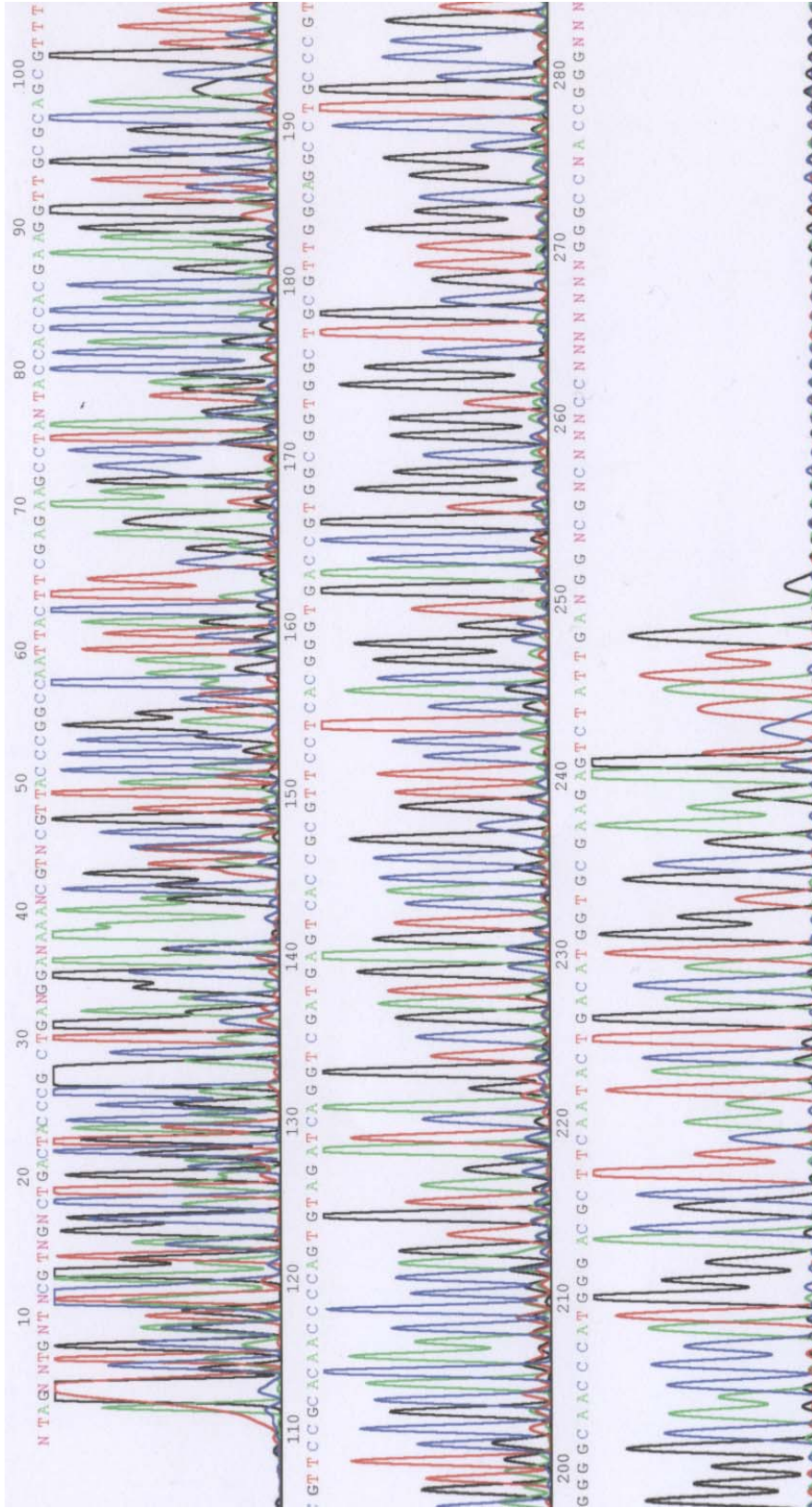


Abb. 19: Elektropherogramm der Patientenprobe 3

Von den genotypisch zu charakterisierenden 59 Proben waren 40 (67,8%) in einer Coxsackievirus B spezifischen PCR vorher als Coxsackieviren B determiniert worden. Mit der Sequenzierung der Amplikons wurde nachgewiesen, dass alle 6 Serotypen der Coxsackievirus B Gruppe in die abgelaufenen Infektionsgeschehen involviert waren.

Tabelle 10 zeigt, dass von den 40 Proben aus der Gruppe der Coxsackieviren B 45% (18) Coxsackieviren B3 waren, gefolgt von 35% Coxsackieviren B6. Die anderen Typen sind 3 bzw. 1mal identifiziert worden (Tab. 10).

Tab. 10: Serotypenzugehörigkeit der Enterovirus Isolate

Serotypen	Anzahl	%
Coxsackievirus B (CB)	40	67,8
CB1	1	2,5
CB2	1	2,5
CB3	18	45,0
CB4	3	7,5
CB5	3	7,5
CB6	14	35,0
ECHO-Virus, (EC)	19	32,2
EC5	3	15,8
EC6	12	63,2
EC9	1	5,3
EC11	2	10,5
EC17	1	5,3

Von der Gruppe der ECHO-Viren waren die Serotypen 5, 6, 9, 11 und 17 an den Infektionen beteiligt. Von insgesamt 19 ECHO-Virus Isolaten waren 63,2% (12) ECHO-Virus 6, gefolgt von ECHO-Virus 5 mit 15,8% (3) und ECHO-Virus 11 mit 10,5% (2). ECHO-Virus 9 und ECHO-Virus 17 wurden jeweils einmal bestimmt (Tab. 10).

Abbildung 20 zeigt ein Dendrogramm aller analysierten Coxsackievirus B Stämme. Die Sequenzhomologie für die Coxsackievirus B Stämme lag im Bereich von 91,1% bis 99,5% und zum Referenzstamm (M16572) zwischen 96,4% und 99,5%.

Die Coxsackievirus B6 Isolate zeigten Homologie zwischen 95,6% und 98,6%. Im Vergleich mit dem Referenzstamm (AF114384) lag die Homologie zwischen 96% und 98%.

Bei den ECHO-Viren leiten sich 6 Isolate von einem Infektionsgeschehen auf der Insel Rügen ab.

Abbildung 21 zeigt das Aminosäure alignment im Bereich der 5'-NTR. Es wurde Homologie innerhalb der Stämme zwischen 97,9% und 100% gefunden. Die maximale Differenz zum Referenzstamm (U16283) betrug 8%.

Abbildung 22 zeigt ein Dendrogramm aller analysierten ECHO-Virus Stämme.

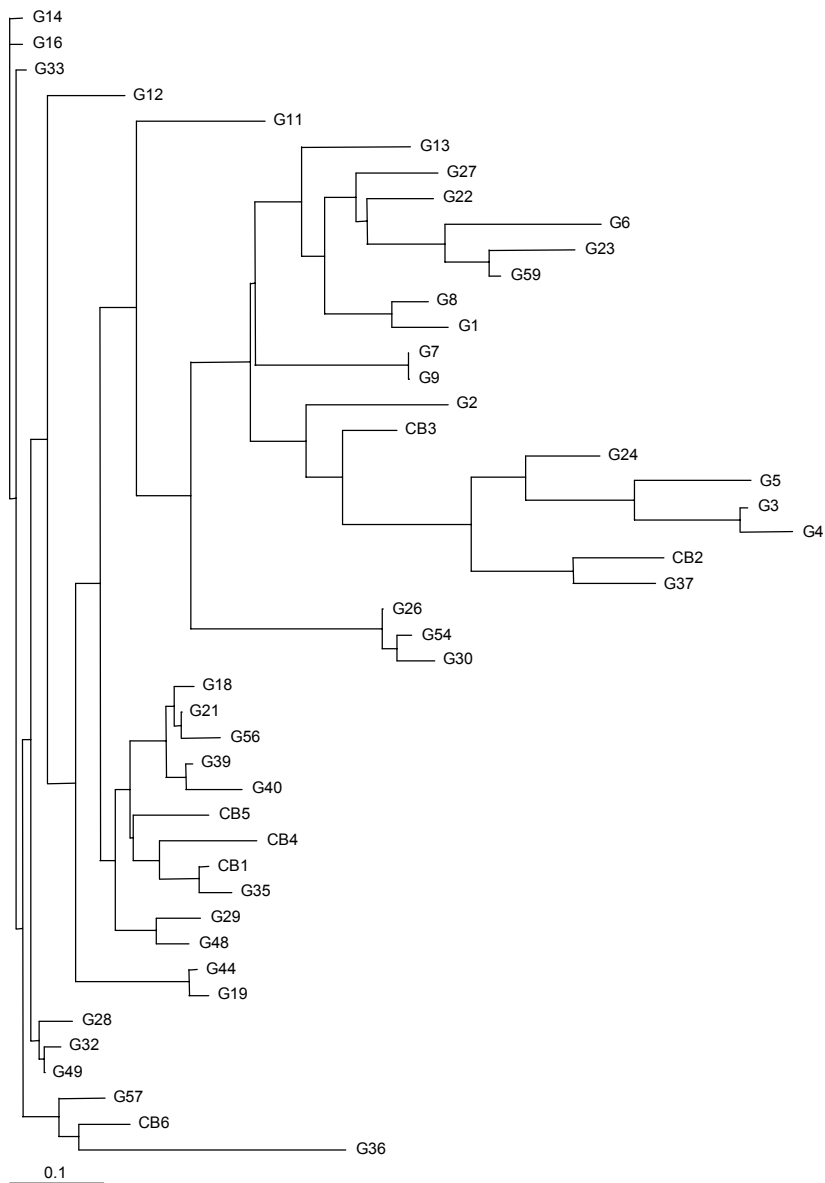


Abb. 20: Dendrogramm der Coxsackievirus B Isolate von Patienten (G) und Coxsackievirus B Prototype-Strains (CB1 Gen-Bank M16560, CB2 AF081485, CB3 M16572, CB4 D00149, CB5 X67706, CB6 AF114384)

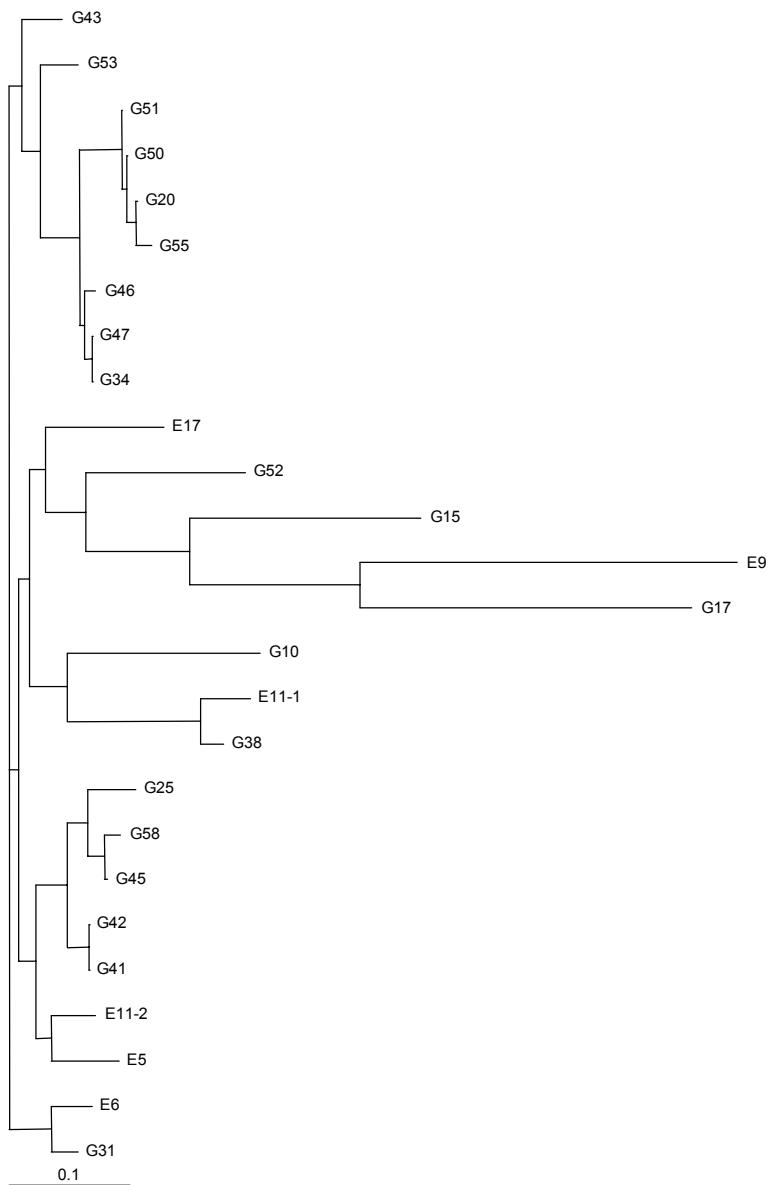


Abb. 22: Dendrogramm der ECHO-Virus Isolate von Patienten (G) und ECHO-Virus Prototype-Strains (E5 AF083069, E6 U16283, E9 X84981, E11-1 X80059, E11-2 AF447477, E17 AF 412366)

4.9. Assoziation der Serotypen mit klinischer Symptomatik

Die Assoziation der mittels Sequenzierung ermittelten Serotypen mit der klinischen Diagnose zeigt Tabelle 11.

Coxsackievirus B3 war außer bei Schwindel und Koma mit allen Krankheitsbildern assoziiert.

ECHO-Virus 6 wurde bei ZNS-Infektionen, Schwindel, Sepsis und Verdacht auf Multiple Sklerose nachgewiesen.

Bei Meningitis und Encephalitis wurden die Coxsackievirus Serotypen B3, B4, B5 und B6 sowie die ECHO-Viren 5, 6 und 11 identifiziert.

Tab. 11: Krankheitsbilder und assoziierte Serotypen

Arbeitsdiagnose	Involvierte Serotypen	
	CXB	Echo
Encephalitis	3,4,6	5,6
Meningitis	3,4,5	6,11,5
Verdacht auf Multiple sclerose	3,6	6,11,17
Paresen	3	
Atemwegsinfektionen	3,6	
Gastroenteritis	3	
Fieber unklarer Genese	3,6	
Schwindel	1,2,6	6
Sepsis	3,6	5,6
Koma	5	
Präeklampsie / HELLP-Syndrom	3	
Andere	3,6	6

Im Liquor von Patienten mit Verdacht auf Multiple Sklerose wurden Coxsackievirus B3 und B6 sowie ECHO-Virus 6, 11 und 17 nachgewiesen.

Die Sequenzierung bei einem Patienten mit schlaffer Lähmung beider Beine ergab Coxsackievirus B3.

Von den Patienten mit Atemwegsinfektionen und Gastroenteritis war nur von 3 Patienten Material zur Sequenzierung verfügbar. Es wurde Coxsackievirus B3 in zwei Fällen und Coxsackievirus B6 in einem Fall identifiziert.

In der Gruppe der Patienten mit Fieber unklarer Genese wurden die Coxsackieviren B3 und B6 gefunden.

Bei einem Patienten mit Zustand nach Knochenmarkstransplantation wurde Coxsackievirus B6 nachgewiesen. Das Monitoring gibt Tabelle 12 wieder.

Tab. 12: Monitoring der Enterovirus Infektion eines knochenmarktransplantierten Patienten

Tag	1	9	16	22	29	31	32	36	37	43
Material	S	S U	S U	S U	S U RA	F S U	L	F	S F U	S
ADV-AG						-				
CMV-IgG	+	+				+				
CMV-IgM	-	-				-				
CMV-DNA			- -	- -	- -	- -	-	-	-	- -
pp65			- -	- -	- -	-	-		-	
Entero-IgG	-		+	+	+	+				+
Entero-IgM	-		-	-	-	-				-
Entero-RNA		+		-	+	(+) +	+	+	-	-

(S: Serum; U: Urin; RA: Rachenabstrich; F: Fäzes; L: Liquor)

Die routinemäßige Kontrolle auf Zytomegalie-Virus war negativ geblieben. Auf Grund des unverändert schlechten Zustands des Patienten wurde das Virusspektrum auf Adeno- und Enteroviren am Tag 31 erweitert und danach retrospektiv und prospektiv analysiert. Es wurde Coxsackievirus B6 in Serum, Liquor, Stuhl und Urin nachgewiesen. Es bestand über einen Zeitraum von 26 Tagen Virämie.

Bei Patienten mit der Angabe Schwindel wurden Coxsackievirus B1, B2 und B6 und ECHO-Virus 6 nachgewiesen.

Bei einem Frühgeborenen konnte Coxsackievirus B3 als ätiologisches Agens einer neonatalen Sepsis bestimmt werden. Die Mutter des Frühgeborenen war wegen des Verdachts auf HELLP-Syndrom hospitalisiert. Bei ihr wurde ebenfalls Coxsackievirus B3 identifiziert.

Eine Neugeborenen-Sepsis war mit ECHO-Virus 6 assoziiert.

Bei den übrigen septischen Patienten wurde Coxsackievirus B6 und ECHO-Virus 5 bestimmt.

5. Diskussion

Enteroviren, taxonomisch zur Familie der Picornaviren gehörend, sind über viele Jahre intensiv untersucht worden. In Zellkultursystemen und Tiermodellen konnte frühzeitig gezeigt werden, dass die zelluläre DNA- und RNA-Synthese gehemmt wird, während Enterovirus RNA und virale Proteine schnell in der Zelle akkumulieren.

Der ständig steigende Kenntnisstand in Verbindung mit der seit 4 Jahrzehnten bestehenden Option zur Impfprophylaxe bei Polioviren hat dazu geführt, dass das durch die Polioviren ausgelöste Krankheitsbild, die Poliomyelitis, zurückgedrängt werden konnte und eine weltweite Eradikation bevorsteht.

Trotz dieser Erfolge sind Enteroviren weiterhin von hohem Interesse. Verbesserte diagnostische Möglichkeiten auf der Basis molekularer Techniken haben insbesondere die Prominenz von NPEV bei der Auslösung der aseptischen Meningitis gezeigt. So wurden von Stanway et al. 2000 eine Assoziation von Enteroviren mit Meningitisfällen mit einer Häufigkeit von 46% beobachtet.

In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei den Hospitalisierungen, für die als Verdachtsdiagnose eine Virusinfektion gestellt wurde, in 24,9% der Fälle eine Enterovirus Ätiologie bestand.

Die Mehrzahl der im Untersuchungszeitraum in der PCR positiven Proben war Liquor cerebrospinalis mit 203 von insgesamt 341 untersuchten Materialien. In diesem Material sind in der Regel Enteroviren nicht kolonisiert.

In allen Fällen wurde eine Herpes simplex Virus Infektion bzw. andere virale Erreger durch simultane Analyse ausgeschlossen. Der Nachweis von Enterovirus RNA spricht deshalb in diesen Fällen

mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit für eine Enterovirus bedingte ZNS-Infektion.

Im Gegensatz dazu spricht der Nachweis von Enterovirus Sequenzen ausschließlich in Stuhlproben nicht zwingend für eine akute Enterovirus Infektion (Trallero et al., 2000). Die Ausscheidung von Enteroviren im Stuhl kann bis zu 16 Wochen nach Abklingen der akuten Infektion erfolgen (Romero et al., 1999). Eine Interpretation ist dabei nur bei entsprechender Klinik bzw. Anamnese möglich.

In Rachenabstrichen können Enteroviren auch ohne klinische Manifestation bis zu 4 Wochen nach Infektion nachgewiesen werden (Nigrovic et al., 2001).

Der Nachweis in diesen Materialien ist besonders bei nicht hospitalisierten Patienten und Kindern diagnostisch hilfreich (Sawyer et al., 2002).

Es konnte durch verschiedene Autoren gezeigt werden, dass durch Analyse mehrerer Materialien die Nachweisrate von Enterovirus Infektionen erhöht werden kann (Foray et al., 1999, Nigrovic et al., 2001). Andreoletti et al. 1998 fanden einen signifikanten Anstieg von ZNS-Erkrankungen mit der Virusdiagnose Enteroviren bei Untersuchung von Serum und Liquor bei Kindern.

Ähnlich konnten wir beobachten, dass das Auftreten meningitischer Zeichen in einigen Fällen schon in der Phase der Virämie erfolgte, in der die Untersuchung von Liquor cerebrospinalis noch negativ war. Es ist deshalb sinnvoll beide Materialien zu analysieren.

Enteroviren aus der Gruppe Coxsackievirus B wurden mit 69,1% als dominierender Typ in unserer Region nachgewiesen. Mit dem von uns verwendeten Primer-Set zur Subdifferenzierung der Enteroviren in die Coxsackievirus B Gruppe können auch molekulargenetisch ähnliche

Typen wie Coxsackievirus A9 amplifiziert werden (Severini et al., 1993). Die Sequenzierung ausgewählter Proben ergab jedoch in allen Fällen einen Serotyp der Gruppe B.

In anderen Studien wurde ein Überwiegen von Infektionen durch ECHO-Virus Serotypen gefunden. Nairn et al. 1999 fanden 67% ECHO-Virus Infektionen, 14% Coxsackievirus B bedingte und 6% Coxsackievirus A bedingte Infektionen. Die Häufigkeit der einzelnen Virustypen differiert in den einzelnen Jahren und geographischen Räumen. So fanden Meqdam et al. 2002 als ätiologisches Agens von Meningitiden in Nordjordanien in 46,9% Coxsackievirus B und in 31,3% ECHO-Virus Serotypen.

Aus den Ergebnissen ist abzuleiten, dass durch Erhebung des Serostatus keine optimale Enterovirus Diagnostik möglich ist. Von den untersuchten Proben zeigten nur 7,2% das typische Bild einer akuten Enterovirus Infektion. Das belegt, dass in der Frühphase der Infektion die Diagnostik über Antikörper nicht erfolgen kann (Buxbaum et al., 2001). Da die Rekonvaleszenz nach Enterovirus Infektion in der Regel schnell erfolgt, sind Proben aus einer späteren Erkrankungsphase meist nicht verfügbar. Bei einigen von uns analysierten Fällen war durch erneute Hospitalisierung Material zugänglich, so dass eine Serokonversion gefunden werden konnte.

Enterovirus Infektionen können in jedem Alter auftreten (Romero et al., 1999). Neben den klassischen klinischen Bildern wurden nicht erwartet Krankheitsbilder ähnlich denen Neugeborener bei Patienten über 60 Jahren beobachtet.

In der Altersverteilung unserer Studie waren Kinder bis 12 Jahre mit 39,2% der Hauptanteil an hospitalisierten Patienten. Dies ist auf die hohe Einsendezahl von 43% aus der Klinik für Kinder- und

Jugendmedizin zurückzuführen. Innerhalb dieser Untersuchungsgruppe waren 29,8% Kinder unter einem Jahr, 33,7% der Kinder zwischen 2 und 5 Jahren und 36,5% zwischen 6 und 12 Jahren. Diese Verteilung zeigt den hohen Anteil jüngerer Kinder, eine Beobachtung, die auch andere Studien belegen (Böttner et al., 2002; Kirschke et al., 2002).

Jugendliche und Erwachsene bis 40 Jahre sind mit 32,4% vertreten. Während eines Ausbruches von Enterovirus bedingter Meningitis in Frankreich waren alle Patienten zwischen 18 und 41 Jahre alt (Tattevin et al., 2002). Rotbart et al. 1998 zeigten, dass Enterovirus Infektionen auch bei Erwachsenen häufig zu Hospitalisierungen führen.

Kenntnis über das Vorherrschen von bestimmten Serotypen ist epidemiologisch insbesondere zur Abklärung von Infektionsketten von großem Interesse.

Eine Studie in Spanien zeigte, dass Infektionen mit ECHO-Virus 30 in allen Altersgruppen auftraten während Infektionen mit ECHO-Virus 13 vornehmlich bei Kindern mit einem Alter von maximal 13 Jahren gefunden wurden (Trallero et al., 2003).

Druyts-Voets et al. 1997 isolierten in Belgien Coxsackievirus A und B häufiger bei Kindern zwischen 1 und 4 Jahren, während ECHO-Viren häufiger bei Kindern unter 1 Jahr gefunden wurden. Nairn et al. 1999 fanden für den Raum Glasgow, dass die Mehrzahl der Coxsackievirus Isolate bei Kindern unter 14 Jahren gefunden wurden. ECHO-Virus Infektionen wurden in allen Altersgruppen beobachtet.

In unseren Daten war keine Häufung eines Serotypes in einer bestimmten Altersgruppe erkennbar.

Das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Patienten lag insgesamt bei 1:1. In der Gruppe der bis 12 jährigen waren 56,7% männlichen Geschlechts. Böttner et al. 2002 fanden 64% männliche Patienten bei einer Studie von an Meningitis erkrankten Kindern.

Bei den 13 bis 60 jährigen fanden wir ein ausgeglichenes Verhältnis. Bei den über 60 jährigen lag das Verhältnis bei 1,8:1. Eine Ursache kann der erhöhte weibliche Anteil der älteren Bevölkerung sein.

Die Analyse der saisonalen Verteilung überrascht, da Enterovirus bedingte Hospitalisierungen in unserer Region über das ganze Jahr erfolgten. Peaks sind in den Sommermonaten und im Frühherbst zu finden. Das ganzjährige Vorkommen von Enterovirus Infektionen beobachteten auch Sawyer et al. 2002, wobei gedacht wurde, dass diese Infektionen eher selten zur Hospitalisierung führen.

Die ermittelten Daten belegen, dass 62,1% der Patienten unserer Studie auf Grund einer ZNS-Infektion hospitalisiert worden waren. Der Hauptanteil entfiel dabei mit 69,5% auf Patienten mit dem Bild einer Meningitis/Encephalitis. Mit 82,4% waren Kinder dabei am häufigsten betroffen.

Aseptische Meningitis tritt bei Kindern 5 bis 8 mal häufiger auf als bei Erwachsenen (Sawyer et al., 1999). Die Inzidenz von Enterovirus bedingten Meningitiden beträgt 4,5 bis 30 pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Parasuraman et al., 2001).

Das klinische Bild der Enterovirusmeningitis ist stark vom Alter abhängig. Neugeborene und Kleinkinder zeigen Fieber und unspezifische Zeichen. Ältere Kinder werden mit Kopfschmerzen, Fieber, Übelkeit, Erbrechen und Lichtempfindlichkeit eingewiesen (Sawyer et al., 2001).

Ähnlich anderen Studien waren Symptome der analysierten Fälle Fieber, Kopfschmerz, Übelkeit und Erbrechen. Die Temperaturen lagen meist über 39°C und waren in einigen Fällen durch Fieberkrämpfe kompliziert. Wenige Kinder boten eindeutige meningitische Zeichen in Form von Nackensteifigkeit.

Enteroviren zeigen ein interessantes Zirkulationsphänomen. Einige Serotypen treten ganzjährig mit einem geringen Infektionslevel auf, andere zeigen eher ein epidemisches Auftreten. Sporadisch kann ein vorher seltener Serotyp dominant werden (Quirk et al., 2001).

Für die Epidemie 1999 in Rumänien waren ECHO-Virus 4, 7 und 30 verantwortlich (MMWR, 2000). Über Epidemien von ECHO-Virus 30 wurde wiederholt weltweit berichtet (Wang et al., 2002, Akman et al., 2002). Bailly et al. 2002 konnten während eines Ausbruches 3 verschiedene Varianten von ECHO-Virus 30 identifizieren. Seit dem Frühjahr 2000 wurde zunehmend über durch ECHO-Virus 13 verursachte Meningitiden berichtet (Kirschke et al., 2002). Thoelen et al. 2003 fanden ebenfalls gehäuft ECHO-Virus 13 (23,8%) während eines Ausbruches. Daneben wurden auch ECHO-Virus 30 (31,2%), ECHO-Virus 6 (20,5%) und Coxsackievirus B5 (15,6) sowie einige sporadische Fälle anderer Serotypen isoliert.

Bei Meningitiden waren in unserer Analyse die Serotypen Coxsackievirus B3, B4 und B5 sowie die ECHO-Viren 6, 11 und 5 involviert.

Bei einer im Sommer 2001 aufgetretenen kleineren Epidemie von Meningitisfällen auf der Insel Rügen bei Kindern konnten wir ECHO-Virus 6 als ätiologisches Agens determinieren. Die hohen Außentemperaturen in Verbindung mit der geringen Wasserzirkulation führen zu einem längeren Überleben der Enteroviren in den

kontaminierten Boddengewässern. Der Infektionsweg fäkal-oral ist beim Baden gegeben.

Epidemien von ECHO-Virus 6 sind auch in Spanien beschrieben worden (Trallero et al., 2000).

Neurologische Komplikationen einer Meningitis wie Krämpfe, Muskelschwäche oder Koma liegen bei 9%. Neurologische Langzeitfolgen wurden bislang nicht beobachtet (Kirschke et al., 2002).

Die mit 50 Fällen hohe Anzahl an Patienten mit der Verdachtsdiagnose Encephalitis in unserer Studie ist auf die Schwierigkeit der klinischen Differenzierung zwischen Meningitis und Encephalitis bei Aufnahme zurückzuführen.

Die involvierten Serotypen sind ähnlich denen bei Meningitis Coxsackievirus B3, B4 und B6 sowie die ECHO-Viren 5 und 6.

In einem Fall war im Rahmen der Encephalitis ein psychotisches Syndrom aufgetreten. Als ätiologisches Agens wurde Coxsackievirus B6 identifiziert. Die Behandlung mit Pleconaril führte zur Rekonvaleszenz (Stenger et al., 2001). Mit diesem Präparat haben Rotbart et al. 2001 bei 12 von 16 Patienten mit chronischer Enterovirus Meningoencephalitis eine klinische Response erreicht und plädieren für eine Gabe von Pleconaril bei lebensbedrohlichen Infektionen.

Über die Assoziation von Encephalitis mit Coxsackievirus B4 und B5 sowie ECHO-Virus 7 ist von Lum et al. 2002, Moschovi et al. 2002 und Cree et al. 2003 aktuell berichtet worden. Insgesamt sind Enterovirus bedingte Encephalitisfälle weniger verbreitet. Anders als bei Enterovirusmeningitis sind hier Langzeitfolgeschäden möglich (Rotbart et al., 2002).

In einzelnen Kasuistiken in unserer Studie war die Virusdiagnose Enterovirus mit einer akuten Parese assoziiert.

Ein Kind mit einer schlaffen Lähmung beider Beine sowie Blasenentleerungsstörung erhielt Pleconaril und zeigte darunter eine deutliche Besserung mit rückläufiger Symptomatik. Coxsackievirus B3 konnte im Liquor nachgewiesen werden (Utzig et al., 2002).

Eine indische Studie zur Häufigkeit und Ätiologie von polioähnlichen schlaffen Paresen bei Kindern ergab, dass in ca. 50% der Erkrankungen NPEV isoliert wurden. Zu den häufig identifizierten Serotypen gehörten ECHO-Virus 6, 11 und 9 sowie Coxsackieviren B (Kapoor et al., 2001). Eine Kasuistik aus Neuseeland berichtet über eine durch ECHO-Virus 33 verursachte schlaffe Armlähmung eines 3-jährigen Jungen im Rahmen eines Ausbruches von ECHO-Virus 33 (Grimwood et al., 2003).

Unsere Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, dass durch die molekulare Diagnostik auch schwer abklärbare Infektionen als Enterovirus bedingt erkannt werden können.

Von besonderem Interesse war die Identifizierung von Coxsackievirus B6 als Ursache von Fieber unklarer Genese bei Patienten nach Knochenmarkstransplantation. Enterovirus-Infektionen bei Patienten mit Abwehrschwäche werden auch von Moschovi et al. 2002 und Rotbart et al. 2002 beschrieben.

Bei Neugeborenen können Enteroviren besonders in den ersten Lebenswochen septische Infektionen hervorrufen.

Wir fanden das klinische Bild einer Sepsis bei 4 Kindern im Alter unter 2 Wochen.

Eines der Kinder zeigte einen nicht-hämolytischen Hydrops bei Geburt in der 28. SSW und verstarb wenige Tage danach an

intraventrikulärer Blutung und Ateminsuffizienz. In Material von Hirn, Leber, Niere, Milz, Lunge und Herz wurden Enterovirus spezifische Sequenzen nachgewiesen (Pusch et al., 2002). Da bei der Mutter wenige Tage vor der Geburt des Kindes ein grippaler Infekt bekannt war, ist von einer konnatalen Enterovirus Infektion auszugehen.

Bei einem weiteren Kind konnte durch das Vorliegen von Material der Mutter, die sich wegen Verdacht auf HELLP-Syndrom bei unklarem Fieber in stationärer Behandlung befand, sowohl bei der Mutter als auch beim Kind Coxsackievirus B RNA nachgewiesen werden.

Die Möglichkeit einer transplazentaren Enterovirusinfektion wird seit mehreren Jahren diskutiert (Abzug et al., 1993, Takami et al., 2000).

Eine Assoziation von Myokarditiden und Coxsackieviren B insbesondere B3 wird seit längerem angenommen. Neuere Daten wurden mittels molekularer Techniken erhalten.

Neugeborene und Kinder unter 6 Monaten sind besonders anfällig gegenüber Enterovirusmyokarditis. Die meisten Fälle treten aber bei Erwachsenen zwischen 20 und 39 Jahren auf (Rotbart et al., 2002).

Das Neugeborene einer Mutter mit Verdacht auf Präeklampsie bot kardiale Symptome in Form von supraventrikulären Extrasystolen und Arrhythmie.

Ein weiteres Neugeborenes, bei dem keine Erkrankung der Mutter bekannt ist, zeigte ebenfalls supraventrikuläre Extrasystolen und zusätzlich eine leichte Mitralinsuffizienz.

Bei beiden Neugeborenen konnte Coxsackievirus B nachgewiesen werden.

Molekulare Techniken haben insgesamt die Virusdiagnostik revolutioniert und die Basis zur Verbesserung der Diagnostik gelegt. Die Einführung der PCR erhöht signifikant die Bestimmung von Enteroviren in Liquor cerebrospinalis im Vergleich zur traditionellen Zellkulturmethode. Nach Daten von Chonmaitree et al. 1982 werden 35% der Infektionen mit charakteristischen Zeichen einer Enterovirus Infektion durch die Zellkultur nicht erkannt. Nur 65-70% der Enterovirus Serotypen wachsen in Standardzellkulturen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die etablierte PCR mit den Primern aus einem hochkonservierten Bereich der 5'-NTR in der konventionellen Enterovirus Basisdiagnostik eine spezifische und sensitive Technik ist und zur schnelleren Abklärung der Enterovirus Ätiologie von Virusinfektionen im Vergleich zur Zellkultur führt.

Die Weiterentwicklung der PCR zu einer Real-time PCR bietet die Möglichkeit, neben dem qualitativen Nachweis auch Informationen über die viral load zu erhalten, eine wichtige Aussage für Prognose und Therapie-Monitoring.

So wurde von Mentel et al. 2003 über eine höhere Nachweisrate von Respiratory syncytial Virus mittels Real-time RT-PCR im Vergleich zur nRT-PCR berichtet. In einigen Protokollen hatte die Real-time PCR eine höhere Sensitivität als die nRT-PCR.

Im Verlauf unserer Untersuchungen bei Enteroviren hat sich gezeigt, dass in einem one-step Verfahren, Umschreibung mit spezifischen Primern, die Empfindlichkeit nicht ausreichend war. Das two-step Verfahren erwies sich als effektiver.

22 Enterovirus Serotypen, darunter Coxsackievirus A und B Serotypen, ECHO-Viren und Polioviren, konnten in der Studie von Corless et al. 2002 nachgewiesen werden.

Die ausgewählten Proben unserer Studie zeigen einen eindeutigen Nachweis von Enteroviren bei differenter viral load.

Das verwendete Sequenzierungsprotokoll mit den Primern aus einem variablen Bereich der 5'-NTR hat sich als brauchbar für die Typisierung von Enteroviren erwiesen. Es wurden sowohl Coxsackievirus B Serotypen, insbesondere Coxsackievirus B3 und B6, als auch verschiedene ECHO-Virus Serotypen, insbesondere ECHO-Virus 6, identifiziert.

Die Untersuchung von Manzara et al. 2002 stützen die Eignung dieser Region zur Differenzierung von Enteroviren. So gelang es ihnen Enterovirus Typen zu identifizieren, die zuvor mit der VP4-VP2 Typisierung nicht charakterisiert werden konnten.

Durch die Anwendung molekularer Techniken ist weiterhin die Möglichkeit gegeben, bei ätiologisch noch nicht abgeklärten Krankheitsbildern Kandidaten-Erreger durch gezielte Analyse zu ermitteln.

Neben der Assoziation von Enteroviren mit Typ I Diabetes und Myokarditis wurden weitere Krankheitsbilder hinsichtlich einer Enterovirus Genese evaluiert.

Ein bisher nicht abgeklärtes Syndrom, Hörsturz, wurde in einer Studie erstmals als Enterovirus assoziiert postuliert (Mentel et al., 2004). Die Analyse von 55 Serumproben zeigte, dass in 40% der Fälle Enterovirus RNA nachgewiesen werden konnte, während bei den Kontrollen in keinem Fall Enterovirus RNA gefunden wurde.

In den letzten Jahren hat eine weitere molekulare Technik, die Microarray Methode, Eingang in die mikrobiologische Forschung gefunden. DNA arrays bestehen aus Oligonukleotiden oder PCR

Amplicons probes, die an einer festen Phase immobilisiert sind. Bei der array Methode ist gewöhnlich das Oligonukleotid, das in der Festphase gebunden ist, die probe, während das target sich in Lösung befindet. Die Hybridisierungsergebnisse zwischen den gebundenen probes und markierten Sequenzen werden durch Laserscannen detektiert.

Potentielle Anwendungsbereiche sind die Bestimmung von Sequenzen spezifischer Viren, Validisierung der Identität der PCR-Produkte, Screening von antiviralen Drug-Resistenzmutationen, Vakzinequalitätskontrolle, Bestimmung von spezifischen Genen, die Virulenz-bzw. Pathogenität assoziiert sind.

Eine Möglichkeit zur Typisierung mit dieser Technik haben Li et al. 2001 mit einem Protokoll für die Differenzierung von Influenzavirus entwickelt. Dabei wurde eine Markierung der Amplicons mit Fluoreszenzfarbstoff (Cy3-dCTP) vorgenommen.

Laakso et al. 2004 haben ein Microarray Protokoll zur Bestimmung und Typisierung von Enteroviren vorgestellt, mit dem zur Zeit 5 Enterovirus Serotypen detektiert werden können. Es wurden virale Sequenzen der kodierenden Region von VP1 amplifiziert. Die amplifizierten Produkte werden an spezifische Oligonukleotide auf einem Microchip hybridisiert.

Ein molekulares Typisieren wäre somit zukünftig auch auf der Basis dieser molekularen Technik denkbar.

6. Zusammenfassung

Zielstellung der Arbeit war es, Informationen über die Bedeutung von Enterovirus Infektionen als Hospitalisierungsursache im Patientengut des Klinikums zu erhalten.

Desweiteren sollten Daten über eine Assoziation der Enterovirus Infektionen mit den verschiedenen Krankheitsbildern gewonnen werden und die Daten hinsichtlich Altersverteilung und Saisonalität analysiert werden.

Darüberhinaus war eine Zielstellung die molekulare Charakterisierung zirkulierender Stämme.

Die etablierte nRT-PCR zeigte sich als eine sensitive und spezifische Methode für die konventionelle Enterovirus Basisdiagnostik in verschiedenen Materialien wie Liquor cerebrospinalis, Serum, Stuhl und auch in Gewebeschnitten.

Eine Coxsackievirus B spezifische PCR mit Primern aus einem hochkonservierten Bereich der 5'-NTR erwies sich als geeignet für die Differenzierung der Gruppe Coxsackievirus B.

Mittels Real-time PCR konnte bei den Proben eine differente viral load nachgewiesen werden.

In 24,9% der Hospitalisierungen war eine Enterovirus Ätiologie zu belegen. Enteroviren sind damit ein wesentlicher Grund für Hospitalisierung in unserer Region.

Die Infektionen traten in allen Altersgruppen auf, wobei Kinder im Alter bis 12 Jahre am häufigsten betroffen waren.

Von besonderem Interesse war, dass Hospitalisierungen durch Enterovirus Infektionen ganzjährig auftraten. Peaks waren im Sommer und Frühherbst. Somit muß bei unklarer Ätiologie auch in für

Enteroviren nicht typischen Zeiten an eine Infektion durch Enteroviren gedacht werden.

Es wurde gezeigt, dass neben den klassischen ZNS-Erkrankungen und Fieber unklarer Genese auch eine Assoziation mit neonataler Sepsis, Paresen und Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten besteht.

Die von uns eingesetzte Kombination von Primern für eine Such-PCR und die Sequenzierung erwiesen sich als effektives Protokoll.

In unserer Region zirkulieren Coxsackievirus B und ECHO-Virus Serotypen. Unter den Coxsackievirus B Isolaten war der häufigste Typ Coxsackievirus B3, gefolgt von Coxsackievirus B6. Unter den ECHO-Virus Isolaten war der häufigste Typ ECHO-Virus 6.

Die schnelle Diagnose einer Enterovirus Infektion hilft unnötige Antibiotikagaben zu reduzieren bzw. zu vermeiden und den Klinikaufenthalt zu verkürzen. Im Hinblick auf die Möglichkeit der gezielten Therapie mittels Pleconaril ist die Diagnose einer Enterovirus Infektion insbesondere bei Neugeborenen und Immunsupprimierten von hoher Relevanz.

7. Quellenverzeichnis

1. Abzug M.J., Levin M.J., Rotbart H.A. :
Profile of enterovirus disease in the first two weeks of life.
Pediatr. Infect. Dis. J. 1993;12:820-4.
2. Abzug M.J.:
Prognosis for neonates with enterovirus hepatitis and
coagulopathy.
Pediatr. Infect. Dis. J. 2001;20 (8):758-63.
3. Akman S., Özkaya E., Colak D., Daloglu H.:
A hospital outbreak of aseptic meningitis due to echovirus type
30 in Antalya, Turkey.
Turk. J. Pediatr. 2002;44:237-9.
4. Andreoletti L., Blassel-Damman N., Dewilde A.:
Comparison of use of cerebrospinal fluid, serum and throat
swab specimens in diagnosis of enteroviral acuteneurological
infection by a rapid RNA detection PCR assay.
J. Clin. Microbiol. 1998;36:589-91.
5. Aradottir E., Alonso E.M.:
Severe Neonatal Enteroviral Hepatitis Treated With Pleconaril.
Pediatr. Infect. Dis. J. 2001;20 (4):457-9.
6. Archer J.S.:
Acute Liver Failure in Pregnancy.
J. Reprod. Med. 2001;46:137-40.

7. Baily J.-L., Brosson D., Archimbaud C., Chambon M., Henquell C., Peigue-Lafeuille H.:
Genetic Diversity of Echovirus 30 During a Meningitis Outbreak, Demonstrated by Direct Molecular Typing From Cerebrospinal Fluid.
J. Med. Virol. 2002;68:558-67.
8. Böttner A., Daneschnejad S., Handrick W., Schuster V., Liebert U.G., Kiess W. A:
Season of aseptic Meningitis in Germany: epidemiologic, clinical and diagnostic aspects.
Pediatr. Infect. Dis. J. 2002;21, (12):1126-32.
9. Brandis H., Köhler W., Eggers H.J., Pulverer G.:
Eggers H. J. Kapitel 45 Picornaviren. In Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie.
7ed. Gustav Fischer Verlag; ;1994.p. 811-17.
10. Brown G.E., Karunas R.S.:
Relationship of congenital anomalies and maternal infection with selected enteroviruses.
Am. J. Epidemiol. 1971;95:207-17.
11. Buxbaum S., Berger A., Preiser W., Rabenau H.F., Doerr H.W.:
Enterovirus Infections in Germany: Comparative Evaluation of Different Laboratory Diagnostic Methods.
Infection 2001;29:138-42.

12. Chehadeh W., Weill J., Vantighem M.-C., Alm G., Lefèbvre J., Wattré P., Hober D.:
Increased Level of Interferon alpha in Blood of Patients with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Relationship with Coxsackievirus B Infection.
J. Infect. Dis. 2000;181:1929-39.
13. Chonmaitree T., Menegus M.A., Powell K.R.:
The clinical relevance of CSF viral culture: A two year experience with aseptic meningitis in Rochester, New York.
JAMA 247, 1843-1847. 1982. Abstract
14. Corless C.E., Guiver M., Borrow R., Edwards-Jones V., Fox A.J., Kaczmarek E.B., Mutton K.J.:
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. 2002;67:555-62.
15. Cree B.C., Bernardini G.L., Hays A.P., Lowe G.:
A Fatal Case of Coxsackievirus B4 Meningoencephalitis.
Arch. Neurol. 2003;60:107-12.
16. Daley A.J., Isaacs D., Dwyer D.E., Gilbert G.L.:
A cluster of cases of neonatal coxsackievirus B meningitis and myocarditis.
J. Paediatr. Child Health 1998;34:196-8.

17. De-Jong A.-S., Wessels E., Dijkman H.-B., Galama J.-M., Melchers W.-J., Willems P.-H., Van-Kuppeveld F.-J.:
Determinants for membrane association and permeabilization of the coxsackievirus 2B protein and the identification of the Golgi complex as the target organelle.
J. Biol. Chem. 2003; 278 (2):1012-21.
18. Djoulah S., Busson M., Sasazuki T., Maillere B., Yasunaga S., Kimura A., Charron D., Hors J.:
A new predictive model for insulin-dependent diabetes mellitus susceptibility based on combinations of molecular HLA-DRB1 and HLA-DQB1 pockets.
Tissue Antigens 1999;54 (4):341-8.
19. Doerr H.W., Gerlich W.H.:
Neurotrope Virusinfektionen: Meningitis, Enzephalitis, Neuritis.
In Medizinische Virologie Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder.
1 ed. Georg Thieme Verlag; Stuttgart; 2002. p. 142-6.
20. Druyts-Voets E.:
Epidemiological features of entero non-poliovirus isolations in Belgium 1980-94.
Epidemiol. Infect. 1997;119:71-7.
21. Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M.:
Chapter 23 Picornaviridae: The viruses and their replication.
Chapter 24 Enteroviruses. In Fields Virology.
4ed. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia; 2001. p. 685-763.

22. Foray S., Pailloud F., Thouvenot D.:
Evaluation of combining upper respiratory tract swab samples with cerebrospinal fluid examination for the diagnosis of enteroviral meningitis in children.
J. Med. Virol. 1999;57:193-7.
23. Frisk G.:
Mechanisms of chronic enteroviral persistence in tissue.
Curr. Opin. Infect. Dis. 2001;14:251-6.
24. Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., Vakalis N., Bei T.A., Vamvakopoulos N.C.:
High sequence difference in the 5' non-coding region of reference Coxsackie B and ECHO viral strains and clinical isolates revealed by restriction fragment length polymorphism analysis.
Mol. Cell. Probes 2001;15:317-27.
25. Gilbert G.L.:
Infectious Disease in Pregnancy and the Newborn Infant.
Monographs in Clinical Pediatrics 2 Harwood, Sydney , 381-391. 1991. Abstract
26. Grimwood K., Huang Q.S., Sadleir L.G., Nix W.A., Kilpatrick D.R., Oberste M.S., Pallansch M.A.:
Acute Flaccid Paralysis from Echovirus Type 33 Infection.
J. Clin. Microbiol. 2003;41 (5):2230-2.

27. Groarke J.M., Pevear D.C.:
Attenuated Virulence of Pleconaril-Resistant Coxsackievirus B3 Variants.
J. Infect. Dis. 1999;179:1538-41.
28. Hahn H., Falke D., Kaufmann S.H.E., Ullmann U.:
Falke D. Spezielle Virologie Picorna-Viren. In Medizinische Mikrobiologie und Infektologie.
3ed. Springer Verlag;Berlin; Heidelberg; 1999. p. 531-41.
29. Halliday E., Winkelstein J., Webster A.D.B.:
Enteroviral Infections in Primary Immunodeficiency (PID): A Survey of Morbidity and Mortality.
J. Infect. 2003;46:1-8.
30. Hayden F.G., Coats T., Kim K., Hassman H.A., Blatter M.M., Zhang B., Liu S.:
Oral pleconaril treatment of picornavirus-associated viral respiratory illness in adults: efficacy and tolerability in Phase II clinical trials.
Antivir. Ther. 2002;7:53-65.
31. Heim A., Grumbach I., Hake S., Müller G., Pring-Åkerblom P., Mall G., Figulla H.-R.:
Enterovirus Heart Disease of Adults: A Persistent, Limited Organ Infection in the Presence of Neutralizing Antibodies.
J. Med. Virol. 1997;53:196-204.

32. Horwitz M.-S., Ilic A., Fine C., Rodriguez E., Sarvetnick N.:
Presented antigen from damaged pancreatic beta cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes.
J. Clin. Invest. 2002;109 (1):79-87.
33. Hyöty H., Hiltunen M., Knip M., Laakkonen M., Vähäsalo P., Karjalainen J., Koskela P., Roivainen M., Leinikki P., Hovi T., Akerblom H.K., Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group:
A Prospective Study of the Role of Coxsackie B and other Enterovirus Infections in the Pathogenesis of IDDM.
Diabetes 1995;44:652-7.
34. Hyöty H., Hiltunen M., Lonrot M.:
Enterovirus infections and insulin dependent diabetes mellitus - evidence for causality.
Clin. Diagn. Virol. 1998;9 (2-3):77-84.
35. Jilg W.:
Schutzimpfungen Kompendium zum aktiven und passiven Impfschutz.
2ed. ecomed Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG; Landsberg/Lech; 2000. p. 26-27.
36. Kaplan M.H., Klein S.W., McPhee J., Harper R.G.:
Group B coxsackievirus infections in infants younger than three months of age: a serious childhood illness.
Rev. Infect. Dis. 1983;5:1019-32.

37. Kapoor A., Ayyagari A., Dhole T.N.:
Non-polio Enteroviruses in Acute Flaccid Paralysis.
Ind. J. Pediatr. 2001;68 (10):927-9.
38. Karttunen A., Pöyry T., Vaarala O., Ilonen J., Hovi T.,
Roivainen M., Hyypiä T.:
Variation in Enterovirus Receptor Genes.
J. Med. Virol. 2003;70:99-108.
39. Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M.:
Enteroviren (Polio, Coxsackie, ECHO). In Medizinische
Mikrobiologie.
9ed. Georg Thieme Verlag; Stuttgart; 1998. p. 442-4.
40. Kirschke D.L., Jones T.F., Buckingham S.C., Craig A.S.,
Schaffner W.:
Outbreak of aseptic meningitis associated with echovirus 13.
Pediatr. Infect. Dis. J. 2002;21 (11):1034-8.
41. Laakso P.:
Microarray technology in detection and typing of human
enteroviruses.
ESCV Winter Meeting Copenhagen Book of Abstracts 13. 2004.
Abstract
42. Li J., Chen S., Evans D.H.:
Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays
and multiplex reverse transcriptase.
J. Clin. Microbiol. 2001; 39, 696-704.

43. Lonrot M., Hyöty H., Knip M., Roivainen M., Kulmala P., Leinikki P., Akerblom H.K.:
Antibody cross-reactivity induced by the homologous regions in glutamic acid decarboxylase (GAD65) and 2C protein of coxsackievirus B4. Childhood Diabetes in Finland Study Group. Clin. Exp. Immunol. 1996;104 (3):398-405.
44. Lum L.C.S., Chua K.B., McMinn P.C., Goh A.Y.T., Muridan R., Sarji S.A., Hooi P.S.; Chua B.H.; Lam S.K.:
Echovirus 7 associated encephalomyelitis. J. Clin. Virol. 2002;23:153-60.
45. Manzara S., Muscillo M., La Rosa G., Marianelli C., Cattani P., Fadda G.:
Molecular Identification and Typing of Enteroviruses Isolated from Clinical Specimens. J. Clin. Microbiol. 2002; 40 (12):4554-60.
46. Masuhr K.F., Neumann M.:
Virus-Meningitis und Encephalitis. In Duale Reihe Neurologie. 4ed. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart; 1998. p.265-70.
47. Mena I., Perry C.M., Harkins S., Rodriguez F., Gebhard J., Whitton J.L.:
The Role of B Lymphocytes in Coxsackievirus B3 Infection. Am. J. Pathol. 1999;155 (4):1205-15.

48. Mentel R., Wegner U., Reißmann A., Gürtler L.:
Distribution of Enteroviruses and Analysis of the Association
with Clinical Syndroms.
The World of Microbes, Abstracts, Paris , 229-229. 2002.
Abstract: 96-V-674
49. Mentel R., Wegner U., Bruns R., Gürtler L.:
Real-Time PCR to improve the diagnosis of respiratory syncytial
virus infection.
J. Med. Microbiol. 2003;52:893-6.
50. Mentel R., Kaftan H., Wegner U., Reißmann A., Gürtler L.:
Are Enterovirus Infections a Co-Factor in Sudden Hearing
Loss?
J. Med. Virol. 2004. In Print.
51. Meqdam M.M., Khalousi M.M., Al-Shurman A.:
Enteroviral Meningitis in Northern Jordan: Prevalence and
Association With Clinical Findings.
J. Med. Virol. 2002;66:224-8.
52. MMWR Center for Disease Control:
Outbreak of aseptic meningitis associated with multiple
enterovirus serotypes - Romania 1999.
MMWR Weekly 2000;49:669-71.

53. Modlin J.F.:
Picornaviridae: Introduction. In Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.
Mandell G.L., Bennett J.E. Dolin R. New York, Churchill Livingstone, 1995, p 1606-12.
54. Modrow S., Falke D., Truyen U.:
Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom in Plusstrang-orientierung. In Molekulare Virologie.
2 ed. Spektrum akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin; 2003. p. 133-58.
55. Moschovi M.A., Sterpi P., Youroukos S., Tzortzatou-Stathopoulou F.:
Encephalitis And Myocarditis In AChild With Acute Lymphoblastic Leukemia: Role of Coxsackievirus B5?
Pediatr. Hematol. Oncol. 2002;19:205-10.
56. Nairn C., Clements G.B.:
A Study of Enterovirus Isolations in Glasgow From 1977 to 1997.
J. Med. Virol. 1999;58:304-12.
57. Nepom G-T, Kwok W-W.:
Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM.
Diabetes 1998;47 (8):1177-84.
58. Nigrovic L.E.:
What's new with enteroviral infections?
Curr. Opin. Pediatr. 2001;13:89-94.

59. Oprisan G., Combiescu M., Guillot S., Caro V., Combiescu A., Delpeyroux F., Crainic R.:
Natural genetic recombination between co-circulating heterotopic enteroviruses.
J. Gen. Virol. 2002;83:2193-200.
60. Parasuraman T.V., Frenia K., Romero J.R.:
Enteroviral Meningitis Cost of Illness and Considerations for the Economic Evaluation of Potential Therapies.
Pharmacoeconomics 2001;19 (1):3-12.
61. Pauschinger M., Kühl U., Doerner A., Schieferecke K., Petschauer S.:
Nachweis enteroviraler RNA in endokardialen Biopsien bei inflammatorischer Kardiomyopathie und idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie.
Z. Kardiol. 1998;87:443-52.
62. Pauschinger M., Doerner A., Kuehl U., Schwimmbeck P.L., Poller W., Kandolf R. Schultheiss M.D.:
Enteroviral RNA Replication in the Myocardium of Patients With Left Ventricular Dysfunction and Clinically Suspected Myocarditis.
Circulation 1999;99:889-95.
63. Pevear D.C., Tull T.M., Seipel M.E., Groarke J.M.:
Activity of Pleconaril against Enteroviruses.
Antimicrobial Agents And Chemotherapy 1999;43 (9):2109-15.

64. Pichichero M.E., McLinn S., Rotbart H.A., Menegus M.A., Cascino M., Reidenberg B.E.:
Clinical and economic impact of enterovirus illness in private pediatric practice.
Pediatrics 1998;102:1126-34.
65. Poliomyelitis eradication Organisation.
The global Poliomyelitis Eradication Initiative: number of endemic countries at lowest ever.
Wkly. Epidemiol. Rec. 2002; 48:414-5.
66. Pusch A., Stenger R.-D., Haas J.-P., Kadow I., Fusch Ch.:
Hydrops fetalis nach Enterovirus-Infektion.
Kinder-und Jugendmedizin 2 (Abstracts) A128. 2002. Abstract
67. Quirk M.:
Echovirus to be considered in meningitis diagnosis.
Lancet Infect. Dis. 2001;1:220-220.
68. Reusser P.:
Management of viral infections in immunocompromised cancer patients.
Swiss Med. Wkly. 2002;132:374-8.
69. Romero J.R.:
Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Detection of the Enteroviruses.
Arch. Pathol. Lab. Med. 1999;123:1161-9.

70. Romero J.R.:
Pleconaril: a novel antipicornaviral drug.
Expert Opin. Investig. Drugs 2001;10 (2):369-79.
71. Rossmann M.G., He Y., Kuhn R.J.:
Picornavirus-receptor interactions.
Trends Microbiol. 2002;10 (7):324-31.
72. Rotbart H.A. et al.:
I Scientific Principles ; II Clinical Manifestation. In Human
Enterovirus Infections.
American Society for microbiology; Washington, DC; 1995. p. 3-
400.
73. Rotbart H.A., Brennan P.J., Fife K.H., Romero J.R., Griffin J.A.,
McKinlay M.A. Hayden F.G.:
Enterovirus meningitis in adults.
Clin. Infect. Dis. 1998;27:896-8.
74. Rotbart H.A., Webster A.D.:
Treatment of Potentially Life-Threatening Enterovirus Infections
with Pleconaril.
Clin. Infect. Dis. 2001;32:228-35.
75. Rotbart H.A.:
Treatment of picornavirus infections.
Antiviral Res. 2002;53:83-98.

76. Sadeharju K., Hamalainen A.-M., Knip M., Lonrot M., Koskela P., Virtanen S.-M., Ilonen J., Akerblom H.-K., Hyöty H.:
Enterovirus infections as a risk factor for type I diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial.
Clin. Exp. Immunol. 2003;132 (2):271-7.
77. Sawyer M.H., Saez-Llorenz X., Aviles C.L.:
Oral pleconaril reduces the duration and severity of enteroviral meningitis in children.
Proceedings of the 1999 APS/SPR meetings, San Francisco, CA.
78. Sawyer M.H.:
Enterovirus infections: diagnosis and treatment.
Pediatr. Infect. Dis. J. 1999;18 (12):1033-40.
79. Sawyer M.H.:
Enterovirus infections: diagnosis and treatment.
Curr. Opin. Pediatr. 2001;13:65-9.
80. Sawyer M.H.:
Enterovirus infections: Diagnosis and Treatment.
Semin. Pediatr. Infect. Dis. 2002;13 (1):40-7.
81. Schiff G.M., McKinlay M.A., Sherwood J.R.:
Oral efficacy of VP63843 in coxsackievirus A21 infected volunteers.
Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, LA.1996. Abstract: H-43

82. Schwarz T.F.:
Coxsackie- und Echoviren. In Diagnostische Bibliothek Band 1
Virusdiagnostik.
Porstmann, Tomas Blackwell Wissenschafts-Verlag; Berlin;
1996. p. 393-406.
83. Severini G.M., Mestroni L., Falaschi A., Camerini F., Giacca M.:
Nested Polymerase Chain Reaction for High-Sensitivity
Detection of Enteroviral RNA in Biological Samples.
J. Clin. Microbiol. 1993;31 (5):1345-9.
84. Shafran S.D., Halota W., Gilbert D.:
Pleconaril is effective for enteroviral meningitis in adolescents
and adults: a randomized placebo-controlled multicenter trial.
Abstracts of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial
Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA . 1999. Abstract:
1904
85. Stalkup J.R., Chilukuri S.:
Enterovirus infections: A review of clinical presentation,
diagnosis, and treatment.
Dermatol. Clin. 2002;20:217-23.
86. Stanway G., Joku-Korpela P., Hyypiä T.:
Human parechoviruses: biology and clinical significance.
Rev. Med. Virol. 2000;10:57-69.

87. Stenger R.-D., Bruns R., Bröcker D., Fusch Ch., Mentel R., Wegner U., Wiersbitzky H., Fischer W., Wiersbitzky S.K.W.:
Acute Psychosis in a 16-year old Girl with Enteroviral Encephalitis.
Infection 2001;19 (Suppl.1):78-78.
88. Strikas R.A., Anderson L.J., Parker R.A.:
Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the United States, 1970-1983.
J. Infect. Dis. 1986;153:346-51
89. Sun W., Huang F.-Y., Hung H.-Y.:
Fatal Enteroviral Infection in a Neonate.
Acta. Paed. Sin. 1993;34:492-5.
90. Takami T., Sonoda S., Houjyo H., Kawashima H., Takei Y., Miyajima T., Takekuma K., Hoshika A., Mori T., Nakayama T.:
Diagnosis of horizontal enterovirus infections in neonates by nested PCR and direct sequence analysis.
J. Hosp. Infect. 2000;45:283-7.
91. Tattevin P., Minjolle S., Arvieux C., Clayessen V., Colimon R., Bouget J., Michelet C.:
Benefits of Management Strategy Adjustments During an Outbreak of Enterovirus Meningitis in Adults.
Scand. J. Infect. Dis. 2002;34:359-61.

92. Thoelen I., Lemey P., Van der Donck I., Beuselinck K., Lindberg A.M., Van Ranst M.:
Molecular Typing and Epidemiology of Enteroviruses Identified From an Outbreak of Aseptic Meningitis in Belgium During the Summer of 2000.
J. Med. Virol. 2003;70:420-9.
93. Trallero G., Casas I., Tenorio A., Echevarria J.E., Castellanos A., Lozano A., Brena P.P.:
Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97).
Epidemiol. Infect. 2000;124:497-506.
94. Trallero G., Casas I., Avellón A., Pérez C., Tenorio A., De La Loma A.:
First epidemic of aseptic meningitis due to echovirus type 13 among Spanish children.
Epidemiol. Infect. 2003;130:251-6.
95. Utzig N., Stenger R.-D., Burtzlaff C., Wiersbitzky S.K.W., Mentel R., Lauffer H.:
Schwere ZNS-Infektion durch Enteroviren - Fallberichte unter Pleconaril-Behandlung.
Kinder-und Jugendmedizin 2 (Abstracts) Abstract A99.
96. Van-Kuppeveld F.-J., Galama J.-M., Zoll J., Van-den-Hurk P.-J., Melchers W.-J.:
Coxsackie B3 virus protein 2B contains cationic amphipathic helix that is required for viral RNA replication.
J. Virol. 1996;70 (6):3876-86.

97. Verboon-Maciolek M.A., Krediet T.G., Van Loon A.M., Kaan J., Galama J.M.D., Gerards L.J., Fleer A.:
Epidemiological Survey of Neonatal Non-Polio Enterovirus Infection in the Netherlands.
J. Med. Virol. 2002;66:241-5.
98. Vreugdenhil G.-R., Geluk A., Ottenhoff T.-H., Melchers W.-J., Roep B.-O., Galama J.-M.:
Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule.
Diabetologia 1998;41 (1):40-6.
99. Wang J.-R., Tsai H.-P., Huang S.-W., Kuo P.-H., Kiang D., Liu C.-C.:
Laboratory Diagnosis and Genetic Analysis of an Echovirus-30-Associated Outbreak of Aseptic Meningitis in Taiwan 2001.
J. Clin. Microbiol. 2002;40 (12):4439-44.
100. Webster A.D.B., Rotbart H.A., Warner T., Rudge P., Hyman N.:
Diagnosis of enterovirus brain disease in hypogammaglobulinemic patients by polymerase chain reaction.
Clin. Infect. Dis. 1993;17:657-61.
101. WHO:
Certification of Poliomyelitis Eradication, European Region, June 2002.
WHO Wkly. Epidemiol. Rec. 2002;77 (27):178-9.

102. Why H.:

Enteroviruses and myocarditis.

Br. J. Hosp. Med. 1995;53(9):430-4.

8. Anhang

Eidesstattliche Erklärung

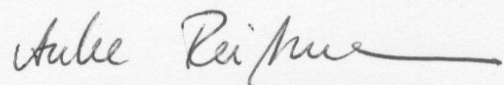
Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

01.09.2004

Datum



Unterschrift

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Anke Reißmann
Wohnort: Äußere Brucker Str. 161
91058 Erlangen
Geburtstag: 23.02.1979
Geburtsort: Greifswald
Familienstand: Ledig

Schulbildung

1985 – 1991 Grund- und Realschule in Greifswald
1991 – 1997 Gymnasium in Greifswald, Abschluss Abitur

Studium

1997 – 2003 Studium der Humanmedizin an der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald,
Abschluss der Ärztlichen Prüfung mit der
Gesamtnote „Gut“

Promotion

2001 - 2004 Promotion, Disputation 17.06.2004

Beruf

Seit 02/2004 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum
der Medizinischen Klinik I
der Friedrich-Alexander Universität
Erlangen-Nürnberg

01.09.2004

Anke Reißmann

Danksagung

Für die vielfältige Unterstützung möchte ich allen, die das Entstehen dieser Arbeit möglich gemacht haben, danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. R. Mentel vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Greifswald für die Übertragung des Themas, ihr Engagement und ihre Ratschläge während der Themenbearbeitung und bei der Fertigstellung der Dissertation.

Anleitung und große Unterstützung beim Erstellen der Arbeit erhielt ich auch von Frau Dr. rer. nat. U. Wegner, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Greifswald, der ich dafür meinen Dank aussprechen möchte.

Für die zahlreichen technischen Zuarbeiten und Ratschläge danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie insbesondere Frau R. Franke und Frau K. Rosa.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. L. Gürtler, Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Universität Greifswald, für die kritischen Ratschläge bei der Abfassung der Dissertation.