

**Nachweis von humanem Herpesvirus Typ 7
im Liquor cerebrospinalis
neurologisch erkrankter Kinder
mittels der Polymerase-Kettenreaktion**

**Martin Blay
2002**

Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

**Nachweis von humanem Herpesvirus Typ 7
im Liquor cerebrospinalis
neurologisch erkrankter Kinder
mittels der Polymerase-Kettenreaktion**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Martin Blay
Schwandorf/Opf

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h. c. mult. D. Adam

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. P. Lohse
Prof. Dr. R. Haas
Prof. Dr. H.-W. Pfister

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. A. Pohl-Koppe

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2002

I Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELE.....	1
1.1	HUMANPATHOGENE HERPESVIREN.....	1
1.2	NEUROLOGISCHE KOMPLIKATIONEN BEI VIRUSERKRANKUNGEN IM KINDESALTER.....	2
1.2.1	<i>Infektkrämpfe.....</i>	2
1.2.2	<i>Aseptische Entzündungen des ZNS.....</i>	3
1.2.3	<i>Parainfektöse Entzündungen des ZNS.....</i>	4
1.3	DIAGNOSTIK VIRALER INFEKTIONEN UND ASEPTISCHER ENTZÜNDUNGEN DES ZNS.....	4
1.4	ZIEL DIESER ARBEIT.....	5
2	DAS HUMANE HERPESVIRUS TYP 7 (HHV-7).....	6
2.1	ERSTBESCHREIBUNG DES HHV-7.....	6
2.2	TAXONOMIE DER HUMANPATHOGENEN HERPESVIREN.....	6
2.3	AUFBAU DES HHV-7.....	7
2.3.1	<i>Elektronenmikroskopische Morphologie.....</i>	7
2.3.2	<i>Genom.....</i>	7
2.3.3	<i>Capsid.....</i>	8
2.3.4	<i>Envelope.....</i>	8
2.4	ZIELZELLEN VON HHV-7.....	9
2.5	LATENZ VON HHV-7 IN DER ZIELZELLE.....	10
2.6	VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON HHV-7.....	10
2.6.1	<i>Zellkultur.....</i>	10
2.6.2	<i>Antikörpernachweis.....</i>	11
2.6.3	<i>Nachweis des Virus-Genomes.....</i>	12
2.7	EPIDEMIOLOGIE DES HHV-7.....	12
2.7.1	<i>HHV-7 Seroprävalenz.....</i>	12
2.7.2	<i>HHV-7 DNA in Leukozyten des peripheren Blutes.....</i>	12
2.7.3	<i>HHV-7 in Speichel.....</i>	13
2.7.4	<i>HHV-7 in Liquor und Hirngewebe.....</i>	13
2.7.5	<i>HHV-7 in anderen Geweben und Flüssigkeiten.....</i>	14
2.8	KLINISCHE ASPEKTE.....	15
2.8.1	<i>Infektionswege.....</i>	15
2.8.1.1	vertikale Infektion im Geburtskanal.....	15
2.8.1.2	Übertragung durch Muttermilch.....	15
2.8.1.3	Übertragung durch Speichel.....	16
2.8.1.4	Übertragung durch allogenes Blutprodukt oder Transplantation.....	16
2.8.2	<i>mögliche Erkrankungen durch HHV-7.....</i>	16
2.8.2.1	Erkrankungen ohne neurologische Komplikationen.....	16

2.8.2.2	Erkrankungen mit neurologischen Komplikationen	16
3	MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1	PATIENTEN UND PROBEN.....	18
3.1.1	<i>Gruppe I: ZNS-Erkrankungen mit entzündlichen Liquorveränderungen.....</i>	<i>18</i>
3.1.2	<i>Gruppe II: Infektkrämpfe.....</i>	<i>18</i>
3.1.3	<i>Gruppe III: neurologische Erkrankungen ohne inflammatorische Liquorveränderungen... 19</i>	<i>19</i>
3.1.4	<i>Gruppe IV: systemische Entzündungen ohne Erkrankung des ZNS.....</i>	<i>19</i>
3.1.5	<i>Gruppe V: nichtentzündliche Erkrankungen ohne ZNS-Beteiligung.....</i>	<i>19</i>
3.2	DURCHGEFÜHRTE DIAGNOSTIK	20
3.2.1	<i>Probengewinnung und primäre Probenbehandlung.....</i>	<i>20</i>
3.2.2	<i>Routinediagnostik.....</i>	<i>20</i>
3.2.3	<i>PCR zum direkten Virusgenomnachweis.....</i>	<i>20</i>
3.2.4	<i>Serologische Untersuchung der HHV-7 DNA positiven Patienten.....</i>	<i>21</i>
3.3	PROBENVORBEREITUNG UND DNA-PRÄPARATION FÜR DIE PCR.....	21
3.4	OPTIMIERUNG DER PCR.....	22
3.4.1	<i>Plasmid-DNA.....</i>	<i>22</i>
3.4.1.1	<i>Der Vector.....</i>	<i>22</i>
3.4.1.2	<i>Das Insert.....</i>	<i>22</i>
3.4.1.3	<i>Klonierung des Plasmides.....</i>	<i>22</i>
3.4.2	<i>Ziel-DNA.....</i>	<i>25</i>
3.4.3	<i>Primer.....</i>	<i>26</i>
3.4.4	<i>DNA-Polymerase.....</i>	<i>27</i>
3.4.5	<i>Zusammensetzung des Reaktionsansatzes.....</i>	<i>28</i>
3.4.6	<i>Auswertung der PCR-Ergebnisse.....</i>	<i>29</i>
3.4.7	<i>Nachweis der Spezifität der Methode.....</i>	<i>30</i>
3.4.8	<i>Nachweis der Sensitivität der PCR.....</i>	<i>31</i>
3.5	QUALITÄTSSICHERUNG.....	34
3.6	ENTSORGUNG DER BELASTETEN ABFÄLLE.....	35
3.6.1	<i>Ethidium Bromid.....</i>	<i>35</i>
3.6.2	<i>potentiell infektiöses Material.....</i>	<i>35</i>
3.7	CHIQUADRAT-TEST	35
4	ERGEBNISSE.....	37
4.1	FALLBESCHREIBUNG DER HHV-7 POSITIVEN PATIENTEN	37
4.2	HHV-7 IGM- UND IGG-TITER IM SERUM.....	40
4.3	VERTEILUNG DER HHV-7 POSITIVEN PATIENTEN AUF DIE GRUPPEN.....	41
5	DISKUSSION.....	42
5.1	DISKUSSION DER VERWENDETEN METHODIK	42

5.1.1	<i>Materialgewinnung und -verwahrung</i>	42
5.1.2	<i>Verwendete Nachweismethoden</i>	42
5.1.3	<i>prinzipielle Vorteile der PCR</i>	43
5.1.3.1	Vergleich Viruskultur und PCR aus Liquorproben.....	44
5.1.3.2	Vergleich serologischer Verfahren und PCR aus Liquorproben.....	44
5.1.4	<i>Sensitivität und Spezifität der verwendeten HHV-7 PCR</i>	44
5.1.5	<i>Qualitätskontrollen der Nachweisverfahren</i>	45
5.1.5.1	falsch positive Ergebnisse.....	45
5.1.5.2	falsch negative Ergebnisse.....	46
5.2	DISKUSSION DER ERHALTENEN ERGEBNISSE	46
5.2.1	<i>Gruppeneinteilung</i>	46
5.2.2	<i>Aseptische Infektionen des ZNS durch HHV-7</i>	47
5.2.3	<i>Infektkrämpfe durch HHV-7</i>	48
5.2.4	<i>Beeinträchtigung der Hirnnerven durch HHV-7</i>	49
5.2.5	<i>Infektion von neuronalem Gewebe durch HHV-7</i>	49
5.2.6	<i>statistische Beurteilung der Verteilung der HHV-7 positiven Patienten</i>	50
6	ZUSAMMENFASSUNG	51
7	TABELLEN DER GRUPPEN I-V	52
7.1	TABELLE 17: PATIENTEN DER GRUPPE I.....	52
7.2	TABELLE 18: PATIENTEN DER GRUPPE II.....	53
7.3	TABELLE 19: PATIENTEN DER GRUPPE III.....	54
7.4	TABELLE 20: PATIENTEN DER GRUPPE IV.....	55
7.5	TABELLE 21: PATIENTEN DER GRUPPE V.....	56
8	VERZEICHNISSE	57
8.1	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN.....	57
8.2	WICHTIGE LIEFERANTEN FÜR LABORBEDARF.....	59
9	LITERATUR	60
9.1	VERWENDETE BÜCHER.....	60
9.2	INTERNET-ADRESSEN.....	60
9.3	LITERATURVERZEICHNIS.....	61

II Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Schematische Darstellung von HHV-7	7
Abbildung 2: Stammbaum der humanpathogenen Herpesviren	8
Abbildung 3: Schema der Interaktion von CD4 und HHV-7	9
Abbildung 4: Altersabhängige Verteilung der HHV-7 Antikörperprävalenz	13
Abbildung 5: Schema des verwendeten Plasmides pH7SB 268	25
Abbildung 6: Optimierung der Mg ⁺⁺ -Konzentration im ersten PCR-Lauf	29
Abbildung 7: Spezifitätsnachweis der verwendeten Primer	30
Abbildung 8: Spezifitätsnachweis durch Restriktionsverdau der PCR-Produkte	32
Abbildung 9: Sensitivität der PCR	33
Tabelle 1: Taxonomie der humanpathogenen Herpesviren	6
Tabelle 2: Prävalenz von HHV-7 IgG im Serum gesunder Erwachsener	14
Tabelle 3: Prävalenz von HHV-7 DNA in Leukozyten gesunder Erwachsener	14
Tabelle 4: Prävalenz von HHV-7 DNA im Speichel gesunder Erwachsener	15
Tabelle 5: OD-Werte für die Plasmidlösungen Nr. 1-4	23
Tabelle 6: verwendete Primer	26
Tabelle 7: Übersicht über die Ziel-DNA der PCR (HHV-7 JI)	27
Tabelle 8: Reaktionsansätze der PCR	28
Tabelle 9: Zycler-Bedingungen	28
Tabelle 10: Zusammensetzung des TBE-Laufpuffers (1l, 5x)	29
Tabelle 11: Zusammensetzung des Auftragspuffers (100ml, 6x)	30
Tabelle 12: Schema der Vierfeldertafel	36
Tabelle 13: Signifikanzniveaus	36
Tabelle 14: HHV-7 positive Patienten	37
Tabelle 15: Ergebniszusammenstellung der HHV-7 positiven Patienten	40
Tabelle 16: Chirquadrat-Test:	41
7.1 Tabelle 17: Patienten der Gruppe I	52
7.2 Tabelle 18: Patienten der Gruppe II	53
7.3 Tabelle 19: Patienten der Gruppe III	54
7.4 Tabelle 20: Patienten der Gruppe IV	55
7.5 Tabelle 21: Patienten der Gruppe V	56

1 Einleitung und Ziele

Infektiöse und entzündliche neurologische Erkrankungen im Kindesalter haben vielfältige Manifestationen. Neben asymptomatischen Verläufen können Veränderungen des Wesens, der kognitiven Leistung, der Motorik oder der Sensibilität Hinweise auf das Vorliegen einer neurologischen Schädigung des zentralen Nervensystems (ZNS) geben. Jede dieser Störungen muß schnellst möglich einer Abklärung der auslösenden Ursache zugeführt werden, um je nach Ätiologie über Therapie und Prognose entscheiden zu können. Im Kindesalter sind virale Infektionen eine der häufigsten Ursachen für erworbene ZNS-Erkrankungen. Als klassische neurotrope Viren sind Vertreter der humanpathogenen Herpesviren als Hauptverursacher infektiöser und entzündlicher ZNS-Erkrankungen zu nennen.¹

1.1 Humanpathogene Herpesviren

Humane Herpesviren gelten als neurotrope Viren. Ihre schädigende Wirkung können sie entweder während der primären Infektion oder bei einer Reaktivierung aus der Latenz zur Entfaltung bringen.

Das Humane Herpes Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) gewinnt z. B. ausgehend vom N. Trigemini über das Ganglion N. Trigemini Zutritt zum ZNS und bewirkt im Rahmen einer HSV-Enzephalitis typische Veränderungen insbesondere im Temporallappen der Patienten mit entsprechenden neurologischen Defiziten. Das humane Herpesvirus Typ 2 (HSV-2) gilt als Ursache von Meningitiden und Enzephalitiden bei Neugeborenen (z. B. durch eine vertikale Infektion im Geburtskanal). Beide Viren infizieren Neurone und persistieren dort latent.¹ Das Varizellen-Zoster-Virus (VZV, humanes Herpesvirus Typ 3 bzw. HHV-3) ist der Erreger der Varizellen („Windpocken“). Neben seltenen subklinischen Verläufen verursacht es meist erythematöse Erkrankungen mit dem typischen Varizellenexanthem. Bei Kindern mit klinischem Bild einer Meningoenzephalitis konnte mit der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) intrathekale Varizellen-Zoster-DNA auch ohne Auftreten von varizellentypischen Exanthem im Rahmen der akuten Erkrankung oder in der Vorgeschichte nachgewiesen werden.² Das Varizellen-Zoster-Virus scheint in Neuronen und Gliazellen latent zu persistieren.^{1,2}

Die Infektiöse Mononukleose („Pfeiffer'sches Drüsenfieber“) wird durch das Epstein-Barr-Virus (EBV, Humanes Herpesvirus Typ 4 bzw. HHV-4) hervorgerufen. Es persistiert in den Schleimhautepithelien des Mundes und infiziert von dort fortwährend B-Lymphozyten, die im peripheren Blutaussstrich als mononukleäre Zellen imponieren. Neurologische Erscheinungsformen der EBV-Infektion können u. a. Meningitis, Meningoenzephalitis, Guillain-Barré-Syndrom (GBS) oder eine Polyneuritis sein.¹

Das humanpathogene Cytomegalovirus (HCMV, humanes Herpesvirus Typ 5 bzw. HHV-5) infiziert Epithelzellen der Mundspeicheldrüsen, der Nierentubuli sowie neuronales Gewebe. Durch die Infektion von vorwiegend segmentkernigen und mononukleären Leukozy-

ten wird das Virus im Körper verbreitet. Es persistiert in Speicheldrüsenepithelien und Epithelien der Nierentubuli. Neben einem großen Anteil an inapparenten Verläufen kommen vielfältige klinische Formen vor. Beispielhaft für neurologische Erkrankungen des Erwachsenen sind die Meningoenzephalitis und das Guillain-Barré-Syndrom zu nennen.¹

Das Humane Herpesvirus Typ 6 (HHV-6) wird als häufigste Ursache des Exanthema Subitum (ES), des „Drei-Tage-Fieber“, angesehen. Fieberkrämpfe und Meningoenzephalitiden sind neurologische Komplikationen der meist exanthematisch und fieberhaft verlaufenden Infektion. Wie bei VZV können jedoch ZNS-Komplikationen auch ohne vorheriges oder begleitendes Exanthem auftreten.³

Das 1990 erstmals beschriebene humane Herpesvirus Typ 7 (HHV-7), wie HHV-6 und CMV ein β -Herpesvirus, wird als mögliche Ursache einer Reihe verschiedener Erkrankungen angesehen. Darunter sind unspezifische fieberhafte Viruserkrankungen⁴, exanthematisch verlaufende Erkrankungen wie das Exanthema Subitum^{5, 6}, neurologische Erkrankungen wie Fazialispareesen⁷, Meningitiden⁸ und Hemiplegien⁹. Desweiteren wurde ein Zusammenhang zu mononukleoseähnlichen Erkrankungen¹⁰ und Pytiriasis roseae¹¹ beschrieben.

Zuletzt folgte noch die Entdeckung des Humanen Herpesvirus Typ 8 (HHV-8), das mit dem Auftreten von Karposi-Sarkomen in Zusammenhang mit AIDS bei HIV-Infektionen zu stehen scheint. Eine sichere neurologische Komponente der HHV-8 Infektion ist bisher nicht bekannt.¹

1.2 Neurologische Komplikationen bei Viruserkrankungen im Kindesalter

1.2.1 Infektkrämpfe

Infektkrämpfe sind Gelegenheitsanfälle im Säuglings- und Kleinkindesalter, die bei fieberhaften Erkrankungen insbesondere in der Phase des schnellen Fieberanstiegs auftreten. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 18. und 22. Lebensmonat. 2-3% aller Kinder erleiden in den ersten Lebensjahren einen Infektkrampf, bei ca. einem Drittel davon kommt es zu mindestens einem Rezidiv.¹² Die Pathogenese ist nach wie vor unklar. Virusinfektionen der oberen Atemwege, Exanthema Subitum, akute Otitis media, Harnwegsinfekte und fieberhafte Impfreaktionen sind klinisch die häufigsten auslösenden Ursachen. Differentialdiagnostisch müssen sowohl epileptische Erkrankungen als auch Krämpfe bei Entzündungen und Infektionen des ZNS ausgeschlossen werden.

Eine wichtige mögliche Spätfolge eines Infektkrampfes ist die Epilepsie. Bei einem allgemeinen Risiko von ca. 0,5% bis zum Alter von 7 Jahren einen epileptischen Anfall zu erleiden, steigt dieses Risiko auf ca. 2% bei einem einfachen bzw. ca. 7% bei einem komplizierten Infektkrampf in der Anamnese.^{13, 14, 15} Risikofaktoren für eine spätere Epilepsie sind eine bekannte Epilepsie bei Verwandten ersten Grades, vorbestehende Störungen in der neurolo-

gischen Entwicklung, ein erster komplizierter Infektkrampf und/oder nur geringe Temperaturerhöhung beim ersten Infektkrampf.¹⁶

Risikofaktoren für ein Rezidiv eines Infektkrampfes sind neben jungem Alter eine nur geringe Temperaturerhöhung beim ersten Anfall oder ein Infektkrampf bei Verwandten ersten Grades. Ein positiver Virusnachweis im Rahmen der fieberhaften Erkrankung hat keinen Einfluß auf das Rezidivrisiko eines Infektkrampfes.²⁰

Infektkrämpfe lassen sich allgemein in 2 Gruppen einteilen:

Einfache Infektkrämpfe (ca. 80% der Fälle) treten im Alter zwischen 6 Monaten und 5 Jahren auf, sind primär generalisiert, dauern nicht länger als 15 Minuten und wiederholen sich nicht innerhalb des selben fieberhaften Infektes.

Liegt einer oder mehrere der folgenden Punkte vor, spricht man von einem komplizierten Infektkrampf (ca. 20% der Fälle):

- Auftreten vor dem 6. Lebensmonat bzw. nach dem 5. Lebensjahr
- primär fokale Anfälle
- Dauer länger als 15 Minuten bzw. Rezidivieren innerhalb derselben Erkrankung
- positive Familienanamnese für Epilepsie bei Verwandten ersten Grades^{12, 17, 18, 19, 20, 21, 22}

Ein positiver serologischer Virusnachweis oder Virusisolation aus dem Liquor bei Patienten mit Infektkrämpfen scheint keine Bedeutung für den weiteren Krankheitsverlauf oder Komplikationsmöglichkeiten wie Rezidivanfälle oder das Auftreten einer späteren Epilepsie zu haben.¹⁹ HHV-7 wurde von einigen Autoren wie auch HHV-6 mit der PCR im Liquor von Patienten mit Infektkrämpfen nachgewiesen.^{6, 23, 24} Andere Autoren konnten dies allerdings weder für HHV-6 noch für HHV-7 bestätigen.²⁵

1.2.2 Aseptische Entzündungen des ZNS

Aseptische Entzündungen des ZNS können durch Viren oder autoimmunologische Prozesse hervorgerufen werden. Viren erreichen das ZNS über die Blut-Hirn-Schranke oder entlang von Nervenbahnen (z. B. Tr. Olfactorius) und infizieren Neuronen oder Gliazellen direkt. Es kommt zu Zellveränderungen im Sinne eines zytopathischen Effektes und so zur Schädigung von Hirngewebe mit entsprechenden Ausfällen (z. B. HSV-Enzephalitis). Das klinische Bild der ZNS-Beteiligung bei Virusinfektionen richten sich sehr stark nach Lokalisation und Ausdehnung der Infektion. Eine Meningitis geht typischerweise mit einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes, Fieber, Kopfschmerz, Müdigkeit und Lichtscheu einher. Bei meist bestehendem Meningismus sind fokale neurologische Ausfälle selten festzustellen. Im Gegensatz dazu ist beim Patienten mit einer Enzephalitis abhängig von der Lokalisation der Infektion in der Grauen oder Weißen Substanz ein funktionell umschriebener Ausfall neurologischer Funktionen zu beobachten. Eine Enzephalitis wird regelhaft begleitet von allgemeinen Erkrankungserscheinungen wie Müdigkeit, Kopfschmerz, Fieber und Bewußtseinsstörungen. Krampfanfälle müssen differentialdiagnostisch immer als Zeichen einer möglichen Enzephalitis oder Meningitis abgeklärt werden. Wie HHV-6 wurde auch

HHV-7 mit der PCR-Methode im Liquor von Kindern mit der Diagnose einer Meningitis nachgewiesen.^{8, 26} Die Therapie besteht in einer gezielten antiviralen Chemotherapie mit z. B. Acyclovir (ACV) bei HSV- oder VZV bzw. Gancyclovir (GCV) bei CMV-Infektionen.²⁷

1.2.3 Parainfektöse Entzündungen des ZNS

Der Infektion des Hirngewebes stehen die post- oder parainfektösen Entzündungen gegenüber. Diese Gruppe ist gekennzeichnet durch zytotoxische und entzündliche Zellschädigungen im ZNS (Gefäße, Gliazellen, Neurone), die durch immunologische Vorgänge verursacht werden. Auslöser können systemische Virusinfektionen oder z. B. Impfungen sein. Klinisch können die Patienten sehr variabel mit einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes, Beeinträchtigung des Bewußtseins, Krampfanfällen und verschiedensten fokalen Ausfällen imponieren. Typischerweise ist bei entzündlich verändertem Liquor kein Erreger im ZNS nachweisbar. Bildgebende Verfahren (kraniale Computertomographie (cCT), Magnetresonanztomographie (MRT)) zeigen Veränderungen des Myelins in verschiedenen Regionen des ZNS, betont aber im Marklager oder der Weißen Substanz des Myelons („akute disseminierte Enzephalomyelitis“, ADEM). Der Therapieansatz ist eine entzündungshemmende Therapie mit z.B. hochdosiertem Cortison zur Unterdrückung des meist T-Zell vermittelten autoimmunologischen Prozesses. Eine Infektion mit HHV-7, primär oder reaktiviert, konnte bisher noch nicht als Auslöser einer ADEM identifiziert werden.²⁸

1.3 Diagnostik viraler Infektionen und aseptischer Entzündungen des ZNS

An schnell verfügbaren diagnostischen Methoden stehen neben der Untersuchung der zytologisch-chemischen Zusammensetzung des Liquors (Zellzahl und Zellart, Eiweiß-, Glukosekonzentration) Tests der Hirnfunktion (klinisch-neurologische Untersuchung, Elektroenzephalogramm (EEG)) sowie bildgebende Verfahren zur morphologischen Untersuchungen des ZNS (cCT, MRT, Schädelsonographie) zur Verfügung.

Aufwendigere Verfahren weisen Virusantigene (z. B. Hybridisierungstechniken, Westernblot), Virusantikörper (z. B. Enzyme Linked Immuno Sorbend Assay (ELISA)) oder Virus-DNA (z. B. Southernblot oder Polymerasekettenreaktion (PCR)) nach. In den letzten Jahren hat sich zum direkten Erregernachweis die PCR auf grund der Schnelligkeit, hohen Sensitivität und Spezifität durchgesetzt. Ein positives oder negatives Ergebnis der PCR aus Liquorproben ist neben dem klinischen Bild maßgebend für die weitere Therapie des Patienten und wird durch laborchemische Untersuchungen von Blut und Liquor sowie bildgebenden Verfahren ergänzt. Beispielhaft wird bei einem positiven Nachweis von HSV-1 oder HSV-2 im Liquor eines neurologisch erkrankten Kindes dieser Erreger als Ursache der neurologischen Erkrankung gewertet und eine gezielte antivirale Chemotherapie mit z. B. Acyclovir eingeleitet. Ein ähnliches Vorgehen hat sich für VZV etabliert.^{2, 29, 30, 31, 32}

1.4 Ziel dieser Arbeit

Bisher wurde HHV-7 als Auslöser von Exanthema subitum mit und ohne neurologische Komplikationen beschrieben. Das Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang von HHV-7 und entzündlichen ZNS-Erkrankungen bei Patienten ohne Exanthema subitum zu untersuchen.

Zur Detektion von HHV-7 DNA im Liquor wurde ein spezifisches und hochsensitives Testsystem bestehend aus DNA-Präparation und nested-PCR etabliert. Nach Optimierung des Testsystems wurden insgesamt 104 Liquorproben untersucht. 67 Proben stammten von Kindern mit neurologischen Erkrankungen, 37 Proben von Kindern ohne ZNS-Erkrankung dienten als Kontrollen.

2 Das Humane Herpesvirus Typ 7 (HHV-7)

2.1 Erstbeschreibung des HHV-7

Im Jahre 1990 beschrieb Frenkel erstmals die Isolation eines bisher unbekanntes Herpesvirus aus aktivierten CD4+ T-Lymphozyten eines gesunden Mannes, das in seinen mikrobiologischen Eigenschaften große Ähnlichkeiten mit dem seit 1986 bekannten Humanen Herpesvirus 6 (HHV-6), aufwies. Jedoch stellte es sich immunologisch und mikrobiologisch so verschieden dar, daß es als neues Mitglied der Herpesvirenfamilie Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7) bezeichnet wurde.^{33, 34}

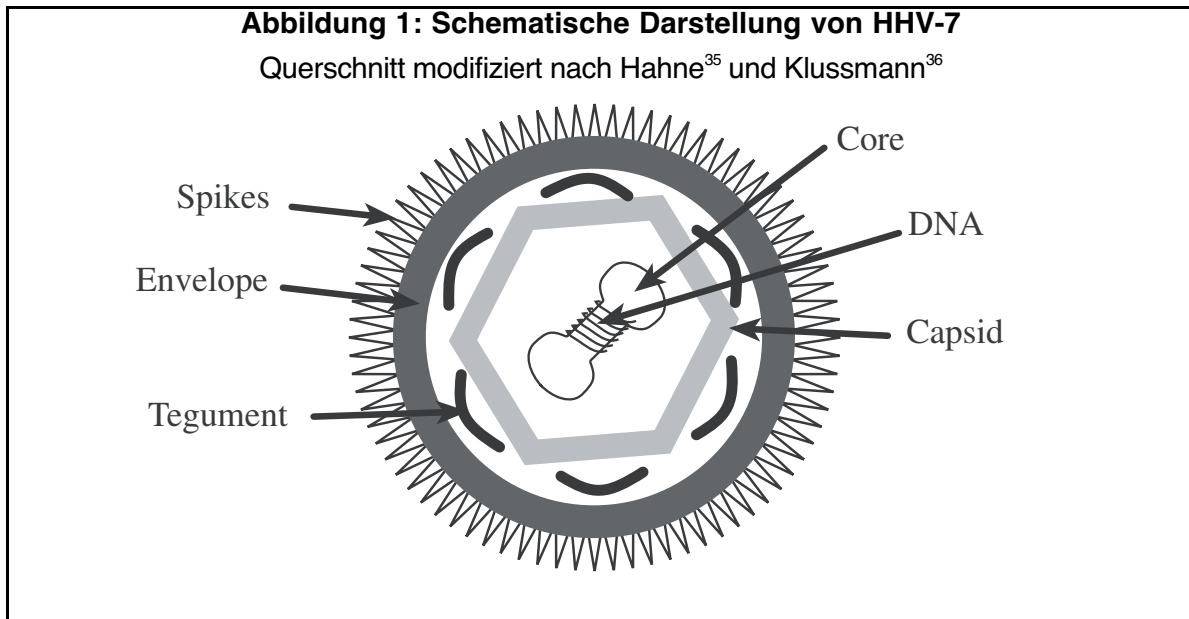
2.2 Taxonomie der humanpathogenen Herpesviren

HHV-7 bildet zusammen mit HHV-6A und 6B sowie CMV die Gruppe der β -Herpesviridae (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Taxonomie der humanpathogenen Herpesviren
NCBI GenBank™, Stand 3/02**

- α -Herpesviren
 - Simplexvirus
Humanes Herpesvirus Typ 1 und 2 (HSV-1 und -2)
 - Varicellovirus
Humanes Herpesvirus 3: Varicella-Zoster-Virus (VZV)
 - unklassifizierte α -Herpesviren
- β -Herpesviren
 - Cytomegalovirus
Humanes Herpesvirus 5: Humanes Cytomegalievirus (HCMV)
 - Roseolovirus
Humanes Herpesvirus 6A und 6B (HHV-6A/6B)
 - unklassifizierte β -Herpesviren
Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)
- γ -Herpesviren
 - Lymphocryptovirus
Humanes Herpesvirus 4, Epstein-Barr-Virus (EBV)
 - Rhadinovirus
Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8),
Kaposi's sarcoma-associated herpes-like virus
 - unklassifizierte γ -Herpesviren
- nicht zugeordnete/nicht klassifizierte Herpesviren

2.3 Aufbau des HHV-7



2.3.1 Elektronenmikroskopische Morphologie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von HHV-7 infizierten CD4+ Zellen zeigen ein typisches Virus der Herpesfamilie. Die Partikel haben einen Durchmesser von ca. 170nm. Strukturell findet sich im Zentrum des Viruspartikels ein zylindrisches Core-Protein mit der Virus-DNA, ein Capsid (Durchmesser ca. 90-95nm), ein amorphes Tegument (ca. 30nm Durchmesser) und zu äußerst ein Envelope mit eingelagerten Glykoproteinen. Wie bei HHV-6 ist auch bei HHV-7 das Tegument elektronenmikroskopisch sehr dicht (siehe Abbildung 1).^{33, 35, 36}

2.3.2 Genom

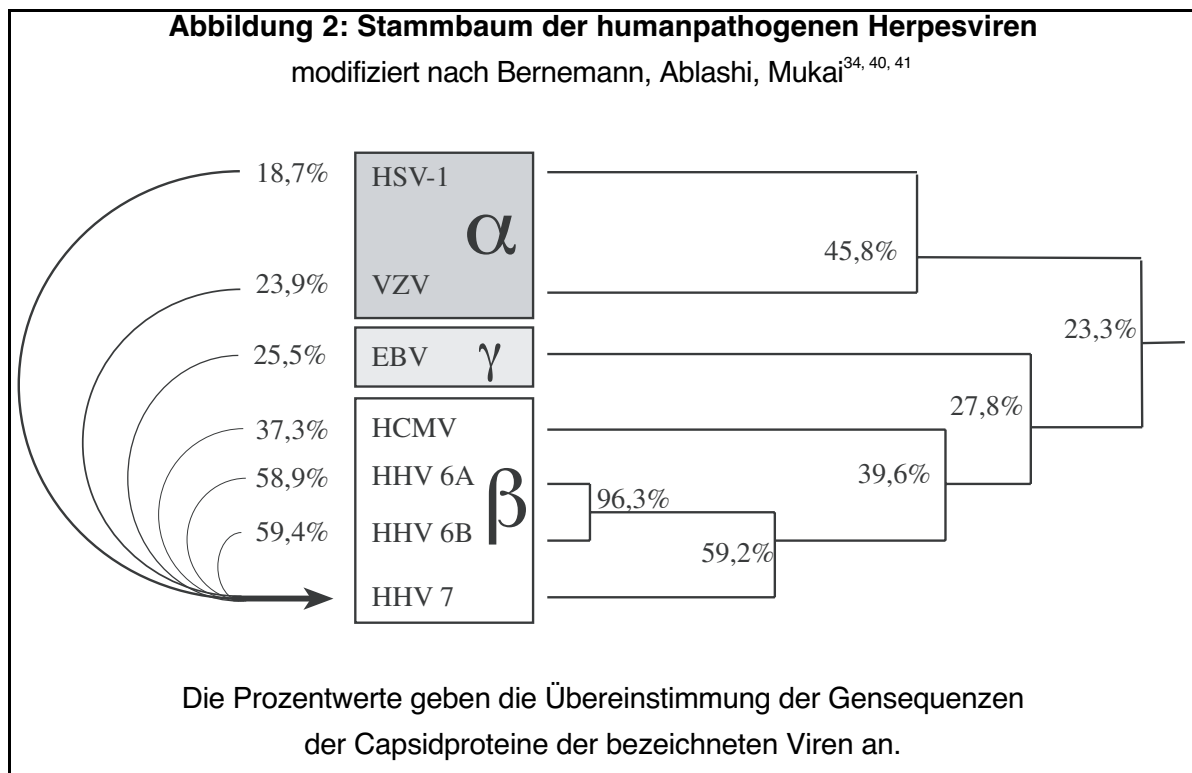
Die DNA der Herpesviren-Gruppe besitzt ein Molekulargewicht von etwa $100-200 \times 10^6$ Da. HHV-7 DNA hat eine Länge von ca. 150 000 bp (HHV-7 RK 153080bp; HHV-7 JI 144861bp) und damit ein Gewicht von ca. 93×10^6 Da ($1,6 \cdot 10^{-16}$ g).^{37, 38, 39} Sie ist um ein Core-Protein gewickelt im Capsid untergebracht. Die DNA-Sequenzen der verschiedenen HHV-7 Stämme weisen nur geringe Unterschiede in der Basensequenz auf und sind im Gegensatz zu HHV-6 jeweils über einen längeren Zeitraum sehr stabil.⁴⁰

Ähnlichkeitsanalysen verschiedener Bereiche der DNA der humanpathogenen Herpesviren bezüglich Verwandtschaftsbeziehungen haben zur Entwicklung eines phylogenetischen Baumes geführt. Die DNA von HHV-7 weist die größte Verwandtschaft zu HHV-6 und hier insbesondere zu Typ 6B auf. Ein weiterer naher Verwandter ist das humane Zytomegalievirus (HCMV) (siehe Abbildung 2).^{34, 40, 41}

2.3.3 Capsid

Das Capsid ist eine Proteinhülle um die DNA. Es besteht aus 162 Capsomeren, die ikosaedrisch angebracht sind. Sequenzanalysen des für die Capsomere kodierenden Genoms ergaben eine große Ähnlichkeit unter den Herpesviren (siehe Abbildung 2).

Die in dieser Arbeit benutzte PCR detektiert eine Sequenz eines HHV-7 spezifischen Glykoproteingens „U23“. Dieses Gen wurde bei der Kartierung des gesamten Virusgenoms beschrieben. Seine genauere Bedeutung für HHV-7 ist noch unbekannt. Es stellt aber aufgrund der spezifischen Genomsequenz eine geeignete Ziel-DNA für den Virusnachweis mit der PCR dar (siehe Punkt 3.4).⁴²

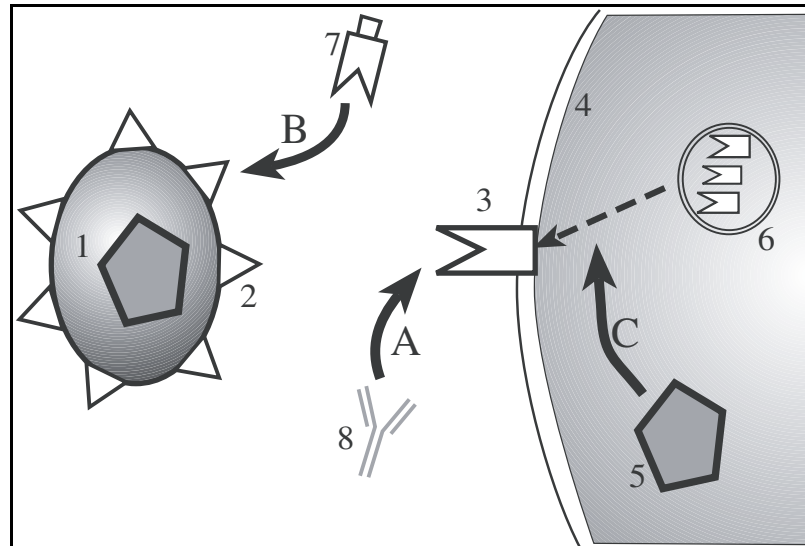


2.3.4 Envelope

Die äußerste Hülle des Viruspartikels ist das Envelope, eine Lipoproteinmembran. Darin eingelagert sind Glykoproteine, die hauptimmunogenen Epitope des Virus. Sie stimulieren die zelluläre und humorale Immunantwort des Wirtes.⁴³

Gegenüber den Envelope-Proteinen der β -Herpesviren wurden auf B- und T-Zell-Ebene ein hohes Maß an Ähnlichkeit festgestellt. Die nahe Verwandtschaft der β -Herpesviren auf Ebene der Proteinstrukturen, die zur lymphozytären Blastogenese der T-Zellen und Antikörperbildung durch B-Zellen führen, spiegelt sich auch in der hochgradigen Übereinstimmung der für diese Proteine kodierenden Gensequenzen wieder.^{44, 45, 46}

Abbildung 3: Schema der Interaktion von CD4 und HHV-7



- 1 infektiöses HHV-7
- 2 Virusglykoprotein zur Erkennung von CD4-Rezeptoren
- 3 CD4-Rezeptor
- 4 CD4-positive Zielzelle des Virus
- 5 intrazytoplasmatisches Viruskapsid
- 6 in Transportvesikel verpackte CD4-Rezeptorvorläufer
- 7 löslicher CD4-Rezeptor
- 8 Antikörper gegen CD4-Rezeptoren

- A Anti-CD4-Antikörper binden an CD4-Rezeptoren und blockieren das Anheften von HHV-7 an CD4-Zellen
 B löslicher CD4-Rezeptor bindet an Virusglykoprotein und verhindert ebenfalls das Binden an CD4-positive Zellen
 C zytoplasmatisches Virus blockiert den Einbau von CD4-Rezeptoren in die Zellmembran

2.4 Zielzellen von HHV-7

Eine Replikation von HHV-7 wird in latent infizierten und aktivierten CD4+ T-Zellen sowie in Epithelzellen der Mundspeicheldrüsen beobachtet.^{33, 47} Als Zeichen einer persistierenden HHV-7 Infektion wurde ein 85kDa großes Virusprotein (Tegument-Phosphoprotein pp85) an humanen Parenchymzellen in Lunge, Haut und Brustdrüsen gefunden, in geringerem Maß auch in Leber, Niere und Tonsillen. Auf Zellen von Colon, Milz und Gehirn konnten dieses HHV-7-Protein mit spezifischen monoklonalen Antikörper nicht dargestellt werden.⁴⁸

Chan fand HHV-6 und HHV-7 DNA mit der PCR in neuronalem Gewebe von primären Hirntumoren.⁴⁹

CD4+ Zellen vermindern nach Infektion mit HHV-7, ähnlich wie nach Infektion mit HIV, die CD4-Rezeptordichte auf ihrer Oberfläche signifikant („down regulation“). Dies beruht auf einer Veränderung des intrazellulären Transportes des Rezeptors; Translation und Transkription des Rezeptorproteins bleiben unbeeinflusst (siehe Abbildung 3).^{50, 51, 52}

2.5 Latenz von HHV-7 in der Zielzelle

Herpesviren besitzen als gemeinsames Merkmal die Fähigkeit zur latenten Persistenz in der Zielzelle nach der Primärinfektion. Im Stadium der Latenz sind keine infektiösen Viruspartikel nachweisbar. Mit geeigneten Methoden wie der PCR lassen sich jedoch je nach Herpesvirus wenige (z. B. HSV-1) bis viele Kopien (z. B. EBV) der Virus-DNA in der Wirtszelle nachweisen. Man vermutet, daß die Virus-DNA neben der Zell-DNA existiert und z. B. bei EBV als zirkuläres Episom vorliegt. Welche Bereiche der Virus-DNA für dieses Stadium der Latenz zuständig und welche Transskripte der DNA zum Erhalt des Latenzstadiums nötig sind, ist bisher nicht bekannt. Auch die Wechselwirkung des Virus und der Wirtszelle im Stadium der Latenz ist noch weitgehend unklar.⁵³

Wie in Abschnitt 2.4 erläutert, scheint im Gegensatz zu einer latenten Infektion bei einer persistierenden Infektion verschiedener Gewebe eine anhaltende Präsentation von Virusproteinen auf der Zelloberfläche aufzutreten.

In vitro ist infektiöses HHV-7 nur aus aktivierten Lymphozyten und in einigen neoplastischen Zelllinien anzüchtbar.³³ Nicht aktivierte T-Zellen zeigen äußerlich keine erkennbaren Anzeichen für eine Virusinfektion. Das Virus persistiert also in nichtinfektiöser Form latent in der Zelle, kann aber nach Stimulation wieder infektiöse Viruspartikel produzieren und die Wirtszelle schädigen.

2.6 Verfahren zum Nachweis von HHV-7

2.6.1 Zellkultur

Probenmaterial wird in entsprechende Kulturmedien eingebracht und unter geeigneten Bedingungen HHV-7 vermehrt. Das Virus wird mit verschiedenen Verfahren aus dem Kulturmedium gewonnen und so genügend Virusmaterial für weitere Untersuchungen bereitgestellt. Zum Nachweis des angereicherten Virus kommen verschiedene Verfahren zur Anwendung, wie DNA-Restriktionsverdau, Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen (z. B. ELISA), Hybridisierungsverfahren (z. B. Southernblot) oder PCR.

HHV-7 ist auf mononukleären Zellkulturen (CD4+ T-Zellen) aus dem peripheren Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), auf Nabelschnurblut (cord blood mononuclear cells, CBMC), auf Sup-T1 Zellkulturen (neoplastischen Zellen eines Non-Hodgkin-T-Zell-Lymphoms) und Jurkat- bzw. Molt-3 Zelllinien (neoplastischen CD4+ Zellen) kultivierbar. In

der Viruskultur zeigt es frühestens nach ca. 7-10 Tagen einen unspezifischen zytopathischen Effekt (cytopathic effect, CPE) mit Bildung von multinukleären Synzytien und Zellballonierung. Die Effektivität der Virusreplikation in der Kultur kann durch Bestimmung der Virusdichte im Überstand der Zellkultur gemessen werden. Dazu werden jeweils mehrere reine Zellkulturen mit Proben einer 10-fach-Verdünnungsreihe des Zellüberstandes von HHV-7 produzierenden Kulturen infiziert und inkubiert. Die Verdünnungsstufe, bei der 50% der Zellkulturen nach 7-10 Tagen einen CPE aufweisen, gibt den Wert für die „tissue culture infectious dose 50%“ (TCID₅₀) an. Für HHV-7-Kulturen in hoch angereicherten CD4+ Zellen beträgt der Virustiter etwa 10⁶ TCID₅₀/ml. Sowohl auf PBMC-Kulturen als auch auf neoplastischen CD4+ Zellen ist der Virustiter mit 10³ bis 10⁴ TCID₅₀/ml deutlich geringer. HHV-7 zeigt damit zumindest in vitro eine nur geringe Replikationsrate bzw. Viruspartikeldichte im Zellüberstand verglichen mit z. B. HHV-6. Bei der Untersuchung von Patientenmaterial muß dies berücksichtigt werden. In Blut- und Liquorproben ist mit einer geringen Virus-DNA-Konzentration zu rechnen und die Nachweismethode der Virus-DNA, hier die PCR, entsprechend sensitiv zu gestalten.^{33, 54, 55} Die Möglichkeiten, HHV-7 im Zellüberstand von Viruskulturen nachzuweisen, werden in den nächsten Abschnitten beschrieben (siehe 2.6.2 und 2.6.3).

2.6.2 Antikörpernachweis

Mit diesen Verfahren werden Antikörper in Serum, Liquor oder z.B. Zellüberständen aus Zellkulturen untersucht. Prinzipiell können entweder die Erregerantigene mit bekannten Antikörpern komplexiert werden („Erregerdiagnose“) oder die im Serum bzw. Liquor befindlichen Antikörper mit bekannten Antigenen („Antikörperdiagnose“). Überwiegend werden Testverfahren zum Antikörpernachweis verwendet. Die gebildeten Immunkomplexe werden spezifisch markiert, wobei beim Antikörpernachweis hauptsächlich die Markierung mit Enzymen („enzyme linked immuno sorbent assay“, ELISA), mit Fluorochromen („immune fluorescence assay“, IFA bzw. IFT im deutschen Sprachgebrauch) oder mit radioaktiven Isotopen („radio immuno assay“, RIA) Verwendung finden.^{46, 56} Ein positives Testresultat kann erst erwartet werden, wenn die Antikörperkonzentration die Nachweisgrenze des jeweiligen Testverfahrens erreicht hat (Sensitivität). Mit dem getrennten Bestimmen von Antikörpern der IgG oder IgM-Klasse kann unter Umständen eine primäre Infektion von einer Reaktivierung unterschieden werden. Des Weiteren kann durch Bestimmen der Antikörperkonzentration in nacheinander gewonnenen Proben weitere Information über den Infektverlauf gewonnen werden.

Für HHV-7 wurden im wesentlichen ELISA-Verfahren zum Antikörpernachweis beschrieben, deren Antigene aus Viruskulturen gewonnen wurden. Hier ist insbesondere die Kreuzreaktivität mit anti-HHV-6 Antikörpern zu beachten, da die β -Herpesviren viele zelluläre Epitope teilen.^{46, 56} Die in dieser Arbeit verwendeten Testsysteme (BIOS, München, Deutschland)

zur Bestimmung der HHV-7 spezifischen IgG- und IgM-Titer beruhen ebenfalls auf dem Prinzip des ELISA.

Für einige Anwendung ist der Nachweis von Antigenen notwendig. Dazu werden spezifische HHV-7 Antikörper z. B. auf einen Objektträger fixiert. Nach Inkubation mit Probenmaterial (z. B. Zellüberstand aus Viruskulturen) bilden sich Immunkomplexe, die nach Markierung z. B. im IFT aufleuchten.

2.6.3 Nachweis des Virus-Genomes

Diese Verfahren weisen die Erreger-DNA direkt nach. Liegen genügend große Mengen an zu untersuchender DNA vor (z. B. nach Anreicherung in der Zellkultur), kann diese z. B. mit geeigneten Restriktionsenzymen verarbeitet und aufgrund typischer Fragmentmuster identifiziert werden (Restriktionsverdau). Sensitiver ist das Hybridisieren von markierten Sonden (z. B. markierte DNA-Einzelstränge) an Erreger-DNA beim Southernblot. Die höchste Sensitivität erreicht die PCR, die zunächst einen Teil der Erreger-DNA gezielt in kurzer Zeit amplifiziert und so mit einfachen Mitteln (z. B. Ethidiumbromidfärbung nach gelelektrischer Auftrennung) nachweisbar macht. Bei geeigneten Voraussetzungen können bis zu wenigen Virus-DNA-Kopien im Testansatz detektiert werden.^{57, 58, 86}

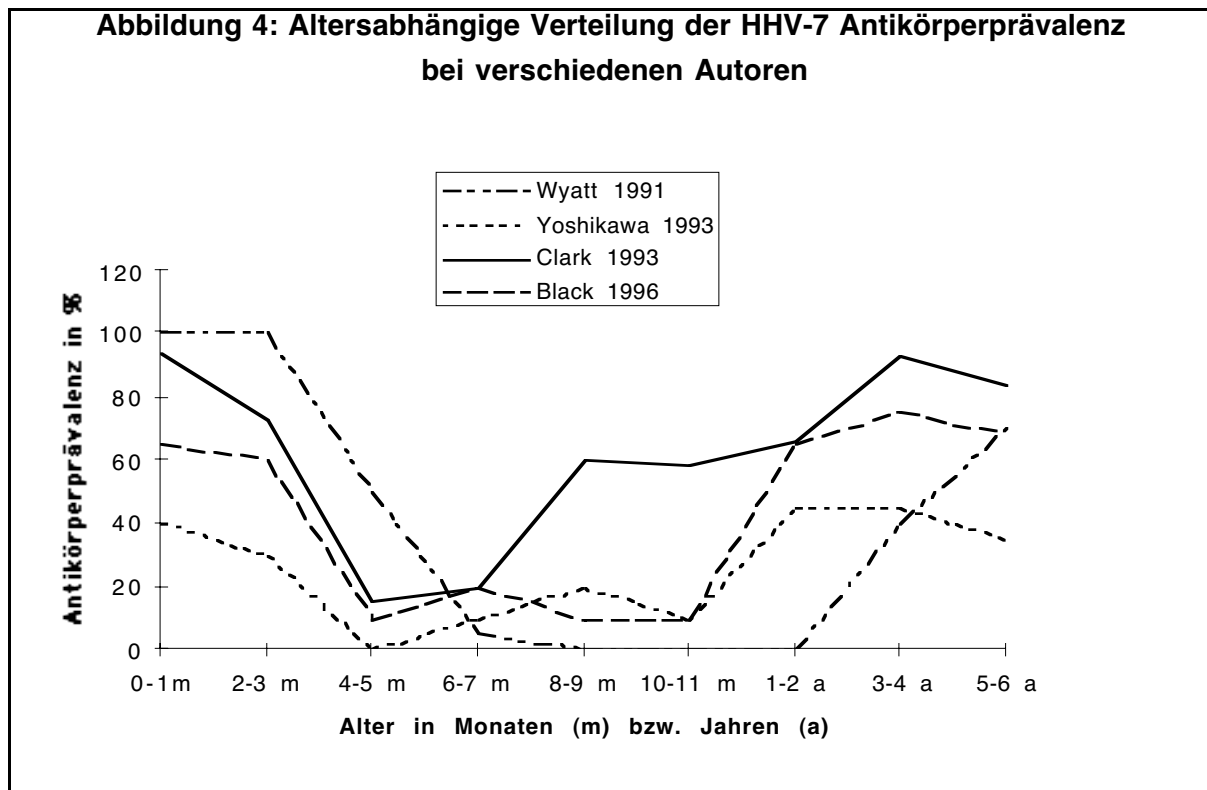
2.7 Epidemiologie des HHV-7

2.7.1 HHV-7 Seroprävalenz

Bei der Bestimmung der Seroprävalenz von HHV-7 Antikörpern im Blut gesunder Kinder und Erwachsener fand sich eine altersabhängige Verteilung. Die Seroprävalenz im Kindesalter wurde autorenabhängig in Abbildung 4 dargestellt. Alle Autoren verwendeten in ihren Studien Immunfluoreszenzassays zur Bestimmung der HHV-7 Antikörpertiter. Postnatal war eine hohe maternale HHV-7 Antikörperkonzentration festzustellen, die in den ersten Lebensmonaten absank. Im Vergleich der Autoren fällt ein großer zeitlicher Unterschied im Beginn des Wiederanstieges des Titers auf. Clark fand einen Anstieg der Antikörpertiter schon im Alter von etwa 7-8 Monaten. Möglicherweise wurden in dieser Untersuchung von Clark HHV-6 kreuzreagierende Antikörper verwendet. HHV-6 Antikörpertiter steigen ab einem Alter von etwa 6 Monaten.⁴⁵ Wyatt, Yoshikawa und Black bestimmen Antikörper gegen HHV-7 wieder im Alter von etwa einem Jahr ansteigend. Im Erwachsenenalter schwankt die Seroprävalenz von HHV-7 zwischen 80% und 100% (siehe Tabelle 2).^{46, 59, 60, 61, 62, 63}

2.7.2 HHV-7 DNA in Leukozyten des peripheren Blutes

Zwei Studien beschrieben den Nachweis von HHV-7 DNA aus Leukozyten des peripheren Blutes bei gesunden Erwachsenen zu 66% und 83%. In einer Studie durch Yalcin konnte mit einer PCR nur bei 19% (3/16) der untersuchten Patienten HHV-7 DNA in peripheren Blutleukozyten nachgewiesen werden. Bei allen 16 Patienten wurde HHV-7 jedoch



parallel mit der Viruskultur detektiert. Diese Diskrepanz könnte möglicherweise durch die Qualität der verwendeten PCR erklärbar sein (Siehe Tabelle 3).^{64, 65, 66}

2.7.3 HHV-7 in Speichel

Das Virus vermehrt sich in Speicheldrüsenepithelien und wird als infektiöses Viruspartikel in den Speichel abgegeben. Bei der Untersuchung von Speichel gesunder Erwachsener und Kinder auf HHV-7 fand man methodenabhängig sehr unterschiedliche Ergebnisse. Benutzt wurde die Co-Kultivierung des Speichels mit geeigneten Zellen (PBMC, CBMC) mit anschließendem Restriktionsverdau oder IFA Verfahren. Die Häufigkeit des HHV-7 Nachweises schwankte dabei zwischen 10% (5% bei Kindern) und 85%. Der HHV-7 DNA Nachweis mit der PCR wurde seit 1993 beschrieben und lieferte bisher positive Ergebnisse zwischen 55% und 96% (siehe Tabelle 4).^{47, 61, 62, 65, 66, 67, 68, 69}

2.7.4 HHV-7 in Liquor und Hirngewebe

Im Liquor wurde das Virus mit der PCR erstmals bei einer Routineuntersuchung bei einem zweijährigen Jungen mit vorbestehendem epileptischen Syndrom entdeckt.⁷⁰ Ein weiterer HHV-7 DNA Nachweis mit der PCR in Liquor- und Serumproben wurde bei einem 19 monatigen Mädchen mit Zeichen einer Enzephalopathie sowie in Zellpellets aus Liquor von Kindern mit dem klinischen Bild einer Meningitis beschrieben.^{5, 8} Im zellfreien Liquor wurde dabei

kein Virus detektiert. Desweiteren wurde HHV-7 DNA mittels PCR im neuronalen Gewebe von primären Hirntumoren nachgewiesen.⁴⁹

2.7.5 HHV-7 in anderen Geweben und Flüssigkeiten

Immunhistochemisch konnte ein HHV-7 spezifisches Tegument-Phosphoprotein (Grösse 85-kDa, pp85), kodiert durch das Gen U14, auf Lungenparenchymzellen, Epithelzellen der Haut und Brustdrüsengewebe nachgewiesen werden. In Leber-, Nieren- und Tonsillengewebe waren mit dieser Methode nur geringe Konzentrationen, in Colon, Milz und Gehirn dagegen keine pp85-exprimierende Zellen zu finden.⁷¹ Im Zervikalsekret schwangerer Frauen⁷², in Urin⁶⁵ und Haut⁷³ wurde das Virus mittels der PCR nachgewiesen.

Tabelle 2: Prävalenz von HHV-7 IgG im Serum gesunder Erwachsener

Untersucher	Material	Methode	Prävalenz
Wyatt et al. '91, USA ⁵⁹	Serum	IFA	92%
Clark et al. '92, UK ⁶⁰	Serum	IFA	96,60%
Bernemann et al. '92, USA ³⁴	Serum	IFA	82%
Rojo et al. '95, Mexiko ⁶³	Serum	IFA	98,50%
Black et al. '96, USA, BRD ⁴⁶	Serum	IB	90%
Tanaka et al. '96, Japan ⁶²	Serum	IFA	89,30%

Tabelle 3: Prävalenz von HHV-7 DNA in Leukozyten gesunder Erwachsener

Untersucher	Methode	Prävalenz
Yalcin et al. '94, Türkei ⁶⁴	Viruskultur und IgG-IFA	100%
Yalcin et al. '94, Türkei ⁶⁴	PCR	19%
Wilborn et al. '95, BRD ⁶⁵	PCR	66%
Kidd et al. '96, UK ⁶⁶	PCR	83%

Tabelle 4: Prävalenz von HHV-7 DNA im Speichel gesunder Erwachsener

Untersucher	Methode	Prävalenz
Wyatt et al. '92, USA ⁴⁷	Co-Kult., Restr.	75%
Black et al '93, USA ⁶⁷	Co-Kult., Restr.	85%
Hidaka et al. '93, Japan ⁶⁸	Co-Kult., IFA	81%
Yoshikawa et al. '93, Japan ⁶¹	Co-Kult., Restr.	10% (5%)
Di Luca et al. '93, Italien ⁶⁹	PCR	55%
Wilborn et al. '95, BRD ⁶⁵	PCR	95%
Tanaka et al. '96, Japan ⁶²	PCR	89,30%
Kidd et al. '96, UK ⁶⁶	PCR	96%

Co-Kult.: Co-Kultivierung mit Restriktionsverdau (Restr.) bzw. Immuno fluorescence assay (IFA)

2.8 Klinische Aspekte

2.8.1 Infektionswege

In der Bevölkerung besteht eine sehr hohe HHV-7 Seroprävalenz (82-98,5%) (siehe Punkt 2.7.1). Die Primärinfektion findet meist in den ersten Lebensjahren statt. Ein Großteil der Kinder zeigt eine Serokonversion der HHV-7 Antikörper ab dem Alter von einem Jahr. Als Infektionswege bestehen folgende Möglichkeiten:

2.8.1.1 vertikale Infektion im Geburtskanal

Okuno konnte HHV-7 DNA im Zervikalsekret schwangerer Frauen nachweisen. Weder über perinatale Infektionen noch die Bedeutung und der Schutz der maternalen Antikörper unter der Geburt wurden Untersuchungen veröffentlicht.⁷²

2.8.1.2 Übertragung durch Muttermilch

Virusprotein und HHV-7 DNA konnte in Brustdrüsengewebe bzw. Muttermilch nachgewiesen werden.^{48, 74} Theoretisch ist eine perorale Virusübertragung beim Stillen möglich. Zwischen den HHV-7 spezifischen Antikörpertitern von gestillten und nicht gestillten Säuglingen bestand allerdings kein signifikanter Unterschied.⁷⁴ Ganz im Gegenteil zeigte Lanphear eine mögliche protektive Wirkung des Stillens als Schutz vor einer HHV-7 Infektion auf.⁷⁵ Ein Großteil der primären Infektionen findet im Alter von einem Jahr oder später statt, also zu einem Zeitpunkt, zu dem die meisten Kinder bereits abgestillt sind. Der Infektionsweg über die Muttermilch stellt wohl einen möglichen Weg der Virusübertragung dar, kann aber bisher nicht als Hauptinfektionsquelle gelten.

2.8.1.3 Übertragung durch Speichel

HHV-7 wird in relativ hoher Konzentration in infektiöser Form im Speichel ausgeschieden und könnte prinzipiell Tröpfcheninfektionen verursachen. Die Restriktionsmuster der HHV-7 DNA bei Mitgliedern einer Familie zeigten hohe Übereinstimmungen, so daß eine horizontale Infektion innerhalb der Familien über Speichel zu vermuten ist.⁷⁶ Ranger-Rogez sieht im Speichel den Hauptübertragungsweg von HHV-7.⁷⁷ Die tatsächliche Bedeutung der Tröpfcheninfektion ist jedoch nach wie vor unklar, da z. B. auch HIV in hoher Konzentration im Speichel ausgeschieden wird, eine Schmier- oder Tröpfcheninfektion mit HIV wohl aber eine sehr seltene Ausnahme darstellt.^{69, 78, 79, 80, 81}

2.8.1.4 Übertragung durch allogenes Blutprodukt oder Transplantation

Das Virus persistiert in einem Großteil der Bevölkerung in verschiedenen Geweben und Blutzellen. Nach Organtransplantationen bzw. Bluttransfusionen von einem HHV-7 positiven Spender zu einem HHV-7 negativem Empfänger kann das Virus theoretisch bei einer Reaktivierung zu einer Erkrankung führen. In einer Untersuchung von Yalcin wurde jedoch bei Patienten nach Nierentransplantation unter Immunsuppression keine signifikante Häufung von HHV-7 im Blut dieser Patienten nachgewiesen.⁶⁴

2.8.2 mögliche Erkrankungen durch HHV-7

Seit der Entdeckung von HHV-7 in aktivierten T-Zellen eines gesunden Mannes im Jahre 1990 wurde das Virus mit verschiedenen Erkrankungen ursächlich in Verbindung gebracht.

2.8.2.1 Erkrankungen ohne neurologische Komplikationen

Durch serologische Untersuchungen erkannte man HHV-7 als möglicher Verursacher von unspezifischen fieberhaften Erkrankungen mit und ohne Exanthem.⁴ Wie HHV-6 scheint auch HHV-7 das sog. Dreitagefieber (Exanthema subitum, ES) verursachen zu können.^{9, 82, 83} In Serumproben von Patienten mit klinische Anzeichen einer chronischen EBV-Infektion wurden HHV-7 spezifische Antikörper alleine oder zusammen mit EBV-Antikörpern gefunden. Auch hier wurde ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Erkrankung und dem Vorliegen einer HHV-7 Infektion diskutiert.^{10, 84} Wegen des DNA-Nachweis von HHV-7 in Haut, Serum und PBMC bei Patienten mit Pytiriasis rosea wurde HHV-7 auch als Erreger dieser Erkrankung in Betracht gezogen.⁸⁵

2.8.2.2 Erkrankungen mit neurologischen Komplikationen

Einige Autoren bringen das Virus mit parallel zu fieberhaften Erkrankungen auftretenden neurologischen Erscheinungen in Verbindung, wie z. B. Infektkrämpfen und temporären Halbseitenlähmungen.^{6, 9, 70} Yoshikawa konnte HHV-7 DNA mit der PCR in Liquorzellen von Kindern mit klinischen und laborchemischen Zeichen einer Meningitis nachweisen.⁸ Takasaki beschrieb einen Anstieg von HHV-7 spezifischen Antikörpern im Blut eines erwachsenen

Patienten mit einer zentralen Fazialisparese. Eine ursächliche Verbindung mit der Erkrankung wurde zurückhaltend diskutiert aber als eine Möglichkeit der Ursache offen gehalten.⁷ Bei einem zweijährigen Jungen mit vorbestehendem epileptischen Syndrom wurde HHV-7 DNA mit der PCR in einer nicht entzündlich veränderten Liquorprobe nachgewiesen. Krankheitsverlauf und Untersuchungsergebnisse lassen auf einen Zufallsbefund schließen und stellen keinen Zusammenhang zwischen dem Liquorbefund und der Grunderkrankung her.⁵

3 Material und Methoden

3.1 Patienten und Proben

Für diese Arbeit wurden Liquorproben pädiatrischer Patienten aus den Jahren 1994 bis 1997 im Dr. von Hauner'schen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München und zwischen Oktober 1994 und Juni 1996 im Childrens Hospital, Division of Infectious Diseases, Boston, MA, USA, gesammelt und retrospektiv auf das Vorhandensein von HHV-7-DNA untersucht.

Ausgenommen wurden Patienten, deren Liquorproben makroskopisch trübe oder verunreinigt waren, in zu geringer Menge vorlagen (<200 μ l) oder neurologisch chronisch kranke Patienten. Bei bereits bekannter ZNS-Infektion wurde der Patient ebenfalls ausgeschlossen.

In die Studiengruppe wurden Patienten aufgenommen, die einen umschriebenen neurologischen Ausfall oder Erkrankung zeigten. Sie wurde in drei Gruppen eingeteilt:

3.1.1 Gruppe I: ZNS-Erkrankungen mit entzündlichen Liquorveränderungen

Patienten mit Erhöhung der Liquor-Zellzahl über 5 Zellen/ μ l und/oder Liquor-Eiweißwerte über 50mg/dl wurden in diese Gruppe eingeteilt.

Die Gruppe bestand aus 24 Patienten, 15 männlich, 9 weiblich. Das Patientenalter reichte von 3 Monaten bis 17 Jahre (Durchschnittsalter 6,17 Jahre). Die Diagnosen der Patienten dieser Gruppe waren wie folgt verteilt: aseptische Meningitis (n=9), virale Enzephalitis (n=8), akut demyelinisierende Enzephalopathie (n=3), periphere entzündliche Neuropathie (n=1), Guillain-Barré-Syndrom (GBS) (n=3) (siehe Tabelle 17).

3.1.2 Gruppe II: Infektkrämpfe

Die Gruppe II umfaßte Patienten, die im Rahmen eines fieberhaften Infektes einen Infektkrampf erlitten. Andere Ursachen für einen Krampfanfall, wie Meningitis, Enzephalitis, zerebrale Raumforderungen, Durchblutungsstörungen oder Stoffwechselstörungen, wurden durch ein unauffälliges EEG, MRT bzw. klinisches Bild und Laboruntersuchungen ausgeschlossen.

Die Gruppe umfaßte 26 Patienten, davon 13 männlich und 13 weiblich. Das Durchschnittsalter lag bei 2,7 Jahren. Die Altersverteilung reichte von 1 Monat bis 9,8 Jahre. 2 Patienten waren jünger als 6 Monate, 4 Patienten älter als 5 Jahre. 17 Patienten hatten ihren ersten, unkomplizierten, 2 ihren zweiten, unkomplizierten Infektkrampf. Bei 5 Patienten verlief der erste, bei 2 der zweite Infektkrampf kompliziert.

Die Temperaturangaben beim Krampfgeschehen waren unvollständig. Der Mittelwert der vorliegenden Werte (n=22) lag bei 39,4°C mit einer Standardabweichung von 0,7°C, einem niedrigsten Wert von 38,1°C und höchstem Wert von 40,4°C. Bis auf 2 Patienten war bei Aufnahme kein meningeales Zeichen festzustellen. Die angegebene Dauer des Anfalls be-

trug meist unter fünf Minuten, bei drei Patienten ca. zehn Minuten, einmal 20 und einmal 30 Minuten. Werte für das CRP bei Aufnahme waren bei 17 Patienten erhöht, jedoch nur viermal über 5mg/dl. Der Wert der Liquorglukosekonzentration lag immer bei 50% der Serumglukose oder höher. Werte für die Konzentration des Liquoreiweiß waren immer unter 50,0mg/dl. Die Anzahl der Leukozyten im Liquor war bis auf eine Ausnahme ($5/\mu\text{l}$) immer unter $3/\mu\text{l}$ (siehe Tabelle 18).

3.1.3 Gruppe III: neurologische Erkrankungen ohne inflammatorische Liquorveränderungen
Diese Gruppe beinhaltete Patienten, die eine neurologische Erkrankung ohne infektiöse oder entzündliche Liquorveränderung hatten.

10 männliche und 7 weibliche Patienten bildeten diese Gruppe. Der jüngste Patient war bei Liquorentnahme 1 Monat, der älteste 14,5 Jahre alt (Durchschnittsalter 4,49 Jahre). Die Diagnosen der Patienten dieser Gruppe waren sehr heterogen: Ausfälle von einzelnen oder mehreren Hirnnervenfunktionen (n=7), Neuropathie bei V.a. Guillain-Barré-Syndrom (n=1), Halbseitenlähmung (n=1), Krampfanfall (n=5), Migraine accompagnée (n=1), Konversionsyndrom (n=2), zerebrale Ischämie (n=2) (siehe Tabelle 19).

Die Kontrollgruppe bestand aus zwei Untergruppen:

3.1.4 Gruppe IV: systemische Entzündungen ohne Erkrankung des ZNS

Hier wurden Patienten zusammengefaßt, die im Rahmen von entzündlichen oder infektiösen Erkrankungen außerhalb des ZNS (z.B. Gastroenteritis) eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes erlitten. Die Liquorpunktion wurde zum Ausschluß einer Meningitis oder Enzephalitis durchgeführt.

Diese Gruppe umfaßte 26 Patienten, 12 männliche und 14 weibliche. Der Altersmittelwert lag bei 3,95 Jahren. 15 Patienten waren im ersten und zweiten Lebensjahr. Das Alter der übrigen 11 Patienten war gleichmäßig bis zum 15. Lebensjahr verteilt. Jüngster und ältester Patient waren 1 Monat bzw. 14,5 Jahre alt. Die Diagnosen in dieser Gruppe waren Pneumonie (n=2), hochfieberhafter Viruserkrankung ohne Fokus (n=5), Gastroenteritis (n=5), Infekt der oberen Atemwege (URTI) (n=8), Stomatitis (n=1), Harnwegsinfekt (n=1), Lyme-Borreliose Stadium I (n=2), konnatale CMV-Infektion (n=1) und akute EBV-Infektion (n=1) (siehe Tabelle 20).

3.1.5 Gruppe V: nichtentzündliche Erkrankungen ohne ZNS-Beteiligung

Patienten mit z. B. Allgemeinzustandsverschlechterung ohne Vorliegen eines Infektionszeichens wurden zum Ausschluß einer ZNS-Infektion liquorpunktiert.

Sieben Jungen und vier Mädchen bildeten diese Gruppe mit sehr unterschiedlichen Diagnosen. Der Altersdurchschnitt lag bei 6,7 Jahren. Diagnosen der Patienten dieser Gruppe umfaßten rheumatische Erkrankung (n=1), muskuläre Hypotonie (n=1), Konversionssyn-

drom (n=2), klassische Galaktosämie (n=1), Migräne (n=2), frontaler Kopfschmerz (n=1), Verlaufskontrolle bei Z. n. perinataler Asphyxie (n=1), Uveitis intermedia (n=1). Ein klinisch unauffälliges Neugeborenes wurde zum Ausschluß einer konnatalen Tuberkuloseinfektion bei akuter Erkrankung der Mutter liquorpunktiert (n=1) (siehe Tabelle 21).

3.2 durchgeführte Diagnostik

3.2.1 Probengewinnung und primäre Probenbehandlung

Nach der Gewinnung von Blut und Liquor in üblicher Weise (Venenpunktion bzw. Lumbalpunktion) wurde ein Aliquot des Liquors für die virologische Untersuchung bei -80°C eingefroren und so bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Ein Teil der Serumproben wurden für die üblicherweise durchgeführten Untersuchungen benutzt, die restliche Probe bei -20°C gelagert.

3.2.2 Routinediagnostik

Das parallel zur Liquorpunktion abgenommene Blut wurde u. a. bezüglich des Blutbildes und Differentialblutbildes, der Konzentration des CRP, des Eiweißgehaltes, der Blutglukose und der Elektrolyte untersucht. Im Liquor wurde Zellzahl und ggf. Zellart, Konzentration des Eiweiß und der Glukose bestimmt. Zum Ausschluß einer bakteriellen oder mykotischen Genese wurden Blutkulturen, Liquorkulturen sowie teilweise auch Urin- und Stuhlkulturen angelegt. Weiterhin wurde von Liquor- und Blutproben serologische Untersuchungen zum Nachweis der häufigsten viralen und bakteriellen Erreger durchgeführt. Diese umfaßten ELISA (IgG und IgM) sowie Latex-Agglutinationsverfahren zum Nachweis von HSV, CMV, EBV, VZV, Enteroviren, Parvo B19, Pneumokokken, Meningokokken, *Hämophilus Pneumoniae* sowie *Borrelia Burgdorferi*. Bei verdächtigem klinischem Verlauf oder Liquorwerten wurde mit der PCR-Methode eine HSV-Enzephalitis ausgeschlossen.

3.2.3 PCR zum direkten Virusgenomnachweis

Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde von K. Mullis 1985 entwickelt und in die Mikrobiologie eingeführt. Mit dieser revolutionären Technik lassen sich DNA und RNA in kleinsten Mengen direkt nachweisen. Das Grundprinzip sei hier nochmals kurz anhand der DNA-PCR erläutert.⁸⁶

Ein Paar spezifisch synthetisierter Oligonukleotide, die „Primer“, grenzen die Zielsequenz, ein bekanntes Stück der zu suchenden DNA, ein. Durch Temperaturerhöhung auf über 92°C wird die gesuchte doppelsträngige DNA (dsDNA) in Einzelstränge getrennt („Denaturierung“). Ein Primer des Paares hybridisiert stromaufwärts der Ziel-DNA an einen Strang der dsDNA, der andere Primer stromabwärts an den komplementären Strang („Annealing“). Durch eine DNA-Polymerase werden bei geeigneter Temperatur dNTPs aus der Reaktionslösung an die Primer in 5'-3'-Richtung entlang der Ziel-DNA synthetisiert und erzeugen

Kopien der Ziel-DNA („Synthese“). Die erzeugten Kopien der Ziel-DNA dienen ihrerseits wieder als Vorlagen für die Taq-Polymerase im nächsten Zyklus. Durch zyklisches Wiederholen dieses Vorganges, je nach Anwendungsziel ca. 20-50 mal, kann die Ziel-DNA bis zu millionenfach vervielfältigt werden, bis die Masse der amplifizierten DNA groß genug für die Detektion mit herkömmlichen Mitteln ist, wie z. B. die Gelelektrophorese. Zur Detektion von HHV-7 DNA im Liquor wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Abwandlung dieses Prinzips etabliert. Diese wird unten genauer beschrieben.

3.2.4 Serologische Untersuchung der HHV-7 DNA positiven Patienten

Serumproben der Patienten, in deren Liquor HHV-7 DNA mit der beschriebenen PCR gefunden werden konnte, wurden entsprechend den Herstellerangaben einem kommerziellen ELISA (BIOS, Gräfelfing/München) unterzogen und die Titer für HHV-7 spezifische IgM- und IgG-Antikörper gemessen.

3.3 Probenvorbereitung und DNA-Präparation für die PCR

Die Präparation der gesuchten HHV-7 DNA aus den Liquorproben erfolgte mit einem kommerziellen System nach Angaben des Herstellers („QIAmp Blood Kit“, Qiagen, Hilden). Damit wurden die DNA umschließende Proteinstrukturen lysiert, entfernt und somit für die Detektion durch die PCR zugänglich gemacht. Mögliche Inhibitoren der PCR wie Hämoglobin oder Bilirubin wurden ebenfalls entfernt. Desweiteren konnte die DNA in den Puffer AE („QIAmp Blood Kit“, Qiagen, Hilden) aufgenommen werden, ein Medium, das sowohl für die Auswertung in der PCR optimiert ist aber auch eine lange Lagerungsstabilität der DNA garantiert. Durch geeignete Wahl der Präparationsparameter konnte ein Konzentrierungseffekt der DNA im Endmaterial erzielt werden. Die an die Silicatgelsäulen gebundene Ziel-DNA wurde nach der Reinigung statt der üblichen 200µl mit nur 50µl Puffer AE eluiert. Laut Herstellerangaben entsteht dadurch ein absoluter Verlust an DNA-Material von ca. 14%. Demgegenüber steht die etwa um den Faktor vier höhere Konzentration der DNA im Eluat (siehe Punkt 5.1.4).

Zur Steigerung der Effektivität der DNA-Präparation wurde den Liquor-Proben Hintergrund-DNA (Poly-T und Poly-A-Ketten unterschiedlicher Länge, Boehringer-Mannheim) in einer Konzentration von 25µg/ml gegeben. Die Hintergrund-DNA sättigte unspezifische Bindungen der Virus-DNA z. B. an Kunststoffoberfläche von Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße ab, wodurch der Verlust an Virus-DNA sank (siehe Abbildung 9).

3.4 Optimierung der PCR

3.4.1 Plasmid-DNA

Für die Entwicklung und Durchführung dieser PCR stand ein Plasmid mit HHV-7 DNA zur Verfügung. Mit Hilfe der Plasmid DNA konnte die Sensitivität der PCR abgeschätzt werden. Desweiteren diente sie als Positivkontrolle in sämtlichen PCR-Läufen.

3.4.1.1 *Der Vector*

Verwendet wurde das DNA-Plasmid Klon pH7SB-268, CDC, Atlanta, Georgia, USA. Dieses wurde freundlicherweise von Dr. G. Jäger, Max-von-Pettenkofer-Institut, LMU München, überlassen. Der Vektor ist ein Bluescript KS II (+) Plasmid mit 2961 bp Größe. In die HindIII Schnittstelle des Lac-Operons wurde HindIII verdaute HHV-7-DNA integriert und in DH10B-Zellen (GIBCO/BRL) kloniert. Der „Origin of Replication“ (ORI) des verwendeten pBluescript Vector ist vom Typ pMB1, der hohe Plasmidzahlen von etwa 300-500/Zelle zuläßt.⁶⁷

3.4.1.2 *Das Insert*

Die integrierte Virus-DNA hat eine Länge von ca. 3600bp und entstammt der Sequenz des Gens „U23“. Gegenüber dem Stamm HHV-7 RK mit 3603bp Länge fehlt beim Stamm HHV-7 JI eine Thymidinbase an Stelle 2952 des integrierten DNA-Stückes. Diese Depletion liegt außerhalb der Ziel-DNA der PCR und hat damit keinen Einfluß auf die PCR. Über die Gensequenz des Stammes HHV-7 SB in diesem Bereich liegt wenig Literatur vor. Man kann jedoch von nur minimalen Differenzen ausgehen. Die Bestimmung der Plasmidkonzentration (siehe unten) wird durch minimale Differenzen nicht beeinträchtigt.^{37, 38, 39}

3.4.1.3 *Klonierung des Plasmides*

Um eine genügend große Mengen des Plasmides für die Arbeit mit der PCR zur Verfügung zu haben, wurde es erneut in E. Coli kloniert und die Plasmid-DNA gereinigt. Das Plasmid enthält zur Selektion der erfolgreich transfizierten Bakterien Gensequenzen zur Resistenzentwicklung gegen Ampicillin.

E. Coli des Stammes MC 1061 (Boehringer-Mannheim) wurden in sterilem Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, Boehringer-Mannheim) über Nacht bei 37,0 °C bis zur Sättigung der Lösung vermehrt und in der log-Phase der Vermehrung durch Zusatz von 0,1M CaCl₂ und Wärmebehandlung (45°C für 90 Sekunden) kompetent gemacht, d. h. zur leichteren Aufnahme des Plasmides befähigt. Ca. 0,1µg der HHV-7 Plasmid-DNA wurden den so vorbereiteten Bakterien beigemischt und unter 37°C und ständigem Schütteln zusammen für etwa eine Stunde inkubiert. Die Kontrolle der erfolgreichen Transfektion erfolgte durch Ausplattieren der Bakterien auf eine LB-Platte (LB-Medium) mit Ampicillin (100mg/l) und Inkubation bei

37,0°C. Auf dem Selektivmedium wachsende Kolonien haben das Plasmid aufgenommen und dadurch Resistenz gegen Ampicillin erhalten.

Abstriche von vier dieser Kolonien wurden in 20ml LB/Ampicillin-Medium aufgenommen, bis zur Sättigung der Lösung am Ende der log-Phase bei 37°C inkubiert und bis zur Plasmidreinigung getrennt weiterverarbeitet. Je 1ml der Bakterienkulturen wurden mit Glycerin versetzt (Mischungsverhältnis Bakterienkultur : Glycerin = 1 : 40) und für eine spätere Verwendung bei -80°C eingefroren.

Mittels eines kommerziellen Testsystemes (Qiamp PlasmidKid, Qiagen, Hilden) wurden 2ml jeder der vier erhaltenen Bakterienkulturen entsprechend den Herstellerangaben weiterverarbeitet und die Plasmid-DNA über eine Säulenreinigung gewonnen. Zur weiteren Verarbeitung wurde die in Aqua bidest gelöste DNA bei -20°C aufbewahrt.

Die vier vorliegenden Plasmid-DNA-Lösungen wurden photometrisch auf DNA Gehalt und Reinheit gemessen. Das erhaltene Produkt der Plasmid-DNA-Aufbereitung wurde sequenziert und so die spezifische Amplifikation der gewünschten Plasmid-DNA nachgewiesen. Abbildung 5 zeigt schematisiert das amplifizierte Plasmid.

Die photometrische Bestimmung der DNA Konzentration und Reinheit jeder der vier DNA-Lösungen ergaben in einer 1:10 Verdünnung folgende Werte für die Optische Dichte bei 260nm und 280nm (OD_{260} bzw. OD_{280} , jeweils Doppelbestimmung) und den Quotient OD_{260}/OD_{280} sowie OD_{280}/OD_{260} (siehe Tabelle 5). Für doppelsträngige DNA (dsDNA) gilt bei einer gemessenen OD_{260} von 1 eine DNA-Konzentration (c) von $50\mu\text{g/ml}$.⁸⁷

$$c_{\text{dsDNA}} = OD_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Tabelle 5: OD-Werte für die Plasmidlösungen Nr. 1-4

Probe Nr.	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}	OD_{280}/OD_{260}	[DNA] in ng/ μl Stammlösung	[DNA] in ng/ μl Mittelwerte
1	0,136	0,08	1,7011	0,5879	67,85	68,63
	0,139	0,082	1,6932	0,5906	69,4	
2	0,175	0,113	1,5473	0,6463	87,6	87,33
	0,174	0,112	1,5548	0,6432	87,05	
3	0,236	0,138	1,7086	0,5853	117,95	117,88
	0,236	0,138	1,713	0,5838	117,8	
4	0,18	0,106	1,7032	0,5871	90,1	90,25
	0,181	0,106	1,705	0,5865	90,4	

Die Werte für OD_{260}/OD_{280} bewegen sich zwischen 1,7 und 1,8, was für eine hohe Reinheit der DNA Proben und für gute Verwertbarkeit der OD_{260} spricht.

Die Länge des Plasmids beträgt 6564bp. Dies entspricht einer Masse von

$$m_{\text{dsDNA}} = 1,0541 \cdot 10^{-21} \text{ g/bp} \times 6564 \text{ bp} = 6,918 \cdot 10^{-18} \text{ g} = 6,918 \cdot 10^{-9} \text{ ng}$$

Aus der DNA Konzentration (c) und der Plasmidmasse (m) wird die Anzahl der Plasmide (n) in der Probe bestimmt:

$$n = c/m$$

Für die Plasmidlösungen Nr. 1-4 ergeben sich daraus folgende Werte für Plasmid-Kopien/ μ l:

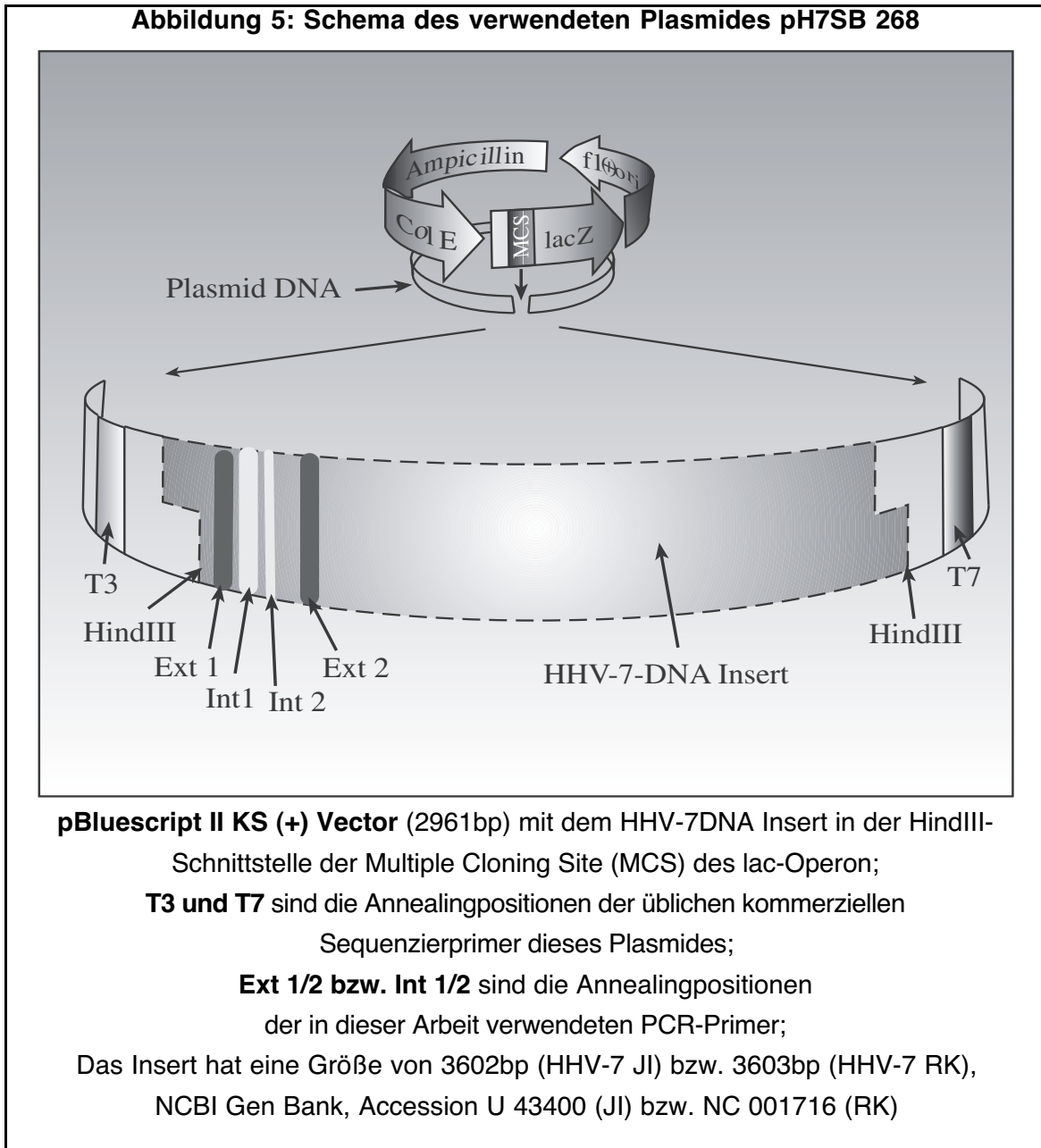
Nr. 1: $1,0 \cdot 10^{10}/\mu$ l

Nr. 2: $1,3 \cdot 10^{10}/\mu$ l

Nr. 3: $1,7 \cdot 10^{10}/\mu$ l

Nr. 4: $1,3 \cdot 10^{10}/\mu$ l

In den vier verschiedenen Plasmidlösungen betrug die Konzentration an HHV-7-Plasmid DNA zwischen 1 und $2 \cdot 10^{10}$ Kopien/ μ l. Zur Bestimmung der Sensitivität der PCR wurden von diesen Lösungen logarhythmische Verdünnungsreihen in bidestilliertem Wasser und Puffer AE hergestellt und bis zur Verwendung in der PCR bei -20°C aufbewahrt.

Abbildung 5: Schema des verwendeten Plasmides pH7SB 268

3.4.2 Ziel-DNA

Als Ziel-DNA der PCR wurde ein Bereich des Gen „U23“, kodierend für ein Glykoprotein, ausgewählt. Es zeigt nur geringe Variabilität einzelner Basenpaare innerhalb der verschiedenen HHV-7 Stämme und hat nur minimale Übereinstimmung mit entsprechenden Gensequenzen der anderen humanpathogenen Herpesviren (siehe Punkt 2.3.2). Die Auswahl der

Primer in diesem Genombereich war für die in dieser Anwendung wichtigen Bedingungen, wie z. B. höchstmögliche Sensitivität, gut möglich (siehe Punkt 3.4.3).

3.4.3 Primer

Die PCR wurde als „nested-PCR“ (nPCR) angelegt. Die Primer (MWG biotech AG, München/Ebersberg,) des ersten Laufes waren 25 bzw. 26 bp lang und amplifizierten eine HHV-7 spezifische DNA-Sequenz von 755 bp, die des 2. Laufes (Booster-Lauf) waren jeweils 18bp lang, ihr Amplifikat 478bp (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7). Durch die Länge des Paares des 1. Laufes von 25 bzw. 26bp ist hier eine große Affinität zur Ziel-DNA und damit hohe Spezifität zu erwarten. Bei der Auswahl der Primer wurde auf eine möglichst ausgeglichene Basenzusammensetzung bezüglich des GC-Gehaltes geachtet (GC-Gehalt von etwa 50%), um die Schmelztemperatur T_m innerhalb der Primerpaare gleich zu halten. Die Schmelztemperaturen T_m wurde nach dem „Prinzip des nächsten Nachbarn“ berechnet.^{88, 89, 90} Die Annealingtemperatur T_{an} wurde etwa 5°C unterhalb der errechneten T_m angesetzt und dann empirisch optimiert.

Besonderes Augenmerk wurde auf die 3'-Enden der Primer gerichtet. Hoher GC-Gehalt an diesen Enden sorgt für eine gute Anbindung an die Ziel-DNA und sichert so eine hohe Aktivität der DNA abhängigen Taq-Polymerase. Um ein Aneinanderlagern der Primer („Primer-Dimer“) zu vermeiden, sollen insbesondere die 3'-Enden nicht komplementär sein. Innerhalb eines Primer können längere komplementäre Sequenzen zu sog. komplementären Rückfaltungen („Hairpinning“) führen und wurden deshalb ebenso vermieden.

Tabelle 6: verwendete Primer

In Klammern sind die thermodynamisch berechneten Schmelztemperaturen T_m angegeben. Position 29548 bis 30302 der HHV-7-DNA-Sequenz; Gen „U23“, nach NCBI™;

Externe Primer Produkt 755bp:

Extern-1: 5'-TTGAC GACTG AACGT CACAG TTACG-3' (25-mer; 58,0°C)

Extern-2: 5'-CACAT CAGAT ACAGA GAGTA CGAGC G-3' (26-mer; 56,2°C)

Interne Primer Produkt 478bp:

Intern-1: 5'-TTGTG CTGGT CTGAT TCC-3 (18-mer; 45,6°C)

Intern-2: 5'-AAGAC CTCGA CATT C-3' (18-mer; 42,8°C)

Tabelle 7: Übersicht über die Ziel-DNA der PCR (HHV-7 J1)

Positionen der verwendeten Primer (**Externe Primer** und **Interne Primer**)

und der Schnittstellen der Enzyme **Sau 3A** (!GATC) und **Ila I** (GC!NGC), nach NCBI™:

```

29521 AGAAAGCTTT TATTTCTTAA TATAATTTG ACGACTGAAC GTCACAGTTA CGCCCATTTT
29581 ACGGTGATAA ACGTTAGGGG TTCGCAAAA ATGTGTGCAT T!GATC!TTTCT GTGATGACAC
29641 AGTGGTTAGC AAAGCACATC TAACATAATA AGICTGTTTT TCTCAGTCAT AGGATTCCAC
29701 AACAGGATAA GACATTTGTG CTGGTCTGAT TCC!TAATTAC ATGAGCTGTA TTTACGCCAG
29761 AATTTTGTTC ATTTCCTTTA ATTACCCTCA AAAAATGAAA ACATTGATGA AACATACTTC
29821 CCAGTGAAC GCTTTCAACG GA!GATC!ATGC GTTGATGGTA GATAAAACAC AACAAAGGAGA
29881 ACTTTGCCCA AAAAAACATT TATTAATCCC AGACACCAAT AAAGGCTTGG TTATTGTAIG
29941 CATTTTTCGG TTTCTTAGAA TGGTTGCGTT TGGGGTTTTT AATTAGTAAA ACTAACAAAG
30001 CTAACGCTAC AATACCAATA AAATAACTG C!TGC!AATTAA AATCACAAGG AACAAAACGA
30061 ACTTTTTTTAA AGGGCTATTC AAAAGTTGAG GTTTTGTCAG TTCTGGAGTT GAAATTGTCA
30121 GTGTGAAAAA TTCAGATGCA TTCCCACTGT TTTCATGATT AGTAGTACTG CCACTGGAGA
30181 ATGTCGAGGT CTT!TGTAATA TTTAAGGATG TAGATTGCAC ATTCTCTTTA GTTGTTCGGA
30241 TAGTCGTAGG TATACTCATA GACACAGACA TTAATCGCT CGTACTCTCT GTATCTGATG
30301 TGATTGACGT GGAACATAAA TCTGAAGTTC TTGACATTC CAGAGTGGGC GTACTAGAAA

```

3.4.4 DNA-Polymerase

Das verwendete Enzym („Taq Polymerase Gold“, Perkin Elmer) wird in inaktiver Form geliefert. Es erhält ihre Aktivität erst durch Erwärmung auf 92° bis 96°C für etwa 10-12 Minuten. Dadurch bietet sie die Möglichkeit zu weiteren Verbesserungen der PCR: Die Reaktionsansätze (Mastermix) können voraus angesetzt und über längere Zeit auch bei Raumtemperatur für die PCR-Läufe vorbereitet und aufbewahrt werden. Beim Beginn der PCR wird das Enzym in allen Reaktionsgefäßen gleichzeitig erhitzt und aktiviert. Es entstehen gleiche Reaktionsbedingungen in allen Proben (Hotstart-PCR). Die Aktivierung des Enzyms kann auf zwei verschiedene Arten geschehen. Bei einem Vorinkubationsschritt vor den PCR Zyklen (z. B. 10 min 95°C) kann das Enzym komplett aktiviert werden und stellt so seine ganze Aktivität schon bei den ersten Zyklen zur Verfügung. Nach etwa 30 Zyklen ist mit nur noch sehr geringer Taq-Aktivität zu rechnen, da durch die zyklischen Erwärmungsphasen über 92°C das Enzym langsam auch wieder inaktiviert wird. Ohne den vorgeschalteten Aktivierungsschritt wird nur ein Teil der Enzymaktivität bei jedem Denaturierungsschritt des PCR-Zyklus (jeweils 20 sec. 95°C) freigesetzt. Die Aktivität erreicht dabei nicht die Spitzenwerte wie mit Vorinkubation, jedoch bleibt auch nach über 45 Zyklen noch eine deutliche Aktivität erhalten (time-release-PCR).

In dieser Anwendung wurde eine hohe Aktivität der Polymerase in der Anfangsphase benötigt. Nur so konnte die hohe Sensitivität der Anwendung erzielt werden. Deshalb wurde ein Aktivierungsschritt von 8 Minuten bei 95°C vor den folgenden 45 Zyklen im ersten bzw. 35 Zyklen im zweiten Lauf vorgeschaltet (siehe Tabelle 9).

3.4.5 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

Nur bei einer optimalen Abstimmung der Reaktionsbedingungen kann die Polymerase optimale Ergebnisse liefern. Die Konzentration der Primer sollte nach Herstellerangaben für jeden Lauf zwischen 0,2 und 0,5µM liegen, dabei aber so niedrig wie möglich sein. Sie wurde ebenso wie die Konzentrationen von MgCl₂ und dNTPs sowie die Zyklus-Bedingungen (Dauer und Temperatur der verschiedenen Schritte, Zyklenanzahl, Vor- und Nachbehandlung) für beide PCR-Läufe getrennt empirisch ermittelt (siehe Tabelle 8 und Abbildung 9).

Tabelle 8: Reaktionsansätze der PCR

	Primer*	dNTPs*	MgCl ₂ 1./2. Lauf	Polymerase*
empfohlener Bereich**	0,1-1,0µM	0,1-0,4mM	1,0-6,0mM	2,5U/Ansatz
etablierter Wert	0,2µM	0,2mM	4,0mM/3,0mM	2,5U/Ansatz

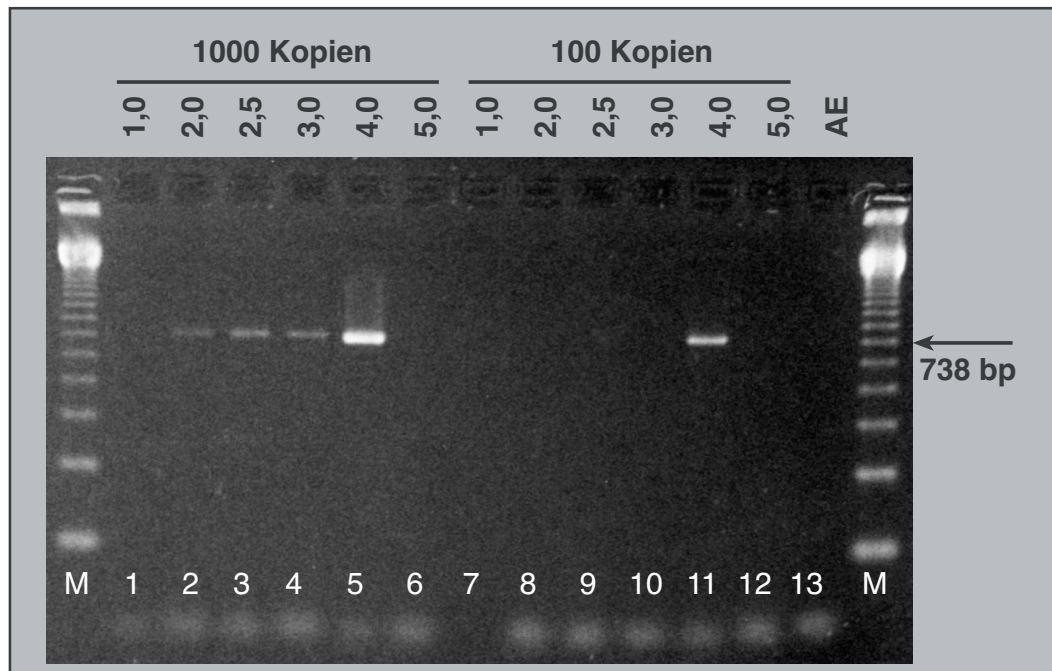
*) gleiche Konzentration im 1. und 2. Lauf der nested PCR

***) Empfehlung von Perkin Elmer

Tabelle 9: Zyklus-Bedingungen

	1. Lauf		2. Lauf	
	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit
Vorbehandlung	94 °C	8 min	94 °C	8 min
Zyklen	40		35	
- Denaturierung	95 °C	20 sec	95 °C	20 sec
- Annealing	39 °C	20 sec	51 °C	20 sec
- Synthese	72 °C	40 sec	72 °C	40 sec
Nachbehandlung	72 °C	8 min	72 °C	8 min

Aus dem 1. Lauf wurden nur 0,5µl des PCR-Produktes in den 2. Lauf eingesetzt. Wurden größere Mengen, etwa 10µl, übertragen, entstanden im 2. Lauf durch die Substrate aus dem 1. Lauf unspezifische Banden ohne die Sensitivität der PCR insgesamt zu steigern.

Abbildung 6: Optimierung der Mg⁺⁺-Konzentration im ersten PCR-Lauf

Spuren 1-6: Plasmid 1000 Kopien/Ansatz, [Mg⁺⁺] von 1,0 bis 5,0mM
 Spur 7-12: Plasmid 100 Kopien/Ansatz, [Mg⁺⁺] von 1,0 bis 5,0mM
 Spur 13: Negativkontrolle mit Puffer AE
 Spuren M (Marker): 123bp-Längenstandard

Die Spuren 1-6 bzw. 8-13 zeigen jeweils eine aufsteigende Konzentrationsreihe für Mg⁺⁺ im ersten Lauf der nested-PCR.
 1000 DNA Kopien können hier bei Mg⁺⁺-Konzentrationen von 2,0mM bis 4,0mM mit einem Optimum bei 4,0mM detektiert werden. Für 100 DNA Kopien im Ansatz gelingt dies nur noch bei einer Mg⁺⁺-Konzentration von 4,0mM.

3.4.6 Auswertung der PCR-Ergebnisse

5µl des Amplifikat des 2. Laufes der PCR wurden zusammen mit 1µl Auftragspuffer in die Taschen eines 2%igen Agarosegels gegeben und bei einer Spannung von 5V/cm für 40 Minuten in 0,5x TBE-Puffer elektrophoretisch getrennt. Nach dieser Trennung wurde das Gel in einem mit Ethidium Bromid (0,5µg/ml) versetztem TBE-Puffer für 30 Minuten gefärbt, 5 Minuten in 0,5x TBE-Puffer entfärbt und anschließend unter UV-Licht ausgewertet und zur Dokumentation photographiert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des TBE-Laufpuffers (1l, 5x)

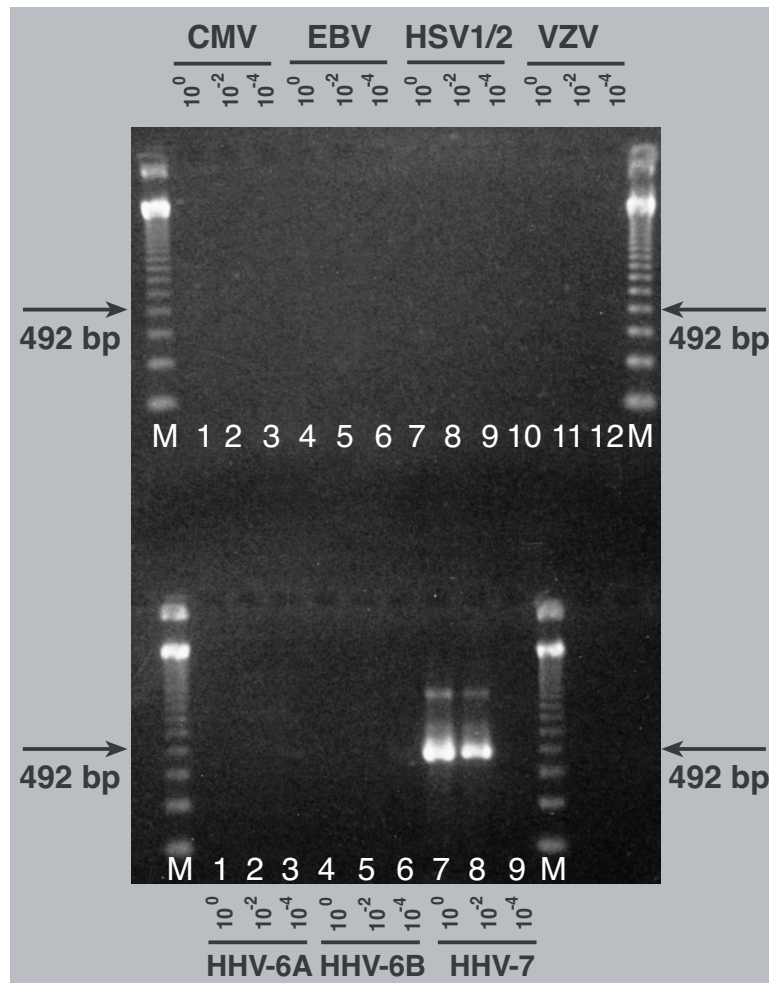
Tris	0,45M (54g/l)
Borsäure	0,45M (27,5g/l)
EDTA pH 8,0	0,01M (20ml 0,5M)

Tabelle 11: Zusammensetzung des Auftragspuffers (100ml, 6x)

Saccharose	40g
Bromphenolblau	0,25g

3.4.7 Nachweis der Spezifität der Methode

Um die HHV-7 spezifische Bindung der hier benutzten Primer (Ext 1/2 und Int 1/2) zu zeigen, wurde Virus-DNA anderer humanpathogener Herpesviren (HSV 1/2, VZV, EBV, CMV,

Abbildung 7: Spezifitätsnachweis der verwendeten Primer

Spuren oben: 1-3 (CMV), 4-6 (EBV), 7-9 (HSV1/2), analog dazu
Spuren unten: 1-3 (HHV-6A), 4-6 (HHV-6B) und 7-9 (HHV-7)

Einsatz präparierter DNA des jeweils bezeichneten Virus in die HHV-7 spezifische n PCR in den angegebenen Verdünnungsstufen der extrahierten DNA.
 Die absolute DNA-Menge in den Proben war nur für HHV-7 bekannt.
 Das DNA-Extraktionsverfahren aller Herpesviren war gleich.
 Ein positiver Nachweis gelang nur für HHV-7 bis zu einer Verdünnung der aufgeschlossenen DNA von ca. 100 DNA-Kopien im Testansatz (Verdünnung 10^{-2}), 1 DNA-Kopie im Ansatz konnte nicht mehr detektiert werden (Verdünnung 10^{-4}).

HHV-6A/B) der HHV-7 spezifischen PCR unterzogen. Die präparierte DNA dieser Viren wurde freundlicherweise von Frau Dr. G. Jäger, Max-von-Pettenkofer-Institut, LMU München, bereitgestellt. Nur mit HHV-7 DNA konnte ein PCR-Produkt in der Gelelektrophorese dargestellt werden (siehe Abbildung 7). Die übrigen Viren führten in unverdünnter sowie in verdünnter Form zu keiner Amplifikation.

Das entstandene PCR-Produkt bei Einsatz von HHV-7 DNA in die PCR wurde mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten. $1\mu\text{l}$ Restriktionsenzym Sau 3A bzw. Ita I (Boehringer Mannheim) $2,5\mu\text{l}$ des zugehörigen Puffers und $10\mu\text{l}$ PCR-Produkt wurden mit Aqua bidest auf $25\mu\text{l}$ Volumen aufgefüllt, vermengt, bei 37°C für 3 Stunden inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (2% Agarosegel, $5\text{V}/\text{cm}$ für 40 Minuten in $0,5\times$ TBE-Puffer). In der gelelektrophoretischen Auftrennung zeigten sich die erwarteten Banden. Anhand des Längenstandards ließen sich die Produkte des Restriktionsprozesses im Gel identifizieren und so die Spezifität der PCR nachweisen (siehe Abbildung 8).

3.4.8 Nachweis der Sensitivität der PCR

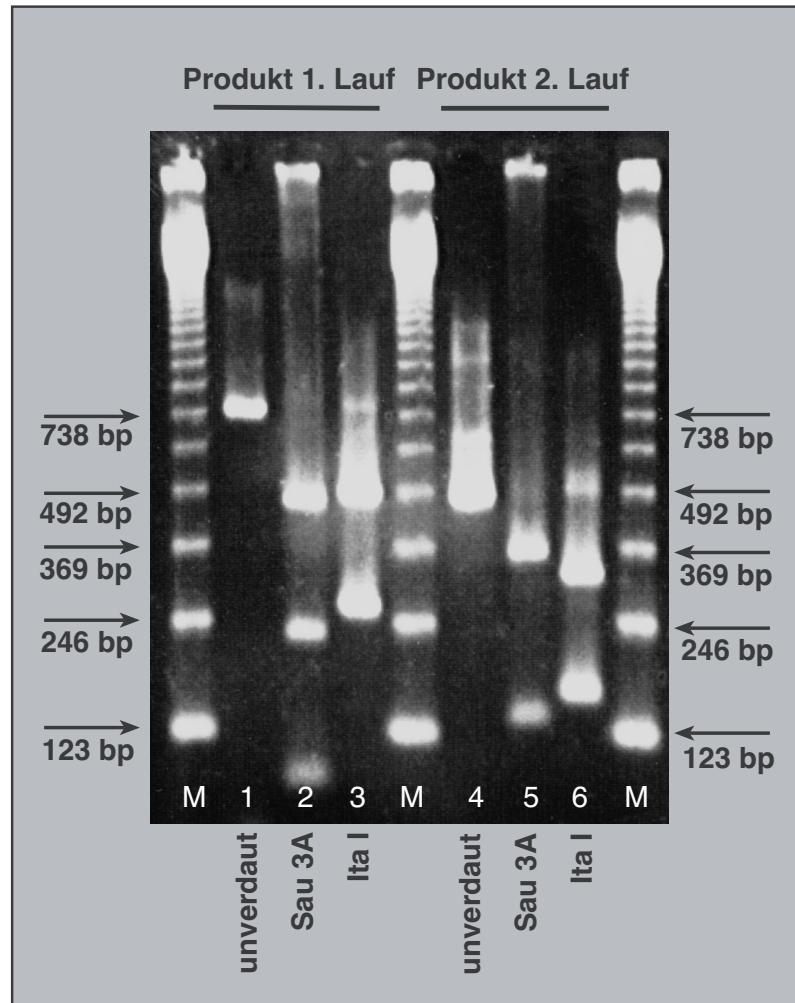
Die Sensitivität der nPCR wurde mit einer logarhythmischen Verdünnungsreihe der Plasmidlösungen gemessen (siehe Punkt 3.4.1.3). Jeder der beiden Läufe für sich detektierte unter besten Bedingungen (z. B. Zyklenzahl jeweils 55) sicher bis zu 100 DNA-Kopien im Testansatz (10 Kopien/ μl). Die Kombination beider Läufe in Form der nPCR detektiert sicher bis zu 10 Kopien im Ansatz (1 Kopie/ μl), steigert also die Sensitivität der Methode etwa um den Faktor 10. Dabei mußten beide Läufe nicht mehr optimale Bedingungen aufweisen, konnten also z.B. mit geringerer Zyklenzahl laufen. Das gesamte Testverfahren wurde dadurch stabiler und weniger anfällig gegenüber störenden äußeren Einflüssen.

Wie in Abbildung 9 zu sehen, spielten die DNA-Präparation (DP), Elution mit Puffer AE (AE) sowie die Verwendung der Hintergrund-DNA (hgDNA) eine große Rolle zur Steigerung der Sensitivität des Verfahrens:

Verschiedene Bestandteile des Liquor hemmen die PCR. Liegt die gleiche Plasmid-DNA Menge in Liquor und in Puffer AE gelöst vor, liegt die Sensitivität der PCR bei Puffer AE mindestens um den Faktor 10 höher (Vergleich der Spuren 1, 2 und 3 mit 4, 5 und 6).

Die Effizienz der DNA-Präparation kann durch Verwendung von Hintergrund-DNA ebenfalls deutlich gesteigert werden. Unspezifische Bindungen der Ziel-DNA werden durch die Hintergrund-DNA abgesättigt, die Ziel-DNA bleibt vermehrt in Lösung (Vergleich der Spuren 7, 8 und 9 mit 10, 11 und 12).

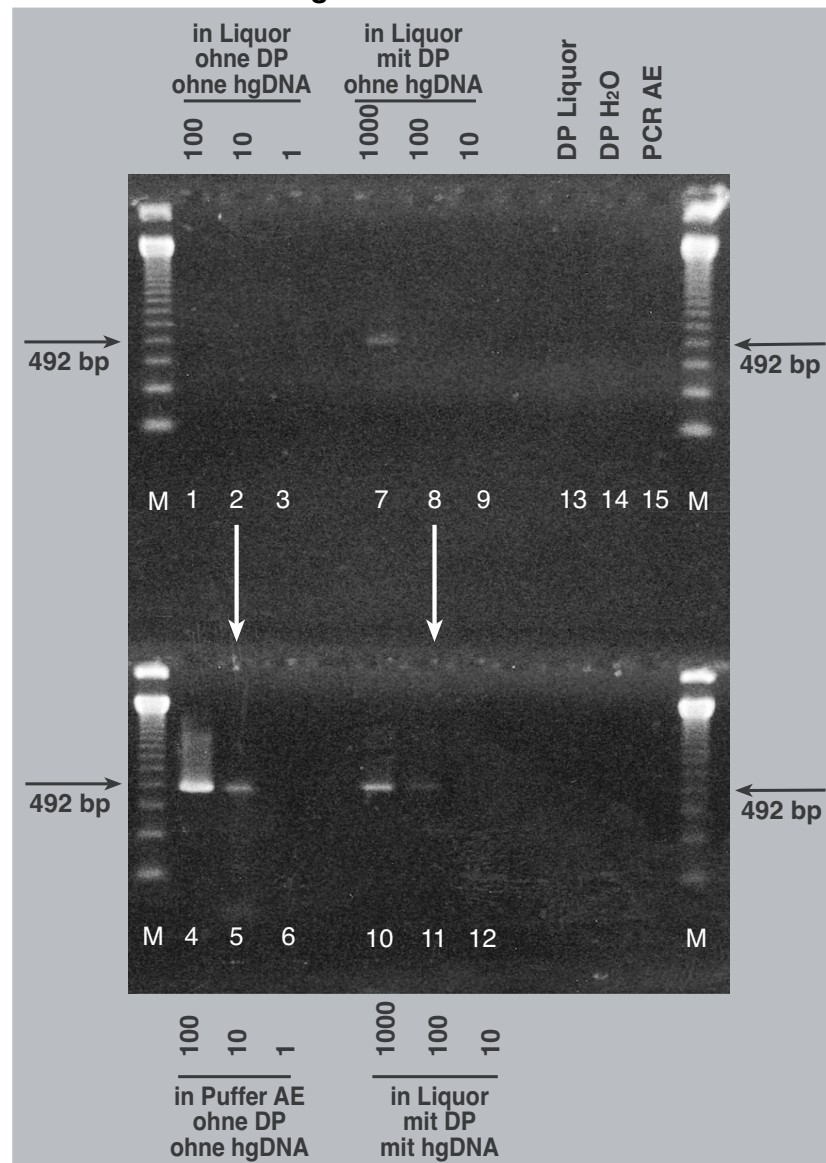
Als Negativkontrollen wurde die DNA-Präparation mit unkontaminiertem Liquor und Aqua bidest durchgeführt. Zur Kontrolle der PCR wurde noch eine dritten Probe mit unkontaminiertem Puffer AE zur PCR zugefügt (Spuren 13, 14 und 15).

Abbildung 8: Spezifitätsnachweis durch Restriktionsverdau der PCR-Produkte

Spur 1:	Produkt des 1. PCR-Laufes unverdünnt	755bp
Spur 2:	nach Restriktionsverdau mit Sau 3A	74bp, 221bp, 460bp
Spur 3:	nach Restriktionsverdau mit Ita I	484bp, 271bp
Spur 4:	Produkt des 2. Laufes unverdünnt	478bp
Spur 5:	nach Restriktionsverdau mit Sau 3A	127bp, 351bp
Spur 6:	nach Restriktionsverdau mit Ita I	316bp, 162bp
Spur M:	123bp-Längenmarker	

Beim Schneiden der PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen Sau 3A und Ita I ergeben sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung die für eine HHV-7 spezifische PCR erwarteten Banden.

Abbildung 9: Sensitivität der PCR

**Kontrolle der PCR:**

Spuren 1, 2, 3: Plasmid (100, 10, 1 Kopie/Ansatz) **in Liquor nur PCR**

Spuren 4, 5, 6: Plasmid (100, 10, 1 Kopie/Ansatz) **in Puffer AE nur PCR**

keine Detektion in 1, 2, 3 im Gegensatz zu 4, 5, 6:

hemmende Einflüsse des Liquor senken die Sensitivität im Vergleich zu Puffer AE

Kontrolle der DNA-Präparation:

Spuren 7, 8, 9: Plasmid in Liquor (1000, 100, 10 Kopien/200µl Liquor)

PCR mit DNA-Präparation, ohne Hintergrund-DNA

Spuren 10,11,12: Plasmid in Liquor (1000, 100, 10 Kopien/200µl Liquor)

PCR mit DNA-Präparation, mit Hintergrund-DNA

Steigerung der Sensitivität des ges. Verfahrens um den Faktor 10 durch Verwendung von Hintergrund-DNA in der DNA-Präparation (7, 8, 9 im Vergleich zu 10, 11, 12)

Negativkontrollen der DNA-Präparation und der PCR:

Spur 13: Negativkontrolle der DNA-Präparation mit 200µl Liquor

Spur 14: Negativkontrolle der DNA-Präparation mit 200µl Aqua bidest

Spur 15: Negativkontrolle der PCR mit Puffer AE

Li: Liquor; AE: Puffer AE, DP: DNA-Präparation; hgDNA: Hintergrund-DNA

3.5 Qualitätssicherung

Bei einer hochsensitiven Nachweismethode ist die Gefahr von falschpositiven bzw. falsch-negativen Resultaten sehr hoch. Zur Vermeidung von Fehlern mußten folgende Vorkehrungen getroffen werden:

Aufbewahrung von Proben- und Reaktionsansätzen sowie deren Vorbereitung, Amplifikation, gelelektrophoretische Trennung der Amplifikate und Auswertung der Auftrennung fand in vier getrennten Räumen statt:

Raum Nr. 1: In einer Werkbank wurden Verdünnungen der Stammlösungen (z. B. für Primer, $MgCl_2$) und Reaktionsansätze (Mastermix) angesetzt. Waren alle Lösungen vorbereitet, wurden hier Proben und Mastermix zusammengefügt. Hier wurde auch $1 \mu l$ des PCR-Produktes des ersten Laufes in die Reaktionsansätze des zweiten Laufes gegeben. Auf eine äußerste Reinheit der Werkbank wurde geachtet. Sie wurde regelmäßig mit destilliertem Wasser (Aqua bidest) und Isopropanol 70% gereinigt.

Raum Nr. 2: Dies war der Raum für die Probenvorbereitung. Aus Liquor wurde unter großer Sorgfalt mittels eines kommerziellen Testsystems (Qiagen BloodKit, Qiagen) DNA präpariert und in Puffer AE aufbewahrt (siehe 3.3).

Raum Nr. 3: Hier fand das Amplifizieren der DNA im Cycloer (Perkin Elmer) statt.

Raum Nr. 4: Raum zur gelelektrophoretischen Auftrennung des PCR-Produktes. In diesem Raum wurde mit Lösungen gearbeitet, die HHV-7 DNA in hohen Konzentrationen enthielten und war damit der Raum mit der größten Kontaminationsgefahr. Materialien wie Reaktionsgefäßgestelle und Pipetten, die in einen der anderen Räume zurückgeführt werden mußten, wurden mit sterilem Wasser und Isopropanol (70%) gereinigt.

Bei allen Schritten wurden durch häufige Handschuhwechsel und vorsichtiges Öffnen der Reaktionsgefäße das Risiko der Kontamination vermindert. Für sämtliche Schritte wurden sterile Filterpipettenspitzen benutzt. HHV-7 wird von einem Großteil der Bevölkerung im Speichel in infektiöser Form ausgeschieden (siehe Punkt 2.7.3). Deshalb war das Tragen von Mundschutz bei jedem Arbeitsschritt obligatorisch.

Um den Erfolg der oben erwähnten Vorsichtsmaßnahmen messen zu können, wurden zu den Proben positive und negative Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten eingeschleust.

Kontrolle der DNA-Präparation: Bei jeder DNA-Präparation wurden zwei negative Liquorprobe ($200 \mu l$) mit 1000 und 100 Kopien des Plasmides kontaminiert. Gefordert war die Detektion von 1000 Kopien des Plasmides in $200 \mu l$ Liquor, also 5 Kopien/ μl . In einigen Fällen konnten auch 100 Kopien/ $200 \mu l$ Liquor detektiert werden. Desweiteren wurde die negative Liquorprobe ohne DNA-Zusatz neben Aqua bidest und Puffer AE als Negativkontrollen in die Präparationsschritte gegeben. (siehe 3.4.8).

Kontrolle der PCR: Erwartet wurde der Nachweis von 10 Virus-DNA-Kopien im Probenvolumen von $10 \mu l$, entsprechend 1 DNA-Kopie/ μl Probe. Reines Aqua bidest bzw. Lagerungspuffer AE wurde als Negativkontrolle bei jeder PCR eingesetzt.

3.6 Entsorgung der belasteten Abfälle

3.6.1 Ethidium Bromid

Ethidium Bromid (EB) stellt ein hochmutagenes Agens dar und darf deshalb nur unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen verarbeitet und entsorgt werden. Um die Menge an EB-versetzten Materialien klein zu halten, wurden die Agarosegele erst nach der elektrophoretischen Trennung in einem EB-Bad gefärbt. Die Gele wurden nach der Auswertung gesammelt und gesondert entsorgt. Anfallende EB versetzte Puffer wurden zunächst auf EB-Konzentrationen von etwa $0,5 \mu\text{g/ml}$ verdünnt, dann mit Aktivkohle versetzt (100 mg Aktivkohle/100 ml EB-Lösung) und abgefiltert (Whatman Papier Nr. 1). Das Filtrat wurde verworfen, die Filter und Gele zum Sondermüll gegeben (pyrotechnische Vernichtung).

Bei allen Tätigkeiten mit EB-versetzten Materialien wurden Handschuhe getragen.

3.6.2 potentiell infektiöses Material

Alle Lösungen und Stoffe, die mit Patientenmaterial in Kontakt gekommen waren und damit potentiell infektiöses Material tragen konnten, wurden zum biologischen Abfall gegeben und thermisch entsorgt.

3.7 Chi-Quadrat-Test

Anhand der Ergebnisse der Routinelaboruntersuchung und der klinischen Bilder der Erkrankungen wurden die Patienten in die Studien- und Kontrollgruppe eingeteilt. Die gemessenen Werte „HHV-7 DNA nachgewiesen“ bzw. „HHV-7 DNA nicht nachgewiesen“ sowie „Zugehörigkeit zur Studiengruppe bzw. Kontrollgruppe“ sind qualitative, nicht ordinale Werte. Zum Vergleich der Studien- und Kontrollgruppe für das Merkmal „HHV-7 DNA nachgewiesen“ bzw. „nicht nachgewiesen“ ist der Vierfeldertest für unverbundene Stichproben anzuwenden. Mit diesem Verfahren kann festgestellt werden, ob qualitative Werte zweier unverbundener Stichproben untereinander ab- oder unabhängig sind. Die Nullhypothese behauptet, die Verteilung der gemessenen Werte sei rein zufällig.

H₀: Unterschiede in der Häufigkeit des positiven Virusnachweises unter den Gruppen sind rein zufällig bedingt; es besteht also kein Zusammenhang zwischen dem Virusnachweis im Liquor und der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe von Erkrankungen mit neurologischer Auffälligkeit (z. B. Infektkrampf, Meningoenzephalitis).

α gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der man beim Verlassen der Nullhypothese den Fehler erster Art α begeht (Verlassen der Nullhypothese, obwohl diese zutrifft).

Abhängig von der gewünschten Sicherheit des Testverfahrens (Signifikanzniveau!), wird α entsprechend der Tabelle 13 gewählt.

Das Prüfmaß Chiquadrat (χ^2) wird wie folgt berechnet:

Tabelle 12: Schema der Vierfeldertafel

PCR-Ergebnis	positiv	negativ	Zeilensumme
Gruppe n	a	b	a+b
Gruppe m	c	d	c+d
Spaltensumme	a+c	b+d	N = a+b+c+d

$$\chi^2 = \frac{(ad - bc)^2 N}{(a + c)(b + d)(a + b)(c + d)}$$

H_0 kann mit dem Fehler α verworfen werden, wenn daß Prüfmaß χ^2 einen Wert erreicht, der sich aus dem Freiheitsgrad f (hier f = 1) und dem gewählte α bestimmt. Der Freiheitsgrad f ergibt sich zu:

$$f = (k-1) (l-1)$$

mit k als Anzahl der möglichen Ausprägungen der Gruppe (hier 2)

und l als Anzahl der möglichen Ausprägungen des PCR-Testes (hier ebenfalls 2).

$$\alpha = 0,05 \quad \chi^2 > 3,84$$

$$\alpha = 0,01 \quad \chi^2 > 6,62$$

$$\alpha = 0,0001 \quad \chi^2 > 10,8$$

Für $\alpha < 0,05$ und f = 1 muß $\chi^2 > 3,84$ gelten⁹¹

Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p_i) gibt an, mit welchem Risiko die Nullhypothese verworfen wird, obwohl sie zutrifft (Fehler erster Art, α). Die Grenzen für die Irrtumswahrscheinlichkeit werden als Signifikanzniveau vor der Testdurchführung gewählt. Diese Arbeit folgt der international üblichen Konvention:

Tabelle 13: Signifikanzniveaus

$0,05 < p_i \leq 0,1$	tendenziell
$0,01 < p_i \leq 0,05$	schwach signifikant *
$0,001 < p_i \leq 0,01$	einfach signifikant **
$p_i \leq 0,001$	hoch signifikant ***

p_i = Irrtumswahrscheinlichkeit

Ein schwach signifikanter Unterschied (*) bedeutet, daß der postulierte Unterschied mit mindestens 95% Wahrscheinlichkeit wirklich vorhanden ist.

4 Ergebnisse

4.1 Fallbeschreibung der HHV-7 positiven Patienten

HHV-7 DNA konnte mit der beschriebenen PCR in 6 der 104 Proben (5,8%) nachgewiesen werden. Alle HHV-7 positiven Patienten waren in der Studiengruppe (67 Patienten, Gruppen I-III) zu finden. Unter den 37 Patienten der Kontrollgruppe (Gruppen IV und V) befanden sich keine HHV-7 DNA positiven Liquorproben.

Tabelle 14: HHV-7 positive Patienten

Nr.	Diagnose	Gruppe
1	Enzephalitis	I
2	ADEM	I
3	Meningitis	I
4	1., unkomplizierter Infektkrampf	II
5	Facialisparese	III
6	Ausfall N. vestibularis einseitig	III

Nr. 1: R. M., weiblich, Gruppe I:

Das siebzehnjährige Mädchen litt unter zunehmenden Kopfschmerzen, Schläfrigkeit und Gangunsicherheit über einen Zeitraum von ca. 3 Tagen vor Hospitalisation. Klinische Anzeichen einer Infektion waren nicht festzustellen. Eine Verletzung konnte anamnestisch ausgeschlossen werden. In der Notaufnahme war die Patientin fieberfrei, orientiert aber somnolent. Weitere neurologische Symptome konnten nicht nachgewiesen werden. Die Konzentration von Leukozyten, Thrombozyten und CRP waren im Normbereich. Im Liquor wurden 20 Zellen/ μ l (97% lymphozytäre Zellen) und keine Erythrozyten gezählt. Das Liquoreiweiß betrug 44mg/dl bei normaler Liquorglukose von 51mg/dl (Blutglukose 80mg/dl). Bakterielle Blut- und Liquorkulturen waren negativ. Das Schädel-CT bei Aufnahme war unauffällig, ebenso wie ein MRT am zweiten und fünften Tag nach Aufnahme. Im EEG waren unspezifische Verlangsamungen zu erkennen.

Nach schneller Besserung unter rein symptomatischer Therapie wurde das Mädchen mit der Diagnose einer Virusenzephalitis gesund aus der stationären Behandlung entlassen.

Nr. 2: C. J., männlich, Gruppe I:

Der siebenjährige Junge entwickelte 2 Tage vor der Hospitalisation Fieber, zunehmende Müdigkeit, Kopfschmerz und Meningismus. Im weiteren Verlauf folgten rasch Somnolenz und Desorientiertheit. Nach einem fokalen Krampfanfall mit anschließender Bewußtlosigkeit wurde er in die Notaufnahme gebracht. Bei der stationären Aufnahme konnten Fieber und meningitische Zeichen festgestellt werden. Der Liquor war mit 67 Leukozyten/ μ l (67% lymphozytäre Zellen, 28% Granulozyten, 5% Monozyten) entzündlich verändert. Norm-

werte lagen vor für Eiweißgehalt (25mg/dl) und Liquorglukose (42mg/dl bei einer Blutglukosekonzentration von 71mg/dl). Alle übrigen Blut- und Liquorwerte waren unauffällig, insbesondere die Ergebnisse der bakteriellen Blut- und Liquorkultur. Noch am Aufnahmetag zeigte eine CT des Schädels eine Mittelhirnschwellung, die Verlaufskontrolle am Folgetag war unauffällig. Das MRT am achten Tag nach Aufnahme stellte in T2-gewichteten Sequenzen Signalerhöhungen in der Weißen Substanz links, im mittleren Kleinhirnstiel beidseits und im linken Centrum Semiovale dar. Diese Befunde führten zur Diagnose einer ADEM, die mit Prednisolon 20mg/kg/d über 5 Tage behandelt wurde. Die Symptome waren daraufhin schnell rückläufig und der Junge konnte beschwerdefrei nach 16 Tagen die stationäre Behandlung beenden.

Nr. 3: H. K., männlich, Gruppe I:

Der 2 Jahre und 3 Monate alte Junge entwickelte Kopfschmerzen, Müdigkeit, Erbrechen und Fieber bis 39,8°C einen Tag vor der stationären Aufnahme. Er wurde wegen zunehmender starker Kopfschmerzen und Lichtempfindlichkeit in der Notaufnahme vorgestellt. Hier zeigte sich hohes Fieber bis 39,3°C und Somnolenz bei deutlich reduziertem Allgemeinzustand. Die Laborergebnisse ergaben eine Leukozytose mit 13 900 Leukozyten/ μ l (27% Lymphozyten, 70% Granulozyten, 3% Monozyten) sowie einem CRP von 1,0mg/dl. Im Liquor waren 2 000 Zellen/ μ l (68% Granulozyten, 28% Lymphozyten, 4% Monozyten) und 640 Erythrozyten/ μ l festzustellen. Die Liquoreiweißkonzentration betrug 51mg/dl, die Liquorglukose 49mg/dl (Blutglukose 88mg/dl). Blut- und Liquorkulturen, Liquor-Latex-Agglutinationstest für den Nachweis von Pneumo- und Meningokokken sowie Serum-HSV- und -Lyme-ELISA (jeweils IgM und IgG) waren unauffällig, ebenso das EEG.

Nach Probengewinnung begann die Antibiose, die trotz negativer bakterieller Kulturen über 7 Tage mit Cefotaxim 200mg/kg intravenös durchgeführt wurde. Der Zustand des Jungen besserte sich schnell und er konnte am neunten Tag in gutem Allgemeinzustand mit der Diagnose einer Virusmeningitis aus der stationären Behandlung entlassen werden.

Nr. 4: L. S., männlich, Gruppe II:

Der 15 Monate alte Junge kam sofort nach seinem ersten, unkomplizierten Infektkrampf in die Notaufnahme. Während des generalisierten Anfalls bestanden tonisch-klonische Zuckungen, Bewußtlosigkeit, periphere Zyanose sowie eine Blickdeviation nach oben für etwa eine Minute. Weder beim Patienten noch bei Verwandten ersten Grades waren Anfallsleiden bekannt. Bei der Aufnahme war bei dem mit 38,5°C febrilen Jungen ein geröteter Rachen festzustellen. Die neurologische Untersuchung war ebenso wie die übrige klinische Untersuchung unauffällig. Die Laborergebnisse zeigten Normalbefunde mit 3 400 Leukozyten/ μ l und einer CRP Konzentration von weniger als 1,0mg/dl im peripheren Blut. Die Liquoruntersuchung war mit 0 Zellen/ μ l, 0 Erythrozyten/ μ l, einer Proteinkonzentration unter 10mg/dl und normaler Liquorglukose von 64mg/dl bei einer Serumglukose von 82mg/dl

ebenfalls unauffällig. Bakterielle Blut- und Liquorkulturen waren negativ, ebenso Liquor-Latex-Agglutinationstests zum Nachweis von Pneumokokken, Meningokokken, Hämophilus influenza und Gruppe-B Streptokokken. Eine Ultraschalluntersuchung des Schädels zeigte einen Normalbefund. Nach einer eintägigen Überwachung ohne weitere neurologische Probleme wurde der Patient mit symptomatischer Therapie nach Hause entlassen. Das nach einer Woche angefertigte EEG war unauffällig.

Nr. 5: G. C., weiblich, Gruppe III:

Das knapp sechsjährige Mädchen wurde mit einer linksseitigen Fazialisparese vorgestellt, die aus voller Gesundheit heraus 3 Tage zuvor aufgetreten war. Weder eine Verletzung, noch Infektionszeichen wie Fieber, Kopfschmerz, Exanthem oder ein Zeckenbiß waren in der Vorgeschichte eruierbar. Die klinische Untersuchung zeigte ein sonst unauffälliges Mädchen mit peripherer Lähmung des N. facialis links. Die sofort durchgeführte Routineuntersuchung von Blut und Liquor ergab unauffällige Werte (Blut: Leukozyten 8 400/ μ l, Thrombozyten 473 000/ μ l, CRP <1,0mg/dl, Liquor: Leukozyten 0/ μ l, Erythrozyten 0/ μ l, Glukose 51mg/dl bei einem Blutglukosespiegel von 82mg/dl). Die bakteriellen Blut- und Liquorkulturen waren negativ. Nach Ausschluß eines Meningokokken- oder Pneumokokkeninfektes durch einen Liquor-Latex-Agglutinationstest sowie bei unauffälligen Titern für Borrelia burgdorferi (IgM- und IgG-ELISA) in Serum und Liquor wurde eine Kortikoidtherapie (Prednisolon 2mg/kg/d über 2 Wochen) begonnen und die Patientin nach einem Tag in die hausärztliche Nachsorge entlassen. Die Fazialisparese war nach wenigen Tagen komplett rückläufig.

Nr. 6: B. T., männlich, Gruppe III;

Der gut siebeneinhalbjährige Junge wurde mit plötzlich einsetzendem Schwindel, Übelkeit, Erbrechen und Fallneigung nach rechts bei Gangunsicherheit seit wenigen Stunden in der Notaufnahme vorgestellt. Drei Tage zuvor erlitt er bei einem Radsturz Prellungen des rechten Thorax und des rechten Armes. Kopf und Hals blieben unverletzt. Fieber, Kopfschmerz oder andere unspezifische Infektzeichen waren anamnestisch nicht feststellbar. In der Notaufnahme zeigten sich Zeichen einer labyrinthären Ataxie mit unsicherem, breitem Gang und Fallneigung nach rechts mit Spontannystagmus. Die übrige neurologische Untersuchung war unauffällig, insbesondere die des kochleären Systems. Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration und CRP im Serum sowie die Konzentration von Leukozyten, Erythrozyten, Protein und Glukose im Liquor lagen im Normbereich. Bakterielle Kulturen von Liquor und Blut waren steril. Die Konzentration von IgM und IgG gegen Borrelia burgdorferi, HSV, CMV und Enteroviren waren im Liquor und Serum unauffällig. Eine Schädel-CT zeigte keine intrakraniellen Veränderungen.

4.2 HHV-7 IgM- und IgG-Titer im Serum

Im Serum der HHV-7 positiven Patienten wurden die Titer von HHV-7 spezifischen IgM und IgG bestimmt. Die Ergebnisse können der Tabelle 15 entnommen werden. Für Patientin Nr. 1 waren keine verwertbaren Serum-Proben verfügbar. Verlaufskontrollen konnten mit dem zur Verfügung stehenden Material nicht durchgeführt werden.

Tabelle 15: Ergebniszusammenstellung der HHV-7 positiven Patienten

Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Serum		Liquor		HHV-7 AK im Serum		EEG	cCT	MRT	Diagnose	Behandlung
			Zellen/ μl	CRP mg/dl	Zellen/ μl	CRP mg/dl	IgM	IgG					
1	17	w	8800	1,0	20	51	n	n	path.	oB	oB	virale Enzephalitis	symptomatisch
2	7	m	12200	1,7	67	25	1:10	1:40	n	path.	path.	ADEM	Prednisolon 20mg/kg/d, 5 d
3	2	m	13900	1,0	2000	51	1:20	neg.	oB	n	n	aseptische Meningitis	Cefotaxim 200mg/kg/d, 7d
4	1	m	3400	1,0	0	<10	1:20	neg.	oB	n	n	1. unkompl. Infektkrampf	symptomatisch
5	6	w	8400	1,0	0	27	1:20	1:20	n	n	n	Facialisparese einseitig	Prednisolon 20mg/kg/d, 14 d
6	7	m	6300	1,0	0	20	neg	1:80	oB	n	oB	Neuritis vestibularis einseitig	symptomatisch

Bei allen Patienten waren in Liquor und Serum die bakteriologischen Untersuchungen unauffällig. Blut- und Liquorglukose war ebenfalls jeweils im Normbereich. Alle Proben wurden bei stationärer Aufnahme abgenommen.
oB: altersentspr. Normalbefund; path.: pathologischer Befund; n: nicht durchgeführt; d: Tage; w: weiblich; m: männlich;

4.3 Verteilung der HHV-7 positiven Patienten auf die Gruppen

Alle 6 HHV-7 DNA positiven Patienten waren in der Patientengruppe (Gruppen I-III) zu finden, während in der Kontrollgruppe bei keinem einzigen Patienten HHV-7 DNA im Liquor nachgewiesen werden konnte.

Eine statistische Signifikanz dieses Unterschiedes wurde mit dem Chiquadrat-Test untersucht. Die Hypothese H_0 besagt, daß in der Patientengruppe HHV-7 statistisch nicht häufiger im Liquor nachgewiesen werden kann als in der Kontrollgruppe. Gemäß den Angaben in 3.7 ergibt sich χ^2 zu 3,52 und bleibt damit unter dem für eine Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ geforderten Wert von 3,85 (siehe Tabelle 16).

Damit kann die Hypothese bei einem geforderten Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nicht verlassen werden. Statistisch läßt sich ein Zusammenhang des HHV-7 DNA Nachweises im Liquor und der Gruppenzugehörigkeit (Studiengruppe, Kontrollgruppe) nicht herstellen.

Tabelle 16: Chirquadrat-Test:

Gruppe	HHV-7 DNA pos.	HHV-7 DNA neg.	Spaltensumme
Patientengruppe	6	61	67
Kontrollgruppe	0	37	37
Zeilensumme	6	98	104

$$\chi^2 = 3,52$$

für $p \leq 0,05$ muß gelten: $\chi^2 > 3,85$

H_0 kann deshalb bei einem geforderten Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nicht verlassen werden

5 Diskussion

Seroepidemiologische Studien zeigen, daß HHV-7 unspezifische fieberhafte Erkrankungen und fieberhafte exanthematöse Erkrankungen wie das Exanthema subitum verursachen kann.^{82, 92} Wie die übrigen humanpathogenen Herpesviren und insbesondere der nächste Verwandte HHV-6 muß HHV-7 als Ursache für Erkrankungen des ZNS in Betracht gezogen werden.^{93, 94} In der Literatur ließen sich Berichte über pädiatrische Patienten mit Exanthema Subitum finden, die im Verlauf neurologische Komplikationen mit Infektkrampf, Halbseitenlähmung oder Enzephalopathie bei HHV-7 spezifischer Serokonversion erlitten.^{6, 9} Yoshikawa berichtet über Kinder mit aseptischer Meningitis und PCR-gestütztem HHV-7 DNA-Nachweis im Liquor.⁸

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob HHV-7 im Liquor von Patienten ohne Exanthema Subitum nachgewiesen werden kann. Dies gelang bei 6 von 104 Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen .

5.1 Diskussion der verwendeten Methodik

5.1.1 Materialgewinnung und -verwahrung

Es wurden retrospektiv Liquorproben untersucht, die in den Jahren 1994 bis einschließlich 1997 im Doktor von Haunerschen Kinderspital der LMU München und zwischen Oktober 1994 und Juni 1996 im Childrens Hospital, Division of Infectious Diseases, Boston, MA, USA, entnommen wurden und in genügender Qualität und Quantität vorlagen. Makroskopisch klare Liquorproben mit mindestens 200µl Volumen wurden getestet. Ausgeschlossen wurden makroskopisch blutige oder trübe Proben.

Die Liquorpunktion erfolgte zur primären Diagnostik bei stationärer Aufnahme in der Notaufnahme. Die zeitlichen Abstände zwischen Erkrankungsbeginn und Probenentnahme waren abhängig vom akuten Eintreten der Erkrankung oft unterschiedlich und schwankten zwischen wenigen Stunden (z. B. bei Infektkrampf) und einigen Tagen (z. B. bei Fazialisparese). Da die Konzentration des Erregers bzw. der spezifischen Antikörper im Krankheitsverlauf dynamische Verläufe aufweisen, ist auch die Möglichkeit des Erreger- bzw. Antikörpernachweises vom Untersuchungszeitpunkt abhängig. Longitudinale Verlaufskontrollen konnten mit dem vorliegenden Material retrospektiv weder in den serologischen Untersuchungen noch bei der Liquordiagnostik durchgeführt werden.

5.1.2 Verwendete Nachweismethoden

Das in dieser Arbeit angewandte Testsystem bestehend aus DNA-Präparation und PCR wies HHV-7-DNA im Liquor nach. Über die Form der DNA im Liquor bei positivem Testergebnis war keine Aussage möglich. Die DNA könnte im Liquor intrazellulär (z. B. in T-Lymphozyten), im intakten, infektiösen Viruspartikel oder frei im Liquor vorhanden sein.

Herpesviren sind zellständig, im zellfreien Liquor ist deshalb mit nur sehr geringen Viruskonzentrationen zu rechnen. Versuche, Herpesviren aus Liquorproben in der Viruskultur zu isolieren, schlugen oft fehl. Die PCR hat sich deshalb beim Virusnachweis im Liquor unter anderem wegen ihrer hohen Sensitivität gegenüber der Viruskultur mehr und mehr durchgesetzt.^{95, 96, 102} Die Präparation der Ziel DNA ist dafür allerdings ein essentieller Bestandteil der Nachweismethode, da sie die meist intrazellulär vorliegende und von verschiedenen Proteinstrukturen umhüllte DNA erst der PCR zugänglich macht.

Da die PCR auch nur einen kleinen Teil der Virus-DNA nachweist (in dieser Arbeit 455bp von ca. 150000bp, entsprechend 0,003%), kann auch über die Integrität bzw. die primäre, sekundäre und tertiäre Struktur der gesamten Virus-DNA nur wenig ausgesagt werden. Nach der aktuellen Literatur ist jedoch davon auszugehen, daß der PCR-Nachweis eines Teils der Virus-DNA im Liquor ausreicht, um eine ZNS-Infektion mit diesem Virus nachzuweisen. Dies gilt insbesondere dann, wenn es sich um einen typischen Erreger für ZNS-Infektionen wie Entero- und Herpesviren handelt.^{2, 29, 96} Über die möglichen Verläufe (z. B. subklinisch, chronisch, akut, fulminant) sowie die Ausdehnung der Infektion (befallene Areale im ZNS) sagt ein Erregernachweis im Liquor wenig aus. Die Konsequenzen eines positiven Erregernachweises, also einer ZNS-Infektion, sind nach wie vor individuell zu diskutieren und vom klinischen Verlauf bzw. weiterer Abklärung abhängig zu machen.^{5, 97, 98}

Mit den routinemäßig durchgeführten Untersuchungen durfte noch keine Ursache der neurologischen Erkrankungskomponente gefunden worden sein (wie z. B. bakterielle Meningitis). Die sog. Routineuntersuchung umfaßte die im Punkt 3.2.2 beschriebenen Laborverfahren. Sie deckten den Nachweis der häufigsten Erreger von ZNS-Infektionen ab. Bestand Anlaß, weitere Erreger zu vermuten, wurden die Testverfahren der Routine entsprechend erweitert (z. B. HSV PCR). Die theoretische Möglichkeit von Mehrfachinfektionen des ZNS wurde nicht berücksichtigt. Das heißt, eine bekannte bakterielle oder virale Infektion des ZNS (z. B. Lyme Borreliose mit ZNS-Beteiligung, HSV-Enzephalitis) schloß diese Patienten aus der weiteren Untersuchung im Rahmen dieser Studie aus. In der Literatur beschrieben sind Doppelinfektionen lediglich bei HIV positiven Patienten, die im ZNS neben HIV noch DNA einer Vielzahl anderer Viren (Herpesviren, Enteroviren), Bakterien oder Parasiten beherbergen können.^{99, 100} Nur wenige Arbeiten beschreiben den Nachweis der DNA zweier Herpesviren (HSV 1 und VZV) gleichzeitig aus einer Liquorprobe bei einem immunkompetenten Patienten mit Zeichen einer Enzephalitis.¹⁰¹

5.1.3 prinzipielle Vorteile der PCR

Als Nachweismethode wurde die PCR verwendet. Diese Methode übertrifft alle sonst etablierten Testsysteme in Hinsicht auf Schnelligkeit, Sensitivität und Spezifität. Der DNA-Nachweis in dieser Untersuchung benötigte von der DNA-Präparation bis zur Darstellung des Amplifikates der PCR im Agarosegel ca. 6 Stunden. Die Sensitivität der PCR lag mindestens bei 10 DNA-Kopien/ μ l Probe, das gesamte Testsystem konnte ca. 5 DNA-

Kopien/ μ l Liquorprobe detektieren. Mit den in 3.4.7 und 3.4.8 beschriebenen Verfahren konnte die PCR ihre hohe Sensitivität und Spezifität belegen.

5.1.3.1 *Vergleich Viruskultur und PCR aus Liquorproben*

Viruskulturen sind zeitlich, technisch und personell aufwendige Verfahren. Bis zu einem Erregernachweis vergehen mehrere Tage. Bei akuten Infektionen des ZNS ist ein möglichst schneller Virusnachweis zum baldigen Beginn der adequaten Therapie erforderlich. Desweiteren zeigen negative Viruskulturergebnisse bei später histologisch gesicherter Virusinfektion bei HSV-Enzephalitiden, daß die Viruskultur kein verlässliches Verfahren darstellt. Eine optimierte PCR erreicht eine höhere Sensitivität als die Viruskultur.^{29, 31, 32, 95, 97, 102, 103, 104, 105}

5.1.3.2 *Vergleich serologischer Verfahren und PCR aus Liquorproben*

Die PCR ist bezüglich Sensitivität und Spezifität auch serologischen Verfahren (z. B. IFT, ELISA) deutlich überlegen. Am Beginn einer Infektion ist die Erregerkonzentration hoch, der Erregernachweis mit der PCR besser möglich. Die Konzentration spezifischer Antikörper steigt bei einer Infektion erst im Verlauf stetig an. Es fehlt ein amplifizierender Schritt. Deshalb muß die Antikörperkonzentration bis zur Nachweisgrenze steigen. Die PCR ist deshalb gerade in der Frühdiagnostik vieler Erkrankungen gut geeignet, während später serologische Verfahren ebenfalls vielversprechend sind.

Allerdings kann die PCR nur Virus-DNA nachweisen. Eine Unterscheidung zwischen einer primären Infektion und einer Reaktivierung ist nicht möglich. Dies ist mit serologischen Verfahren über die Messung der Titer von IgG und IgM möglich. Zwei der HHV-7 positiven Patienten hatten ein typisches Alter für eine primäre Infektion (1 bzw. 2 Jahre). Entsprechend Tabelle 15 bestand bei Ihnen auch serologisch der Verdacht auf eine Primärinfektion. Bei drei weiteren Patienten im Alter von 5 bzw. zwei Mal 7 Jahren läßt die Bestimmung der HHV-7 Antikörper entsprechend dem Alter der Patienten an eine Reaktivierung der HHV-7 Infektion denken. Eine Patientin war mit 17 Jahren schon weit über das Alter der primären Infektion fortgeschritten. Hier könnte eine Reaktivierung von HHV-7 vorliegen. Verwertbares Probenmaterial zur serologischen Untersuchung stand leider nicht mehr zu Verfügung (siehe Tabelle 15).

5.1.4 Sensitivität und Spezifität der verwendeten HHV-7 PCR

In den Punkten 3.4.7 und 3.4.8 wurden die Verfahren zur Evaluation der Spezifität und Sensitivität der verwendeten Verfahren geschildert. Die Spezifität wurde sowohl durch den Nachweis der erwarteten PCR-Amplifikate als auch durch die negativen PCR-Ergebnisse mit DNA der anderen Herpesviren (HSV 1/2, VZV, EBV, CMV, HHV-6 A/B) bestätigt.

Zur Messung der Sensitivität wurde das bekannte Plasmid in verschiedenen Konzentrationen in den verwendeten Medien (Liquorprobe, Aqua bidest, Puffer AE) beigemischt. Die Sensitivität ließ sich damit für die PCR alleine auf einen Wert von 10 DNA Kopien in der

eingesetzten Probenmenge von $10\mu\text{l}$ bestimmen. Dies entsprach einem Nachweis von 1 DNA Kopie/ μl eingesetzter Probe und ist eine statistisch noch sinnvolle Nachweisgrenze. Würde die Nachweisgrenze um eine Zehnerpotenz auf 1 DNA Kopie in der eingesetzten Probe von $10\mu\text{l}$ herabgesetzt, würde ein großer statistischer Fehler entstehen, da bei dieser niedrigen Konzentration von 0,1 DNA Kopien/ μl in einem PCR-Probenvolumen von nur $10\mu\text{l}$ die Wahrscheinlichkeit für ein falschnegatives Resultat in relevante Größenordnungen steigt.

Durch die vorgeschaltete DNA-Präparation wurde zum einen die DNA für die PCR zugänglich gemacht (Lyse der Zellen und Virusproteine), zum anderen wurden mögliche Hemmstoffe der PCR beseitigt. Die Gestaltung der DNA-Präparation erreichte zusätzlich einen Konzentrationseffekt der DNA bei nur gering höherem absoluten Materialverlust. Nach Adsorption und Reinigen der Virus-DNA an den Silicat-Gel-Säulen erfolgte das Auswaschen der gereinigten DNA nur mit $50\mu\text{l}$ Puffer AE statt mit $200\mu\text{l}$. Von den erhaltenen $50\mu\text{l}$ Eluat wurden $10\mu\text{l}$ in die PCR eingesetzt, also 20% der eluierten DNA. Würde man die Virus-DNA mit einem Volumen von $200\mu\text{l}$ aus den Silicat-Gel-Säulen auswaschen, würden bei einem Probenvolumen von $10\mu\text{l}$ für die PCR nur 5% der eluierten Virus-DNA in die PCR eingesetzt. Durch das kleinere Volumen an Elutionspuffer stieg zwar der absolute Verlust an DNA (nach Herstellerangaben ca. 14% Verlust), jedoch stieg auch die Konzentration der Ziel-DNA (etwa 3- bis 4-fache Konzentration) in der in die PCR eingesetzten Probe.

Eine weitere Maßnahme zur Steigerung der Sensitivität war die Benutzung von Hintergrund-DNA, die unspezifische Bindungen z. B. an Wänden von Reaktionsgefäßen band und die Ziel-DNA in Lösung hielt. Mit beiden Maßnahmen konnte die Sensitivität des gesamten Systems deutlich gesteigert werden (siehe Abbildung 9).

5.1.5 Qualitätskontrollen der Nachweisverfahren

5.1.5.1 falsch positive Ergebnisse

Falsch positive Ergebnisse entstehen durch unspezifische Amplifikation anderer DNA oder Kontamination der Proben durch HHV-7 DNA aus anderen Quellen wie tatsächlich positiven Proben, Positivkontrollen („Carry Over“) oder z. B. Speichel des Personals.

Die hohe Spezifität wurde bereits im Abschnitt 5.1.4 diskutiert.

Zum Schutz vor Kontamination wurde das Arbeiten an einer sterilen Werkbank mit „laminar flow-Technik“, Verwenden von Einwegmaterial und Mundschutz sowie räumliches Trennen von wichtigen Arbeitsschritten Standard.

Kontrolliert wurden die Maßnahmen durch das Einbringen von negativen Kontrollen zu verschiedenen Schritten der Untersuchung. So wurden Proben von negativen Liquorproben, Aqua bidest und Puffer AE zur DNA-Präparation sowie zur PCR eingesetzt.

Waren die Negativkontrollen positiv, wurden die Schritte von Probenvorbereitung bis zur PCR wiederholt und bei Bedarf neue Reagenzien (z.B. neue Taq-Polymerase) verwendet.

5.1.5.2 falsch negative Ergebnisse

Zur Detektion von falsch negativen Ergebnissen wurde Ziel-DNA in Form des in 3.4.1 erwähnten Plasmides in Konzentrationen der gewünschten Nachweisgrenze von 5 DNA-Kopien/ μ l zur DNA-Präparation bzw. 1 DNA-Kopie/ μ l Probe im PCR-Testansatz in verschiedenen Trägern (nativer Liquor, Aqua bidest, Puffer AE) eingebracht.

Positive Testergebnisse wurden in einer weiteren PCR bestätigt. Negative Proben wurden kein weiteres mal untersucht. Mit diesem kontrollierten Testverfahren konnten von den 104 Liquorproben zuverlässig 6 Proben als HHV-7 positiv erkannt werden.

5.2 Diskussion der erhaltenen Ergebnisse

5.2.1 Gruppeneinteilung

Um eine mögliche Relevanz des HHV-7 Nachweises für neurologische Erkrankungen im Kindesalter erkennen zu können, wurden die 104 untersuchten Patienten in die Studiengruppe und die Kontrollgruppe eingeteilt. In die Studiengruppe wurden Patienten aufgenommen, die entweder einen entzündlich veränderten Liquor bei Erkrankungsbeginn hatten (Gruppe I) oder bei nicht entzündlichem Liquor eine umschriebene neurologische Erkrankung aufwiesen, z. B. Fieberkrämpfe (Gruppe II) oder andere umschriebene und akut erworbene neurologische Ausfälle (Gruppe III). Dieser Gruppe gegenüber standen die Patienten der Kontrollgruppe. Sie umfaßt Kinder mit außerhalb des ZNS lokalisierten Erkrankungen, die z. B. bei Verschlechterung des Allgemeinzustandes zum Ausschluß einer Meningitis oder Enzephalitis liquorpunktiert wurden (Gruppe IV und V).

Von „entzündlicher Liquorveränderung“ wurde in dieser Arbeit ausgegangen, wenn die Liquoreiweißkonzentration über 50mg/dl und/oder die Zahl der Liquorleukozyten über 5 Zellen/ μ l (bzw. die Altersnorm) stiegen. In der Literatur ist die Obergrenze der normale Liquoreiweißkonzentration bei 45mg/dl angegeben.¹⁰⁶ Lediglich bei Neugeborenen ist eine deutlich höhere Konzentration von 60-80mg/dl zulässig.¹⁰⁷ Wir gingen bei einer Erhöhung der Liquoreiweißkonzentration über 50mg/dl von einer entzündlichen Veränderung aus. Die Grenze der Liquorleukozyten liegt in der Literatur für Erwachsene bei 3 Zellen/ μ l¹⁰⁶, Werte bis 25-30 Zellen werden bis zum ersten Monat bei Säuglingen und 5-6 Zellen bei Kindern als normal bewertet.^{107, 108}

Unter den oben genannten Kriterien wurden 24 Patienten der Gruppe I zugeordnet, 5 alleine aufgrund der Eiweißerhöhung, 14 alleine aufgrund der Zellvermehrung. Bei 5 Patienten lag eine Erhöhung beider Parameter vor. Unter den 14 Patienten mit alleiniger Zellzahlerhöhung befanden sich 11 Patienten mit einer Leukozytenzahl zwischen 5 und 30/ μ l. Diese geringe Zellzahlerhöhung könnte auch als „Reizpleozytose“ z. B. nach Liquorpunktion, Krampfanfall, Durchblutungsstörungen oder ähnlichen Reizen interpretiert werden.¹⁰⁹ Wir nahmen auch die Patienten mit geringer Zellzahlerhöhung (5-30 Zellen/ μ l) in die Gruppe I auf, da es bisher keine sicheres Kriterium für die Unterscheidung einer nur geringen Zellzahlerhöhung

bei Infektion des ZNS und einer „Reizpleozytose“ gibt. Eine Zellzahlerhöhung über 5 Zellen gilt nach wie vor grundsätzlich als entzündlich veränderter Liquor. Bei der HHV-7 positiven Patientin Nr. 1 war bei hochnormaler Liquoreiweißkonzentration (44mg/dl) eine Leukozytenzahl von 20/ μ l gemessen worden. Hier waren jedoch eindeutige klinische Zeichen einer Enzephalitis vorhanden, so daß nicht von einer Reizpleozytose ausgegangen werden konnte. Für 3 weitere Patienten mit nur geringen Liquorleukozytenkonzentration von 6, 7 bzw. 8 Zellen/ μ l war eine Reizpleozytose theoretisch möglich. Bei P. F. (97/1748) führte die Zellzahlerhöhung auf 8 Zellen/ μ l zur Aufnahme in die Gruppe I. Klinisch könnte ein 2., unkomplizierter Infektkrampf bei hochfieberhafter Salmonellenenteritis vorgelegen haben. Ein Einfluß auf die hier durchgeführten statistischen Untersuchungen hat die Zuteilung dieser Patienten zu den Gruppen I, II oder III jedoch nicht, da letztendlich nur die Studiengruppe (Gruppen I-III) und die Kontrollgruppe (Gruppe IV und V) statistisch verglichen wurden (siehe 4.3). Die Einteilung der übrigen Gruppen erfolgte unproblematisch.

5.2.2 Aseptische Infektionen des ZNS durch HHV-7

Der Liquor der HHV-7 positiven Patientin Nr. 1 (R. M.) zeigt eine hochnormale Eiweißkonzentration von 44mg/dl bei einer mäßig erhöhten Leukozytenkonzentration von 20 Zellen/ μ l mit einem lymphozytären Anteil von 97%. Klinisch sowie laborchemisch handelte es sich bei der Patientin um eine aseptische Enzephalitis, die sich ohne spezifische Therapie komplett innerhalb einer Woche rückbildete. Eine serologische Untersuchung zur Bestimmung der HHV-7 Titer war bei fehlenden Serumproben nicht mehr möglich. Aufgrund des Alters ist jedoch eine Reaktivierung der HHV-7 Infektion sehr wahrscheinlich.

Die Diagnose einer ADEM basierte bei dem Patienten Nr. 2 (C. J.) auf dem klinischen Bild mit Fieber, Kopfschmerz, zunehmender Eintrübung mit Krampfanfällen sowie dem durchgeführten MRT mit Signalerhöhung in der weißen Substanz in den T2 gewichteten Sequenzen. Mit den zunächst durchgeführten Untersuchungen konnte kein Erreger im Liquor identifiziert werden. Die Liquorleukozyten waren auf 67 Zellen/ μ l erhöht (67% Lymphozyten, 28% Granulozyten, 5% Monozyten) bei einer Liquoreiweißkonzentration von 25mg/dl. Ein Erregernachweis im Liquor wird bei Verdacht auf „ADEM“ nicht erwartet, da ätiologisch Immunreaktionen des Körpers auf abgelaufene Infektionen hauptsächlich außerhalb des ZNS verantwortlich gemacht werden. Bei diesem Patienten konnte HHV-7 DNA im Liquor nachgewiesen werden, was die Diagnose „ADEM“ nicht ausschließt. Bei positivem IgM- und IgG-Titer (1:10 bzw. 1:40) ist auch entsprechend dem Alter eine Reaktivierung von HHV-7 möglich und wahrscheinlich.

Bei Patienten Nr. 3 (H. K.) war neben einer Liquoreiweißhöhung auf 51mg/dl eine deutliche Zellvermehrung im klaren Liquor auf 2000 Zellen (68% Granulozyten, 28% Lymphozyten, 4% Monozyten) auffällig. Das klinische Bild war gekennzeichnet durch starke Kopfschmerzen und Müdigkeit. Aufgrund des klinischen Bildes wurde eine Meningitis

diagnostiziert. Der HHV-7 IgM-Titer war mit 1:20 leicht positiv, IgG konnte nicht nachgewiesen werden. Serologisch handelt es sich demnach um eine Primärinfektion, was bei einem Alter von 2 Jahren sehr wahrscheinlich ist.

Diese drei HHV-7 DNA positiven Patienten hatten entzündlich veränderte Liquorwerte im Sinne einer aseptischen Infektionen (Patient Nr. 1 und 3) bzw. parainfektösen Enzephalopathie (Patient Nr. 2). Als Erreger konnte HHV-7 im Liquor nachgewiesen werden, das während der primären Infektion oder der Reaktivierung in das ZNS eingedrungen war. Van den Berg konnte bei einem neunzehnmonatigen Mädchen mit akuter Enzephalopathie HHV-7 DNA mit der PCR im nicht entzündlich veränderten Liquor nachweisen. Ein Eindringen von HHV-7 in das ZNS wurde durch eine Erhöhung der neuronenspezifischen Enolase wahrscheinlich. Intrathekale Antikörper gegen HHV-7 wurden nicht gemessen.⁵ Torigoe beschrieb bei 2 Kindern mit ähnlich schwerer neurologischer Erkrankung serologisch und virologisch eine HHV-7 Infektion als Ursache der Erkrankung. HHV-7 DNA konnte im Liquor weder mit Viruskultur und IFT noch mit der PCR nachgewiesen werden, jedoch waren bei einer der Patientinnen intrathekal HHV-7 spezifische Antikörper meßbar. Von einem intrathekalen Eindringen des Virus konnte also ausgegangen werden.⁶ Yoshikawa konnte mit der PCR HHV-7 DNA in Zellen aus Liquor von 6 Patienten mit klinisch typischen Zeichen einer abakteriellen Meningitis nachweisen.⁸

Auch das nächste verwandte Virus, HHV-6A/6B, wird mit entzündlichen Erkrankungen des ZNS in Verbindung gebracht. Exanthematöse Verläufe sind nicht obligat. Huang beschrieb zwei Kinder mit aseptischer Meningitis und serologischen Verdacht auf eine HHV-6 Infektion.²⁶ Bei Kindern mit Meningoenzephalitis und Exanthema Subitum sowie einer 56 jährigen Frau ohne Exanthem wurde ebenfalls eine HHV-6 Infektion des ZNS beschrieben.^{110, 111, 112} Während bei den Kindern primäre Infektionen vermutet wurden, könnte bei der erwachsenen Patientin eine Reaktivierung von HHV-6 vorgelegen haben.

5.2.3 Infektkrämpfe durch HHV-7

Unter den 26 Patienten mit gesichertem Infektkrampf (Gruppe II) konnte bei einem 15 monatigen Jungen, Patient Nr. 4 (L. S.), HHV-7 DNA im Liquor gefunden werden. Serologisch wurde bei einem positiven IgM-Titer von 1:20 und negativem IgG entsprechend dem Alter eine primäre HHV-7 Infektion nachgewiesen. Torigoe beschrieb eine serologisch diagnostizierte primäre HHV-7 Infektion als Ursache eines Infektkrampfes bei einem 16 monatigen Kind.⁹ Caserta fand bei 6 von 8 Kindern mit der Diagnose Infektkrampf HHV-7 mit der PCR und Virusisolation in PBMC.¹¹³

Parallel konnte HHV-6 bei einer Vielzahl von Kindern mit Fieberkrampf mit oder ohne Exanthem in Serum³, in Leukozyten des peripheren Blutes¹¹⁴ und im nicht entzündlich veränderten Liquor^{3, 115, 116} nachgewiesen werden. Zum Virusnachweis wurden die Viruskultur und in zunehmenden Maße die PCR verwendet.

5.2.4 Beeinträchtigung der Hirnnerven durch HHV-7

In dieser Arbeit wurde bei einem knapp sechsjährigen Mädchen, Patientin Nr. 5 (G. C.), mit akuter, einseitiger Fazialisparese HHV-7 DNA im Liquor nachgewiesen. Serologisch könnte eine Reaktivierung des Virus bei leichtem Anstieg der IgM- und IgG-Titer auf jeweils 1:20 vorliegen. Takasaki beschrieb bei einem erwachsenen Patienten mit gleicher Erkrankung einen Anstieg des HHV-7 spezifischen IgG-Titer und diskutierte eine akute HHV-7 Infektion (Reaktivierung) als eine mögliche Ursache für die Fazialisparese.⁷

In ähnlicher Weise wurde in dieser Arbeit bei einem gut siebeneinhalbjährigen Jungen, Patient Nr. 6 (B. T.), mit einseitigem, entzündlichen Ausfall des N. Vestibularis HHV-7 DNA im Liquor entdeckt. Eine alleinige Erhöhung des IgG-Titer auf 1:20 deutete eine Reaktivierung des Virus an. Thierfelder konnte bei einer Patientin mit akuter Lähmung des M. trochlearis serologisch eine akute HHV-6B Infektion nachweisen, die er ursächlich mit der Lähmung des vierten Hirnnerven in Zusammenhang brachte.¹¹⁷ Bei isolierten entzündlichen Hirnnervenerkrankungen wurde ein HHV-7 DNA Nachweis bisher noch nicht beschrieben.

5.2.5 Infektion von neuronalem Gewebe durch HHV-7

Chan beschrieb den Nachweis von HHV-7 DNA im neuronalen Gewebe von primären Gehirntumoren mit der PCR. Eine ätiologische Rolle wurde nicht diskutiert. Jedoch zeigte sich, daß HHV-7 ebenfalls neuronales Gewebe infizieren kann.⁴⁹ Kempf konnte mit immunohistochemischen Methoden HHV-7 Proteine in verschiedenen Geweben nachweisen (Dermis, Lungen-, Brustdrüsen-, Leber-, Nieren- und Tonsillenparenchym). Zellen des ZNS exprimierten allerdings das Tegumentprotein „pp85“ als Zeichen einer persistierenden Infektion nicht.⁷¹ Eine intrathekale Antikörperproduktion als Hinweis auf intrazerebrale Infektion wurde bisher einmalig durch Torigoe beschrieben.⁶ In der bisher veröffentlichten Literatur ist eine akute Infektion von neuronalem Gewebe nicht sicher beurteilbar. Wie beim nächsten Verwandten HHV-6 ist eine solche akute Infektion aber denkbar. HHV-6 konnte zumindest in vitro eine direkte Infektion von Megakaryozyten und Neuronen verursachen.²⁴ Die Verbindung von neurologischer Erkrankung wie Enzephalitis/Enzephalopathie und Infektkrampf zum positiven Virusnachweis in Serum und Liquor und zur neurologischen Infektion besteht für HHV-6.

Die Eintrittspforte von HHV-7 in das ZNS könnte während der primären Infektion in früher Kindheit die Blut-Hirn-Schrankenstörung bei Virämie bzw. der Transport des Virus über die Blut-Hirn-Schranke durch latent infizierte T-Lymphozyten sein. Werden diese im Erkrankungsfall aktiviert, produzieren sie infektiöses Virus und können so zur intrathekalen Virusreaktivierung und neurologischen Erkrankung mit z. B. rezidivierenden Infektkrämpfen führen.^{5, 8, 118} Unter den 5 HHV-7 DNA positiven Patienten mit serologischer Abklärung konnte bei den beiden jüngsten Patienten serologisch eine primäre HHV-7 Infektion nachgewiesen werden. Bei 3 weiteren Patienten zeigte die Antikörperkonstellation eine mögliche Reaktivierung der HHV-7 Infektion (siehe Tabelle 15). Dies entsprach auch dem Alter der Patien-

ten, da eine primäre Infektion in der Regel in den ersten beiden Lebensjahren abläuft (siehe Abbildung 4).

5.2.6 statistische Beurteilung der Verteilung der HHV-7 positiven Patienten

Alle sechs Patienten mit positivem HHV-7 DNA Nachweis im Liquor entstammen der Studiengruppe. Bei Patienten ohne umschriebene neurologische Erkrankung (Kontrollgruppe) konnte kein Virus im Liquor festgestellt werden. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Häufigkeit des HHV-7 DNA Nachweises im Liquor zwischen Studiengruppe und Kontrollgruppe konnte mit dem Chiquadrattest und den hier vorliegenden Zahlen nicht nachgewiesen werden. Allerdings kann der Test einen solchen Zusammenhang auch nicht ausschließen. Aufgrund der geringen Patientenzahl und der Einschlußkriterien in die Untersuchung ist dieses Ergebnis nicht sicher auf die Allgemeinheit übertragbar. In einer prospektiven Studie mit größeren Patientenzahlen könnte dieser Zusammenhang nochmals untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Humanes Herpesvirus Typ 7 wurde bisher mit verschiedenen fieberhaften Erkrankungen im Kindesalter in Verbindung gebracht. Typischerweise kann HHV-7 exanthematische Erkrankungen verursachen, in wenigen Fällen konnte ein Zusammenhang mit neurologischen Komplikationen beobachtet werden. Unter anderem wurden Fieberkrämpfe, temporäre Hemiparesen oder Meningitiden beschrieben. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob HHV-7 im Liquor pädiatrischer Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen auch ohne Exanthema subitum nachgewiesen werden kann.

Dazu wurde ein hochsensitives Nachweisverfahren bestehend aus DNA-Präparation und nested-PCR entwickelt. Nach Demonstration seiner hohen Sensitivität und Spezifität wurden mit dem Verfahren insgesamt 104 Liquorproben untersucht. Bei 6 Patienten konnte HHV-7 DNA im Liquor nachgewiesen werden. Die Krankheitsverläufe dieser Patienten wurden dargestellt und mit den wenigen, bisher in der Literatur beschriebenen Infektionen verglichen. Parallel erfolgte ein Vergleich mit Infektionen des nächsten Verwandten HHV-6.

HHV-7 scheint sowohl bei der Primärinfektion als auch bei der Reaktivierung in das ZNS einzudringen und dort zu neurologischen Komplikationen führen zu können. Dies geschieht offensichtlich unabhängig vom Vorliegen eines Virusexanthems (z. B. Exanthema subitum). Wie bei HHV-6 ist ein breites Spektrum an neurologischen Komplikationen möglich. In dieser Untersuchung konnte erstmalig HHV-7 im Liquor von Patienten mit aseptischer Meningitis, ADEM, Infektkrampf, einseitiger peripherer Fazialisparese und einseitiger Störung des N. vestibularis nachgewiesen werden. Bei 3 Patienten lag dabei eine entzündliche Liquorveränderung vor. Alle 6 HHV-7 positiven Patienten waren unter den 67 Patienten der Studiengruppe zu finden. In keiner der 37 Liquorproben der Kontrollgruppe ließ sich das Virus detektieren. Bei Patienten mit neurologischen Komplikationen im Rahmen fieberhafter viraler Erkrankungen mit und ohne Exanthem muß an HHV-7 als Ursache gedacht werden.

7 Tabellen der Gruppen I-V

7.1 Tabelle 17: Patienten der Gruppe I

Entnahmejahr	Nr.	Geschlecht	Geburtsdatum	Entnahmedatum	Alter (Jahre)	Diagnosen	Anamnese	Begleiterkrankung	Liquorprotein (mg/dl)	Liquorzellen (Zellen/ μ l)
96	997	m	07.06.1995	02.05.1996	0,9	aseptische Meningitis		septisch, mit Lymphadenitis coli	43	11
94	2670	m	20.08.1994	05.12.1994	0,2	aseptische Meningitis	vor 2 Tagen Kontakt zu HSV	Rola-Gastroenteritis	58	22
94	1235	w	20.01.1987	18.05.1997	10	aseptische Meningitis	meningeal, Kopfschmerz	Gastroenteritis, Erbrechen	37	11
94	2382	w	25.08.1989	04.10.1994	5,1	aseptische Meningitis		Rhinitis	55	237
94	2753	m	26.08.1987	21.11.1994	7,2	aseptische Meningitis			47	650
96	1692	m	18.06.1995	11.08.1996	1,1	aseptische Meningitis			18	101
94	M.K.	w	02.04.1988	18.11.1994	6,6	aseptische Meningitis			21	24
97	1621	m	30.06.1989	03.12.1997	8,4	aseptische Meningitis			118	289
96	1626	m	25.04.1994	01.08.1996	2,2	aseptische Meningitis			51	2000
94	2658	w	26.11.1980	03.12.1994	14	Enzephalitis	Grand Mal-Anfall	Schlaganfall/Herpes labialis	28	6
94	2517	m	12.10.1987	23.10.1994	7	Enzephalitis	tonisch klonische Anfälle	Rezidivierende Anfälle	36	7
96	1704	m	14.05.1996	12.08.1996	0,2	Enzephalitis	Rezidivierende Anfälle	Harnwegsinfekt	107	85
94	1509	m	18.01.1994	19.06.1994	0,4	Enzephalitis	Krampfanzfall		20	21
97	1748	m	27.01.1992	04.10.1997	5,6	Enzephalitis	Krampfanzfall	Salmonellen Enteritis	22	8
95	R.M.	w	09.04.1978	21.05.1995	17	Enzephalitis	Ataxie, Somnolenz		44	20
95	1740	m	02.07.1989	12.10.1996	7,2	Enzephalitis			69	18
95	E.L.	w	03.01.1982	30.04.1995	13	Enzephalitis	Krampfanzfall, Hemiparese links		16	10
96	H.D.	m	22.10.1992	05.01.1996	3,2	ADEM	Krampfanzfall, Meningismus		40	6
94	A.C.	w	12.06.1987	14.12.1994	7,6	ADEM			69	52
95	C.J.	m	29.07.1987	18.04.1995	7,7	ADEM	meningeal, fokale Anfälle		25	67
94	2455	m	18.07.1986	10.10.1994	8,2	enzündliche Neuropathie	Amparese bds., Schmerz	URTl, z. m. Impfung dT	58	7
96	1593	w	06.06.1987	29.07.1996	8,9	GBS, Hirnnerveparese	Tetraparese, Ophthalmoplegie	EBV-Infektion, v.a. Lyme Borreliose	27	9
96	1562	w	24.07.1994	24.07.1996	2	GBS-abortive Form	Ataxie/Schwäche beider Beine	febriliter Virusinfekt	210	0
97	560	m	15.05.1993	17.03.1997	3,8	GBS	Ataxie/Schwäche beider Beine	URTl vor 2 Wochen	94	0

ADEM: akute demyelinisierende Enzephalo-Myelopathia; GBS: Guillain-Barré-Syndrom; URTl: infektiöser/bakterieller Atemwegs; dT: Impfung gegen Diphtherie und Wundstarrkrampf; grau hinterlegt: HHV-7 positive PCR;

7.2 Tabelle 18: Patienten der Gruppe II

Entnahmejahr	Nr	Geschlecht	Geburtsdatum	Entnahmedatum	Alter (Jahre)	Diagnose	Familienanamnese und Risikofaktoren	Begleiterkrankungen	maximale Körpertemperatur (°C)	Anfallsdauer (Minuten)	Liquoreiweiss (mg/dl)	Liquorzellen (Zellen/ μ l)
94	800	m	02.05.1992	30.03.1994	1,9	K, 1.			38,5	1	N	Z
94	455	w	02.03.1993	19.02.1994	0,9	K, 1.	Meningismus		40,4	3	N	1
94	809	w	25.04.1993	01.04.1994	0,9	K, 1.		URTI	<A	0	N	1
94	1608	m	24.05.1994	02.07.1994	0,1	K, 1.	Meningismus	Virusinfekt, Exanthema subitum	39,4	10	N	N
94	2018	m	29.08.1991	20.08.1994	2,9	K, 1.			38,5	1	15	0
94	2462	w	29.09.1993	14.10.1994	1	K, 1.			40	3	N	N
94	972	m	28.05.1993	25.04.1994	0,9	K, 1.		Z. n. Impfung, Gastroenteritis	38,1	1	17	1
94	15	w	27.05.1990	03.01.1994	3,6	K, 1.	Z. n. H. influenza B Meningitis	Otitis media	<A	2	44	2
94	459	w	16.08.1991	19.02.1994	2,5	K, 1.		Scharlach	40	5	N	0
95	459	m	12.06.1994	23.02.1995	0,6	K, 1.		Gastroenteritis	40	2	N	N
95	412	m	11.07.1986	20.02.1995	8,6	K, 1.		Mykoplasmenpneumonie	40	1	N	2
96	2587	w	29.10.1996	11.12.1996	0,1	K, 1.		URTI, HWI	39,7	4	21	0
96	1681	w	26.04.1993	08.08.1996	3,2	K, 1.			<A	1	N	N
97	253	m	08.03.1986	31.01.1997	0,8	K, 1.	Onkelims Epilepsie	Pneumonie	39	1	N	0
97	1705	m	30.03.1986	29.09.1997	1,4	K, 1.		URTI	39,7	1	25	0
97	255	w	07.04.1993	31.01.1997	3,8	K, 1.			<A	1	N	N
95	1919	m	08.08.1994	09.11.1995	1,2	K, 1.			38,1	1	N	0
96	2600	w	01.10.1995	11.12.1996	1,1	K, 1., kompl		URTI	40	30	15	2
96	301	w	18.11.1994	01.03.1996	1,2	K, 1., kompl	3x rezidiert	URTI, Tuberkulose	40	10	13	N
95	2099	w	25.12.1993	28.11.1995	1,9	K, 1., kompl	Epilepsie der Mutter		38,5	1	N	N
94	1582	m	05.10.1986	29.06.1994	7,7	K, 1., kompl	rezidivierende Arrhätie		39	0	N	0
95	526	m	02.05.1985	05.03.1995	9,8	K, 1., kompl			40	2	N	1
95	669	w	11.11.1993	21.03.1995	1,3	K, 2.		URTI	39,6	1	N	1
96	1648	m	25.02.1994	04.08.1996	2,4	K, 2.	1. Anfall 95	URTI, Otitis media	39,9	1	N	0
96	1690	w	25.07.1990	11.08.1996	6	K, 2., kompl	1. IK im 6. Lebensmonat		39	10	N	0
94	681	m	08.12.1988	17.03.1994	5,2	K, 2., kompl	kompliziert	Vaccellen	39,1	20	21	5

URTI: Infekt der oberen Atemwege, HWI: Harnwegsinfekt; ms: mütterlicherseits; k.A. keine Angaben; N: altersentsprechender Normwert;
 IK: Infektkrampf; IK, kompl.: komplizierter IK; grau hinterlegt: HIV-7 positive PCR

7.3 Tabelle 19: Patienten der Gruppe III

Abnahmejahr	Nr.	Geschlecht	Geburtsdatum	Entnahmedatum	Alter (Jahre)	Diagnose	Symptomatik und Anamnese	Begleiterkrankung	Liquorprotein (mg/dl)	Liquorzellen (Zellen/ μ l)
94	813	w	05.10.1988	03.04.1994	5,4	Migraine accompagnée	rechtssseitige Hemiparese		17	0
96	2226	m	25.11.1988	21.10.1996	7,9	zweizeitiger Hirninfarkt	Aphasie, Parese rechts		13	2
96	2503	m	12.08.1996	26.11.1996	0,2	hypoxischer Hirnschaden, Krämpfe	rezedivierende Anfälle, mentale Retardation	Z. n. postnataler Reanimation	N	N
94	1365	w	05.12.1987	30.05.1994	6,4	spontane Parese N. Abducens links	Abducensparese links		N	N
96	1944	m	02.11.1990	18.09.1996	5,8	spontane periphere Parese N. facialis links	Facialisparese links		N	3
94	1719	m	25.05.1986	15.07.1994	8,1	periph Neuropathie, V. a. GBS	sensomotorische Störung/Schmerz einseitig	Gastroenteritis	11	N
97	541	w	18.08.1986	13.03.1997	11	Parese N. okulomotorius/abducens beidseits	Plöse beidseits		10	1
97	581	w	15.03.1993	20.03.1997	4	Miller-Fisher-Syndrom	Strabismus, Gangataxie	feinpapuläres Exanthem	N	0
97	601	w	07.05.1994	24.03.1997	2,8	akuter peripherer Ausfall N. vestibulokoklears	Schwindel, Gangataxie		N	0
97	1505	m	08.02.1991	16.08.1997	6,5	Halbseitenlähmung	temporäre Halbseitenlähmung		N	3
94	1427	w	24.02.1994	06.06.1994	0,2	Krampfanzfall	Tuberöse Hirnisklerose bekannt		40	0
95	1831	m	12.10.1992	27.10.1995	3	Krampfanzfall			31	4
96	1943	m	15.01.1996	18.09.1996	0,6	Krampfanzfall		URTI ohne Fieber	13	1
95	365	m	28.11.1993	13.02.1995	1,2	Krampfanzfälle			10	1
94	1530	m	06.02.1994	21.06.1994	0,3	BNS-Anfälle			N	3
97	28	w	16.02.1991	02.01.1997	5,8	Facialis-Parese			15	0
97	1189	m	08.11.1989	18.06.1997	7,6	Ausfall N. Vestibularis	Schwindel, Fallneigung		N	0

N: altersentsprechender Normalwert; URTI: Infekt der oberen Atemwege; grau hinterlegt: HHV-7 positive PCR

7.4 Tabelle 20: Patienten der Gruppe IV

Abnahmejahr	Nr.	Geschlecht	Geburtsdatum	Entnahmedatum	Alter (Jahre)	Diagnose	Symptomatik	Begleiterkrankung	Liquorprotein (mg/dl)	Liquorzellen (Zellen/ μ l)
94	541	m	31.10.1993	21.02.1994	0,3	Pneumonie	gen. Anfall	bekannte Epilepsie	N	0
95	381	w	21.10.1989	15.02.1995	5,3	Virusinfekt			N	2
96	1693	w	03.09.1995	18.08.1996	0,9	Virusinfekt hochfieberhaft	meningeal	Virusinfekt, Fieber	N	2
96	1739	m	15.07.1994	16.08.1996	2	Virusinfekt hochfieberhaft	meningeal	Virusinfekt, Fieber	10	3
96	2073	m	28.06.1992	05.10.1996	4,2	Virusinfekt hochfieberhaft	meningeal	hohes Fieber	10	1
97	1498	w	31.12.1996	14.08.1997	0,6	Virusinfekt hochfieberhaft	meningeal	Virusinfekt, Fieber	N	0
96	2129	m	29.09.1995	12.10.1996	1	Gastroenteritis			16	3
94	68	w	29.09.1993	08.01.1994	0,2	Gastroenteritis			N	N
97	1013	m	19.02.1982	23.05.1997	15	Gastroenteritis Yers. enterocolica	meningeal	Gastroenteritis	N	0
94	757	m	04.12.1992	24.03.1994	1,3	Gastroenteritis durch Rota-Viren		Gastroenteritis	N	N
96	2008	m	14.10.1991	27.09.1996	4,9	Salmonellenenteritis	meningeal, AZ	Salmonellenenteritis	19	1
97	254	m	15.04.1985	30.01.1997	12	JRTI	Somnolent	URTI	16	2
94	3063	w	24.12.1993	23.12.1994	0,9	JRTI	meningeal	hohes Fieber, URTI	N	0
94	877	w	26.10.1993	11.04.1994	0,4	JRTI	muskuläre Hypotonie	Gastroenteritis, URTI	N	0
97	1840	w	07.01.1997	02.03.1997	0,1	JRTI	Atemnotanfall	Rhinitis	N	N
96	2338	w	28.05.1996	22.01.1998	1,6	JRTI	AZ-Verschlechterung	Windeldermatitis	N	N
96	135	m	02.10.1995	16.01.1996	0,2	JRTI			N	0
96	172	w	05.09.1992	23.01.1996	3,3	JRTI	gen Anfälle	URTI	N	0
96	824	w	19.04.1995	13.04.1996	0,9	JRTI			N	N
96	887	m	13.07.1993	18.04.1996	2,7	Stomatitis apitosa, Dehydratation			N	N
94	33	m	13.06.1979	04.01.1994	15	Harnwegsinfekt, Glomerulonephritis		path. Urinbefund	44	0
97	1303	w	25.11.1989	07.07.1997	7,6	Borreliose	zunehmende Kopfschmerzen	Z. n. Zeckenbiß vor 8 Wochen	10	1
97	1260	m	29.05.1986	01.07.1997	11	Lyme Borreliose Stadium I, Kopfschmerz	Kopfschmerz		N	N
96	1083	w	15.07.1994	17.05.1996	1,8	kongenitale CMV-Infektion	meningeal	URTI, Pseudomembranöse Colitis	N	0
94	1391	w	20.04.1993	25.05.1994	1	CMV-Pneumonie			N	N
97	89	w	05.01.1988	09.01.1997	9	akute EBV-Infektion	AZ-Verschlechterung, Schmerzen		13	1

N: altersentsprechender Normalwert, URTI: Infekt der oberen Luftwege, AZ: Allgemeinzustand.

7.5 Tabelle 21: Patienten der Gruppe V

Abnahmejahr	Nr.	Geschlecht	Geburtsdatum	Entnahmedatum	Alter (Jahre)	Diagnose	Familienanamnese und Risikofaktoren	Begleiterkrankung	Liquorprotein (mg/dl)	Liquorzellen (Zellen/ μ l)
97	1500	m	13.01.1986	14.08.1997	12	Migräne	Kopfschmerzrezidiv	unklares Fieber	30	2
96	288	w	27.07.1989	31.01.1996	6,5	Migräne		Harnwegsinfekt	N	N
97	446	w	14.07.1982	18.02.1997	15	Konversions-Syndrom	sensomotorische Störung Beine bds.		N	N
96	2195	m	08.02.1990	17.10.1996	6,6	Konversions-Syndrom	Diplopie, rezidivierende Anisokorie	Verschlechterung des AZ, Müdigkeit	N	3
97	319	m	10.01.1996	04.03.1997	1,1	rheumatische Erkrankung	reduzierter AZ, Tachypnoe	Z. n. Schwellung an Sprunggelenken bds.	N	0
96	1691	m	29.08.1994	30.08.1996	2	Z. n. hypoxischem Hirnschaden	peripartale Asphyxie, Hydrozephalus	rezidivierende Bronchitiden/Aspirationen	N	N
94	1882	m	06.02.1987	03.08.1994	7,4	Ausschluß Meningitis	frontaler Kopfschmerz	bekannte Retardierung nach Asphyxie	N	N
96	40	m	04.09.1995	04.03.1996	0,5	unklare muskuläre Hypotonie	Hypotonie, Müdigkeit	Obstipation	N	N
97	1587	w	26.08.1997	28.08.1997	2d	unauffällig, (Ausschluß konnat. TBC)	aktive Tuberkulose der Mutter		N	N
96	2601	w	24.11.1996	02.01.1997	0,1	Klassische Galactosämie	reduzierter AZ		N	N
95	2257	m	15.03.1989	20.12.1995	6,7	Uveitis intermedia	Sehstörung, Ausschluss MS		N	3

MS: Multiple Sklerose, AZ: Allgemeinzustand; d: Tage, N: altersentsprechender Normwert;

8 Verzeichnisse

8.1 verwendete Abkürzungen

ACV	Acyclovir
ADEM	akute disseminierte Enzephalomyelopathie
AE	Puffer AE (Qiagen, Deutschland)
AIDS	acquired immun deficiency syndrome
AK	Antikörper
b p	base pairs, Basenpaare
CBMC	cord blood mononuclear cells, Leukozyten aus Nabelschnurblut
cCT	craniale Computertomographie
CD	cluster of defferentiation, Leukozytenmarker
CDC	Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA
CPE	cytopathic effekt, zytopathischer Effekt
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Englisch: „desoxyribonucleic acid“)
dNTP	desoxynucleotide triphosphate
DP	DNA-Präparation
dsDNA	double stranded desoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EEG	Elektro-Enzephalogramm
ELISA	enzyme linked immuno sorband assay
ES	Exanthema subitum, „Dreitagefieber“
Ext 1/2	Externe Primer 1 und 2 der nested PCR
GBS	Guillain-Barrè-Syndrom
GCV	Gancyclovir
HCMV/CMV	humanes Cytomegalovirus
hgDNA	Hintergrund-DNA
HHV	humanes Herpesvirus
HHV-6A/B	humanes Herpesvirus Typ 6A/6B
HHV-7	humanes Herpesvirus Typ 7
HHV-8	humanes Herpesvirus Typ 8
HIV	human immunodeficiency Virus
HSV-1/2	Herpes Simplex Virus Typ 1/2
IB	immuno blot
IFA/IFT	Immuno fluorescence assay/Immunfluoreszenztest

IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IK	Infektkrampf
Int 1/2	Interne Primer 1 und 2 der nested PCR
LB-Medium	Lurima-Bertami
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	Längenmarker (123bp)
MCS	multiple cloning site
Molt 3	neoplastische CD4 Zelllinie
MRT	Magnetresonanztomogramm
nPCR	nested PCR
OD	optische Dichte
ORI	Origin of Replication
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, Bluteukozyten
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasenkettenreaktion
pp85	Phosphoprotein mit einer Größe von 85 kDa
RIA	radio immuno assay
Sup-T1	neoplastische Non-Hodgkin-Lymphomzelllinie
TBE	Tris-Borat-EDTA (Pufferlösung)
TID	tissue infectious dose
VZV	Varizellen Zoster Virus
ZNS	zentrales Nervensystem

8.2 wichtige Lieferanten für Laborbedarf

BIOS, Gräfelfing bei München, BRD

- HHV-7 IgM- und IgG-ELISA

Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland

- Hintergurnd DNA (Poly-T und Poly-A-Ketten unterschiedlicher Länge)
- Restriktionsenzyme Sau 3A bzw. Ita I
- E. coli Stamm MC1061
- LB-Medium
- Ethidium Bromid
- Bromphenolblau

Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA

- DH10B-Zellen
- Längenstandard 123-bp

F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz

Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA

- Thermal Cycler 9600
- Taq Polymerase Gold
- Magnesium Chlorid

MWG biotech AG, München/Ebersberg, Deutschland

- Primer Ext 1/2 und Int 1/2

Qiagen, Hilten, Deutschland

- QIAmp Blood Kit
- Qiamp Plasmid Kit
- Lagerungspuffer AE

Pharmacia Biotech, Peapack, NJ, USA (jetzt Amersham Biosciences)

- DNA Polymerization Mix (dNTP-Gemisch)

9 Literatur

9.1 verwendete Bücher

Poeck K, Neurologie
Springer-Verlag
Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Hong Kong, Barcelona, Budapest
9. Auflage 1994

Poeck K, Neurologie
Springer Verlag
Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Hong Kong, Barcelona, Budapest
10. vollst. überarbeitete Auflage 1998

Hahn H (Hrsg.), Falke D, Klein P, Medizinische Mikrobiologie
Springer-Verlag
Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Hong Kong, Barcelona, Budapest;
1991

Sanford J, Gilbert D, Sande M
Guide to Antimicrobial Therapie
26th Edition 1996

Harms F, Biomathematik, Statistik und Dokumentation
Harms-Verlag Kiel
5. Auflage 1988

Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning
Cold Spring Harbour Laboratory Press,
Second Edition 1989

Harrison's Principles of Internal Medicine
McGraw-Hill
12th Edition 1991

Keller/Wiskott, Betke K, Künzer W (Hrsg.), Lehrbuch der Kinderheilkunde
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
5., neubearbeitete Auflage 1984

Gleixner C, Müller M, Wirth S, Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis
Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach/Rh.
1. Auflage 98/99

Hufschmid A, Lücking CH, Neurologie compact
Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, New York
2000

9.2 Internet-Adressen

National Center for Biotechnology Information, NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov

Pedro's Research Tools (Pedro Coutinho):
www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html

„Webcutter“: www.medkem.gu.se/cutter

medline at NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov

9.3 Literaturverzeichnis

- ¹ Hahn H, Falke D, Klein P (Hrsg.)
Medizinische Mikrobiologie,
Springer Verlag 1991, Berlin Heidelberg New York,
Kapitel VIII/3 Stadien der Virusvermehrung
- ² Bergstrom T
Polymerase chain reaction for diagnosis of varicella zoster virus central nervous system infections without skin manifestations
Scand J Infect Dis Suppl 1996; 100: 41-5
- ³ Suga S, Yoshikawa T, Asanno Y, Kozawa T, Nakashima T, Kobayashi I, Yazaki T, Yamamoto H, Kajita Y, Ozaki T, Nishimura Y, Yamanaka T, Yamada A, Imanishi J
Clinical and Virological Analyses of 21 Infants with Exanthem Subitum (Roseola Infantum) and Central Nervous System Complications
Ann Neurol 1993; 33: 597-603
- ⁴ Portolani M, Cermelli C, Mirandola P, Di Luca D
Isolation of human herpesvirus 7 from an infant with febrile syndrome
J Med Virol 1995 Mar; 45(3): 282-3
- ⁵ van den Berg JSP, van Zeijl JH, Rotteveel JJ, Melchers WJG
Gabreels FJM, Galama JMD
Neuroinvasion by human herpesvirus type 7 in a case of exanthema subitum with severe neurologic manifestations
Neurology 1999; 52: 1077
- ⁶ Torigoe S, Koide W, Yamada M, Miyashiro E, Tanaka-Taya K, Yamanishi K
Human herpesvirus 7 infection associated with central nervous system manifestations
J Ped 1996 August; 129(2): 301-5
- ⁷ Takasaki T, Higashikawa M, Motoyama S, Sugita K, Kurane I
Serum antibodies to human herpesvirus 7, human herpesvirus 6 and cytomegalovirus in patients with idiopathic facial nerve palsy or sudden deafness
J Laryngol Otol 1998; 112(7): 617-21
- ⁸ Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Matsubara T, Furukawa S, Asano Y
Invasion by human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 of the central nervous system in patients with neurological signs and symptoms
Arch Dis Child 2000 Aug; 83(2): 170-1
- ⁹ Torigoe S, Kumamoto T, Koide W, Taya K, Yamanishi K
Clinical manifestations associated with human herpesvirus 7 infection
Arch Dis Child 1995 Jun; 72(6): 518-9
- ¹⁰ Chiu HH, Lee CY, Lee PI, Lin KH, Huang LM
Mononucleosis syndrome and coincidental human herpesvirus-7 and Epstein-Barr virus infection
Arch Dis Child 1998 78: 479-480
- ¹¹ Drago F, Raniere E, Malaguti F, Battifoglio ML, Losi E, Rebora A
Human herpesvirus 7 in patients with pityriasis rosea. Electron microscopy investigations and polymerase chain reaction in mononuclear cells, plasma and skin
Dermatology 1997 195(4): 374-378
- ¹² Offringa M, Bossuyt PMM, Lubsen J, Ellenberg JH, Nelson KB, Knudsen FU,

-
- Annegers JF, el-Radhi ASM, Habbema JDF, Derksen-Lubsen G, Hauser WA, Kurland LT, Banaheh SMA, Larsen S
Risk factors for seizure recurrence in children with febrile seizures: a pooled analysis of individual patient data from five studies
J Pediatr. 1994 Apr; 124(4): 578-84
- 13 Nelson KB, Ellenberg JH
Predictors of epilepsy in children who have experienced febrile seizures
N Engl J Med 1976, 295: 1029-33
- 14 Nelson KB, Ellenberg JH
Prognosis in children with febrile seizures
Pediatrics 1978, 61: 720-7
- 15 Annegers JF, Hauser WA, Shirts SB, Kurland LT
Factors prognostic of unprovoked seizures after febrile convulsions
N Engl J Med 1987 Feb 26; 316(9): 493-8
- 16 Tsai ML, Hung KL
Risk factors for subsequent epilepsy after febrile convulsions
J Formos Med Assoc 1995 Jun; 94(6): 327-321
- 17 Gubser M, Blumbert A, Donati F
Febrile convulsions: assessment of current status
Schweiz Med Wochenschr 1999 May 1; 129(17): 649-57
- 18 Annegers JF, Blakley SA, Hauser WA, Kurland LT
Recurrence of febrile convulsions in a population-based cohort
Epilepsy Res 1990 Apr; 5(3): 209-16
- 19 Rantala H, Uhari M, Tuokko H
Viral infections and recurrences of febrile convulsions
J Pediatr 1990 Feb; 116(2): 195-9
- 20 Rantala H, Uhari M
Risk factors for recurrences of febrile convulsions
Acta Neurol Scand 1994 Sep; 90(3): 217-10
- 21 Berg AT, Shinnar S, Hauser WA, Alemany M, Shapiro ED, Salomon ME, Crain EF
A prospective study of recurrent febrile seizures
N Engl J Med 1992 Oct 15; 327(16): 1122-7
- 22 El-Radhi AS
Lower degree of fever at the initial febrile convulsion is associated with increased risk of subsequent convulsions
Europ J Paediatr Neurol 1998 2(2): 91-6
- 23 Kondo K, Nagafuji H, Hata A, Tomomori C, Yamanishi K
Association of Human Herpesvirus 6 Infection of the Central Nervous System with Recurrence of Febrile Convulsions
J Infect Dis 1993 167: 1197-200
- 24 Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, McIntyre K, Long C, Costanzo M, Dehurst S, Insel R, Epstein LG
Neuroinvasion and Persistence of Human Herpesvirus 6 in Children
J Infect Dis 1994 170: 1586-9
- 25 Teach SJ, Wallace HL, Evans MJ, Duffner PK, Hay J, Faden HS

-
- Human Herpesviruses types 6 and 7 and febrile seizures
Pediatr Neurol 1999 Oct; 21(4): 699-703
- ²⁶ Huang LM, Lee CY, Lee PI, Chen JM, Wang PJ
Meningitis caused by human herpesvirus-6
Arch Dis Child 1991 Dec; 66(12): 1443-4
- ²⁷ Sanford J, Gilbert D, Sande M
Guide to antimicrobiologic therapy
2000/2001
- ²⁸ Poeck K, Neurologie
Springer-Verlag
9. Auflage, 1994, Kapitel 9, Seite 295-329
- ²⁹ Mitchell PS, Espy MJ, Smith TF, Toal DR, Rys PN, Barbari EF,
Osman DR, Persing DH
Laboratory diagnosis of central nervous system infections with herpes simplex virus by
PCR performed with cerebrospinal fluid specimens
J Clin Microbiol 1997 Nov; 35 (11): 2873-7
- ³⁰ Read SJ, Kurtz JB
Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using
a single multiplex PCR screening assay
J Clin Microbiol 1999 May; 37(5): 1352-5
- ³¹ Guffond T, Dewilde A, Lobert P-E, Caparros-Lefebvre D, Hober D, Wattre P
Significance and clinical relevance of the detection of herpes simplex virus DNA by the
polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from patients with presumed
encephalitis
Clin Infect Dis 1994; 18: 744-49
- ³² Lakeman FD, Whitley RJ, and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases
Collaborative Antiviral Study Group
Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to
cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease
J Infect Dis 1995; 171: 857-63
- ³³ Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, Katsafanas G, Roffman E, Danovich RM, June CH
Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells
Proc Natl Acad Sci USA Jan 1990, Vol 87, 748-752,
- ³⁴ Berneman ZN, Gallo RC, Ablashi DV, Frenkel N, Katsafanas G, Kramarsky B, Brus I
Human herpesvirus 7 (HHV-7) strain J1: independent confirmation of HHV-7 [letter]
J Infect Dis 1992 Sep; 166(3): 690-1
- ³⁵ Hahne H, Falke D, Klein P, Medizinische Mikrobiologie
Springerverlag 1991
Kapitel VIII/ 1; Seite 615
- ³⁶ Klussmann JP, Krueger E, Sloots T, Berneman Z, Arnold G, Krueger GR
Ultrastructural study of human herpesvirus-7 replication in tissue culture
Virchows Arch 1997 May; 430(5): 417-26
- ³⁷ Megaw AG, Rapaport D, Avidor B, Frenkel N, Davison AJ
The DNA sequence of the RK strain of human herpesvirus-7
Virology 1998 Apr 25; 244(1): 119-32

-
- ³⁸ Pfeiffer B, Thomson B, Chandran B
Identification and Characterization of a cDNA Derived from Multiple Splicing That Encodes Envelope Glycoprotein gp105 of Human Herpesvirus 6
J Virol, 1995; 69(6): 3490-3500
- ³⁹ Nicholas J
Determination and analyses of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus-7
direct submission to the NCBI GenBankTM
- ⁴⁰ Ablashi DV, Berneman ZN, Kramarsky B, Asano Y, Choudhury S, Pearson GR
Human herpesvirus-7 (HHV-7)
In Vivo 1994; 8: 549-554
- ⁴¹ Mukai T, Isegawa Y, Yamanishi K
Identification of the major capsid protein gene of human herpesvirus 7
Virus Res 1995 Jun; 37(1): 55-62
- ⁴² Nicholas J
Determination and Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of Human Herpesvirus 7
J Virol 1996 Sep; 70(9): 5975-89
- ⁴³ Hahn H, Falke D, Klein P, Medizinische Mikrobiologie
Springer-Verlag,
Kapitel IV/4, Seite 144ff
- ⁴⁴ Yasukawa M, Yakushijin Y, Furukawa M, Fujita S
Specificity analysis of human CD4+ T-cell clones directed against human herpesvirus 6 (HHV-6), HHV-7, and human cytomegalovirus
J Virol 1993 Oct; 67(10): 6259-64
- ⁴⁵ Foà-Tomasi L, Avitabile E, Ke L, Campadelli-Fiume G
Polyvalent and monoclonal antibodies identify major immunogenic proteins specific for human herpesvirus 7-infected cells and have weak cross-reactivity with human herpesvirus 6
J Gen Virol 1994 Oct; 75 (Pt 10): 2719-27
- ⁴⁶ Black JB, Schwarz TF, Patton JL, Kite-Powell K, Pellett PE, Wiersbitzky S, Bruns R, Müller C, Jäger G, Stewart JA
Evaluation of Immunoassays for Detection of Antibodies to Human Herpesvirus 7
Clin Diagn Lab Immunol 1996 Jan; 1(3): 79-83
- ⁴⁷ Wyatt LS, Frenkel N
Human Herpesvirus 7 Is a Constitutive Inhabitant of Adult Human Saliva
J Virol 1992 May; 66: 3206-9
- ⁴⁸ Kempf W, Adams V, Mirandola P, Menotti L, Di Luca D, Wey N, Müller B, Campadelli-Fiume G
Persistence of Human Herpesvirus 7 in Normal Tissues Detected by Expression of a Structural Antigen
J Inf Dis 1998 Sept; 178: 841-5
- ⁴⁹ Chan PK, Ng HK, Cheng AF
Detection of human herpesvirus 6 and 7 genomic sequences in brain tumors
J Clin Pathol 1999 Aug; 52(8): 620-3
- ⁵⁰ Furukawa M, Yasukawa M, Yakushihin Y, Fujita S

-
- Distinct Effects of Human Herpesvirus 6 and Humans Herpesvirus 7 on Surface Molecule Expression and Function of CD4+ T cells
J Immunol 1994; 152: 5768-75
- 51 Yasukawa M, Inoue Y, Sada E, Yakushijin Y, Furukawa M, Fujita S
CD4 down-modulation by ganglioside and phorbol ester inhibits human herpesvirus 7 infection
J Gen Virol 1995 Sep; 76(9): 2381-5
- 52 Lusso P, Secchiero P, Crowley RW, Garzino-Demo A, Berneman ZN, Gallo RC
CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: interference with human immunodeficiency virus
Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Apr 26; 91(9): 3872-6
- 53 Stevens JG
Human Herpesviruses: a Consideration of the Latent State
Microbiol Rev 1989 Sept; 318-332
- 54 Secchiero P, Berneman ZN, Gallo RC, Lusso P
Biological and Molecular Characteristics of Human Herpesvirus 7: In Vitro Growth Optimization and Development of a Syncytia Inhibition Test
Virology 1994; 202: 506-512
- 55 Secchiero P, Zella D, Crowley RW, Gallo R, Lusso P
Quantitative PCR for Human Herpesvirus 6 and 7
J Clin Microbiol 1995 Aug; 33(8): 2124-30
- 56 Hahn H, Falke D, Klein P, Medizinische Mikrobiologie
Springer-Verlag
Kapital IV, 6, Seiten 168 ff
- 57 Hahn H, Falke D, Klein P, Medizinische Mikrobiologie
Springer Verlag 1991
Kapital VIII, 10, Seiten 689ff
- 58 Sambrook, Fritsch, Maniatis
Molecular Cloning
Cold Spring Harbour Laboratory Press
Second Edition 1989
- 59 Wyatt LS, Rodriguez WJ, Balachandran N, Frenkel N
Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults
J Virol 1991 Nov; 65(11): 6260-5
- 60 Clark DA, Freeland JML, Mackie PLK, Jarrett RF, Onions DE
Prevalence of Antibody to Human Herpesvirus 7 by Age
J Infect Dis 1993; 168(7): 251-2
- 61 Yoshikawa T, Asano Y, Kobayashi I, Nakashima T, Yazaki T, Suga S, Ozaki T, Wyatt LS, Frenkel N
Seroepidemiology of human herpesvirus 7 in healthy children and adults in Japan
J Med Virol 1993 Dec; 41(4): 319-23
- 62 Tanaka K, Kondo T, Mukai T, Myoshi H, Yamamoto Y, Okada S, Yamanishi K
Seroepidemiological Study of Human Herpesvirus-6 and -7 in Children of Different Ages and Detection of These Two Viruses in Throat Swabs by Polymerase Chain Reaction
J Med Virol 1996; 48: 88-94

-
- ⁶³ Rojo J, Bonifaz R, Koch B, Krueger GRF
Erste Untersuchungen zur Durchseuchung mexikanischer Blutspender mit dem humanen Herpesvirus 7 (HHV-7)
Pathologe 1995; 16: 204-207
- ⁶⁴ Yalcin S, Karpuzoglu T, Suleymanlar G, Mutlu G, Mukai T, Yamamoto T, Isegawa Y, Yamanishi K
Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey
Arch Virol 1994; 136: 183-190
- ⁶⁵ Wilborn F, Schmidt CA, Lorenz F, Peng R, Gelderblom H, Huhn D, Siegert W
Human herpesvirus type 7 in blood donors: detection by the polymerase chain reaction
J Med Virol 1995 Sep; 47(1): 65-9
- ⁶⁶ Kidd M, Clark DA, Ait-Khaled M, Griffiths PD, Emery VC
Measurement of Human Herpesvirus 7 Load in Peripheral Blood and Saliva of Healthy Subjects by Quantitative Polymerase Chain Reaction
J Inf Dis 1996; 174: 396-401
- ⁶⁷ Black JB, Inoue N, Kite-Powell K, Zaki S, Pellett PE
Frequent isolation of human herpesvirus 7 from saliva
Virus Res 1993; 29: 91-98
- ⁶⁸ Hidaka Yasufumi, Liu Y, Yamamoto M, Mori R, Miyazaki C, Kusuhara K, Okada K, Ueda K
Frequent Isolation of Human Herpesvirus 7 From Saliva Samples
J Med Virol 1993; 40: 343-346
- ⁶⁹ Di Luca D, Mirandola P, Ravaioli T, Dolcetti R, Frigatti A, Bovenzi P, Sighinolfi L, Monini P, Cassai E
Human Herpesvirus 6 and 7 in Salivary Glands and Shedding in Saliva of Healthy Human Immunodeficiency Virus Positive Patients
J Med Virol 1995; 45: 462-468
- ⁷⁰ Portolani M, Leoni S, Guerra A, Vermelli C, Manovani G, Pietrosevoli P, Meacci M, Sabbatini AM, Pecorari M
Human herpesvirus-7 DNA in cerebrospinal fluid
Minerva Pediatr 1998; Jan 50(1-2): 39-44
- ⁷¹ Kempf W, Adams V, Mirandola P, Di Luca D, Wey N, Müller B
Persistence of human herpesvirus 7 in normal tissues detected by expression of a structural antigen
J Infect Dis 1998 Sep; 178(3): 841-845
- ⁷² Okuno T, Oishi H, Hayashi K, Nonogaki M, Tanaka K, Yamanishi K
Human Herpesviruses 6 and 7 in Cervixes of Pregnant Woman
J Clin Microbiol 1995 July; 33(7): 1968-1970
- ⁷³ Kempf W, Adams V, Hassam S, Schmid M, Moos R, Briner J, Pfaltz M
Nachweis von humanem Herpesvirus Typ 6, humanem Herpesvirus Typ 7, Zytomegalievirus und humanem Papillomviren in kutanen AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkomen
Verh Dtsch Ges Path 1994, 78, 260-264
- ⁷⁴ Fujisaki H, Tanaka-T K, Tanabe H, Miyoshi H, Okada S, Yamanishi K

- Detection of human herpesvirus 7 (HHV-7) in breast milk by polymerase chain reaction and prevalence of HHV-7 antibody in breast-fed and bottle-fed children
J Med Virol 1998 Nov; 56(3): 275-9
- ⁷⁵ Lanphear BP, Hall CB, Black J, Auinger P
Risk factors for the early acquisition of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in children
Pediatr Infect Dis J 1998 Sep; 17(9): 792-5
- ⁷⁶ Takahashi Y, Yamada M, Nakamura J, Tsukazaki T, Padilla J, Kitamura T, Yoshida M, Nii S
Transmission of human herpesvirus 7 through multigenerational families in the same household
Pediatr Infect Dis J 1997 Oct; 16(10): 975-8
- ⁷⁷ Ranger-Rogez S, Venot C, Denis F
Human herpesviruses 6 and 7 (HHV-6 and HHV-7)
Rev Prat 1999 Dec; 15 49(20): 2227-31
- ⁷⁸ Mejicano GC, Maki DG
Infections acquired during cardiopulmonary resuscitation: estimating the risk and defining strategies for prevention
Ann Intern Med 1998 Nov; 15 129(19): 813-28
- ⁷⁹ Baron S, Poast J, Cloyd MW
Why is HIV rarely transmitted by oral secretions? Saliva can disrupt orally shed infected leukocytes
Arch Intern Med 1999 Feb; 8; 159(3): 303-10
- ⁸⁰ Baron S, Poast J, Richardson CJ, Nguyen D, Cloyd M
Oral transmission of human immunodeficiency virus by infected seminal fluid and milk: a novel mechanism
J Infect Dis 2000 Feb; 181(2): 498-504
- ⁸¹ Pretty IA, Anderson GS, Sweet DJ
Human bites and the risk of human immunodeficiency virus transmission
Am J Forensic Med Pathol 1999 Sep; 20(3): 232-9
- ⁸² Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, Okada S, Mukai T, Yamanashi K
Human herpesvirus 7: Another causal agent for roseola (exanthema subitum)
J Pediatr 1994; 125 (1): 1-5
- ⁸³ Ueda K, Kusuhara K, Okada K, Miyazaki C, Hidaka Y, Tokugawa K, Yamanishi K
Primary human herpesvirus 7 infection and exanthema subitum
Pediatr Infect Dis J 1994; Feb 13(2): 167-8
- ⁸⁴ Kawa-Ha K, Tanaka K, Inoue M, Sakata N, Okada S, Kurata T, Mukai T, Yamanishi K
Isolation of human herpesvirus 7 from a child with symptoms mimicking chronic Epstein-Barr virus infection
Brit J Haematol 1993; 84: 545-548
- ⁸⁵ Drago F, Ranieri E, Malaguti F, Battifoglio ML, Losi E, Rebora A
Human herpesvirus 7 in patients with pityriasis rosea. Electron microscopy investigations and polymerase chain reaction in mononuclear cells, plasma and skin
Dermatology 1997; 195(4): 374-378
- ⁸⁶ Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction

-
- Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1986; 51 Pt 1: 263-73
- ⁸⁷ Sambrook, Fritsch, Maniatis; Molecular Cloning
Cold Spring Harbour Laboratory Press,
Second Edition 1989
- ⁸⁸ Borer PN, Dengler B, Tinoco I. Jr
Stability of Ribonucleic Acid Double-Stranded Helices
J. Mol. Biol. 1974; 86, 843-853
- ⁸⁹ Breslauer KJ, Fank R, Blöcker H, Marky LA
Predicting DNA doubles stability from the base sequence
Proc Natl Acad Sci USA 1986 June; Vol. 83, 3746-3750,
- ⁹⁰ Rychlik W, Spencer X, Rhoads RE
Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro
Nucleic Acids Research, Vol. 18, No, 21, 6409-6412
- ⁹¹ Harms V
Biomathematik, Statistik und Dokumentation
Harms Verlag Kiel
5., neubearbeitete Auflage, April 1988
Wertetafel
- ⁹² Asano Y, Suga S, Yoshikawa T, Yazaki T, Uchikawa T
Clinical Features and Viral Excretion in An Infant with Primary Human Herpesvirus 7
Infection
Pediatrics 1995 Feb; Vol. 95(2): 187-190
- ⁹³ Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B
Herpes-simplex Viruses
Clin Infect Dis 1998; 26: 541-55
- ⁹⁴ Kimberlin DW
Human herpesvirus 6 and 7: identification of newly recognized viral pathogens and their
association with human disease
Pediatr Infect Dis J 1998, 17: 59-68
- ⁹⁵ Jeffery KJM, Read SJ, Peto TEA, Mayon-White RT, Banham CRM
Diagnosis of viral infections of the central nervous system: clinical interpretation of PCR
results
Lancet 1997; 349: 313-317
- ⁹⁶ Hosoya M, Honzumi K, Sato M, Katayose M, Kato K, Suzuki H
Application of PCR for various neurotropic viruses on the diagnosis of viral meningitis
J Clin Virol 1998 Aug; 20; 11(2): 117-24
- ⁹⁷ Cinque P, Vago L, Terreni MR, Brytting M, Marenzi R, Castagna A, Lazzarin A
Diagnosis of cytomegalovirus infection of the nervous system in AIDS by polymerase
chain reaction analyses of cerebrospinal fluid
Scand J Infect Dis Suppl 1995; 99: 92-4
- ⁹⁸ Prosch S, Schielke E, Reip A, Meisel H, Volk HD, Einhaupl KM, Kruger DH
Human cytomegalovirus (HCMV) encephalitis in an immunocompetent young person
and diagnostic reliability of HCMV DNA PCR using cerebrospinal fluid of nonimmuno-
suppressed patients
J Clin Microbiol 1998 Dec; 36(12): 3636-40

-
- ⁹⁹ Iten A, Chatelard P, Vuadens P, Miklossy J, Meuli R, Sahli R, Meylan PR
Impact of cerebrospinal fluid PCR on the management of HIV-infected patients with varicella-zoster virus infection of the central nervous system
J Neurovirol 1999 Apr; 5(2): 172-80
- ¹⁰⁰ Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarria JM, Tenorio A
Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study
J Med Virol 1999 Feb; 57(2): 145-51
- ¹⁰¹ Casas I, Tenorio A, de Ory F, Lozano A, Echevarria JM
Detection of both herpes simplex and varicella-zoster viruses in cerebrospinal fluid from patients with encephalitis
J Med Virol 1996 Sep; 50(1): 82-92
- ¹⁰² Weber T, Frye S, Bodemer M, Otto M, Luke W
Clinical implications of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of viral infections of the nervous system
J Neurovirol 1996 Jun; 2(3): 175-190
- ¹⁰³ Wolf DG, Spector SA
Diagnosis of human cytomegalovirus central nervous system disease in AIDS patients by DNA amplification from cerebrospinal fluid
J Infect Dis 1992 Dec; 166(6): 1412-5
- ¹⁰⁴ Thoren A, Widell A
PCR for the diagnosis of enteroviral meningitis
Scand J Infect Dis 1994; 26(3): 249-54
- ¹⁰⁵ Sawyer MG, Holland D, Aintablian N, Connor JD, Keyser EF, Waecker NJ jr
Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak
Pediatr Infect Dis J 1994 Mar; 13(3): 177-82
- ¹⁰⁶ Harrison's Principles of Internal Medicine
McGraw-Hill
12th Edition 1991
Seite 1027
- ¹⁰⁷ Lehrbuch der Kinderheilkunde
Keller/Wiskott
Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York
5., neubearbeitete Auflage 1984
Seite 34.6
- ¹⁰⁸ Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis
Gleixner C, Müller M, Wirth S
1. Auflage 98/99
Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach/Rh.
Seite 324
- ¹⁰⁹ A. Hufschmid, C. H. Lücking,
Neurologie compact, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, New York 2000
- ¹¹⁰ Ishiguro N, Yamada S, Takahashi T, Takahashi Y, Togashi T, Okuno T, Yamanishi K
Meningo-encephalitis associated with HHV-6 related exanthem subitum
Acta Paediatr Scand 1990 Oct; 79(10): 987-9

-
- ¹¹¹ Yoshikawa T, Nakashima T, Suga S, Asano Y, Yazaki T, Kimura H, Morishima T, Kondo K, Yamanishi K
Human herpesvirus-6 DNA in cerebrospinal fluid of a child with exanthem subitum and meningoencephalitis.
Pediatrics 1992 May; 89(5 Pt 1): 888-90
- ¹¹² Torre D, Speranza F, Martegani R, Ferrante P, Omodeo-Zorini E, Mancuso R, Fiori GP
Meningoencephalitis caused by human herpesvirus-6 in an immunocompetent adult patient: case report and review of the literature
Infection 1998 Nov-Dec; 26(6): 402-4
- ¹¹³ Caserta M, Hall CB, Schnabel K, D'Heron N
Human Herpesvirus-7 (HHV-7) infections in US children
Pediatr Res 1996; 39:168
- ¹¹⁴ Barone SR, Kaplan MG, Krilov LR
Human herpesvirus-6 infection in children with first febrile convulsion
J Pediatr 1995 Jul; 127(1): 95-7
- ¹¹⁵ Kondo K, Nagafuji H, Hata A, Tomomori Ch, Yamanishi K
Association of Human Herpesvirus 6 Infection of the Central Nervous System with Recurrence of Febrile Convulsions
J Infect Dis 1993; 167: 1197-200
- ¹¹⁶ Hall CB, Long CE, Schnabel CK, Caserta MT, McIntyre KM, Cosnanzo MA, Knott A, Dewhurst S, Insel RA, Epstein LG
Human Herpesvirus-6 infection in Children. A prospective study of complications and reactivations
N Engl J Med 1994 Aug 18; 331(7): 432-438
- ¹¹⁷ Thierfelder S, Pfennigsdorf S, Grehn F
Trochlear paralysis within the scope of acute herpes hominis virus (HHV) 6 subtype B infection
Klin Monatsbl Augenheilkd 1997 Dec; 211(6): 403-5
- ¹¹⁸ Suga S, Yoshikawa T, Nagai T, Asano Y
Clinical features and virological findings in children with primary human herpesvirus 7 infection
Pediatrics 1997 Mar; 99(3): E4

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Einführung in die Problematik dieser Studie danke ich Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h. c. mult. D. Adam, ehemaliger Leiter der Abteilung für antimikrobielle Chemotherapie und Infektionsimmunologie am Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU München.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. A. Pohl-Koppe für die geduldige Begleitung über die lange Zeit der Entstehung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Labors für Virologie an der Dr. von Hauner'schen Kinderklinik, Frau Gramm und Frau Mendl, für die vielen überaus praktischen und ebenso wichtigen Ratschläge.

Nicht weniger Dank möchte ich Herrn A. Haslinger aussprechen, der mit seinem Organisationsstalent und seiner schier unerschöpflichen Energie so manches Problem bei der Laborarbeit beseitigen half.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinem Bruder und insbesondere meiner Freundin und zukünftigen Frau sehr herzlich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und unendliche Geduld.

Dachau im April 2002

Lebenslauf

Ich wurde am 13. Juni 1970 als zweiter Sohn des Schriftsetzers Heribert Blay und der Kauffrau Marianne Blay in Schwandorf/Opf. geboren. Mein Bruder, Dr. rer. nat. Karlheinz Blay, ist selbständig tätiger promovierter Chemiker in München.

Nach dem Abitur 1990 am Josef-Effner-Gymnasium in Dachau begann ich im Herbst das Studium der Humanmedizin an der LMU München.

Nach dem dritten Abschnitt der Medizinischen Prüfung im Herbst 1996 war ich von Dezember 1996 bis einschließlich Mai 1997 als AiP an der Sana-Klinik München Sendling tätig, bevor ich im Juli 1997 an die chirurgische Abteilung der Kreisklinik Dachau, Chefarzt Prof. Dr. med. B. Claudi, wechselte. Dort wurde ich nach Beendigung des AiP im Juli 1998 als Assistenzarzt in die Weiterbildung zum Chirurgen übernommen.

Von Juli 2000 bis Juli 2001 wechselte ich für ein Jahr aus eigenem Betreiben zur Erweiterung der Erfahrungen an die chirurgische Abteilung des Regionalspitals Surselva, Ilanz, Schweiz.

Seit Juli 2001 arbeite ich als Assistenzarzt der Chirurgie wieder an der Kreisklinik in Dachau und werde dort den Facharzt für Chirurgie voraussichtlich im Sommer 2002 erlangen.

Dachau, 27.3.02