

Aus dem
Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene 1
des Robert Koch-Instituts Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Prävalenz von Mimiviren in Deutschland

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bettina Wedekind

aus Berlin

Datum der Promotion: 23. Juni 2019

Vorwort

Einen Teil dieser Dissertation stellt eine von mir durchgeführte Untersuchung der Seroprävalenz von *Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus* in Blutspendern dar. Diese Ergebnisse wurden auf einem Poster auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie im Jahr 2012 in Essen vorgestellt. Dort gezeigte Ergebnisse habe ich eigenständig generiert. Genannte Koautoren sind an der Planung der Studie beteiligt gewesen oder haben mir wesentliches Material zur Verfügung gestellt. Die elektronenmikroskopische Abbildung ist wie in der Legende genannt von Lars Möller, RKI, ZBS 4, angefertigt worden, hat jedoch nur illustrativen Wert. Das Poster befindet sich im Anhang.

Das Manuskript zur Publikation der gesamten Studie ist in der abschließenden Abstimmung zwischen den Koautoren. Die dort präsentierten Daten habe ich ebenfalls eigenständig generiert.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis	7
Zusammenfassung.....	9
Abstract	11
A Einleitung.....	12
1 Virale Infektionen des Respirationstraktes	12
2 Molekulare Virusdiagnostik.....	13
2.1 Direkter Virusnachweis	13
2.2 Indirekter Virusnachweis.....	18
3 Mimiviren	19
3.1 Entdeckung	20
3.2 Struktur und Genom.....	20
3.3 Diagnostik von Mimivirus-Infektionen	22
3.4 Mimivirus als Ursache von Pneumonien?	22
3.5 Acanthamöben als Erreger von Infektionen beim Menschen	26
4 Ziele der Arbeit.....	27
B Material und Methoden.....	28
1 Material.....	28
1.1 Geräte.....	28
1.2 Verbrauchsmaterialien	28
1.3 Reagenzien.....	29
1.4 Zellen	29
1.5 Medien	29
1.6 Viren	29
1.7 Antikörper.....	30
1.8 Kits.....	30
1.9 PCR.....	30
1.10 Untersuchte Proben.....	33
2 Methoden	38
2.1 Zellkultur und Virusanzucht	38
2.2 Herstellung der Modell BALs.....	39
2.3 Anreicherung der Viren aus Nasenspülflüssigkeiten.....	39
2.4 Nukleinsäureextraktion	41

2.5	PCR Protokolle	41
2.6	Ermittlung der Nachweisgrenze der Mimivirus real-time PCR.....	43
2.7	Nachweis der Spezifität der Mimivirus real-time PCR	44
2.8	Präparation der IFA slides	44
2.9	Etablierung des Mimivirus-Western Blots.....	44
2.10	Probengewinnung im Rahmen der Untersuchung immunsupprimierter Kinder ...	45
C	Ergebnisse.....	46
1	Etablierung diagnostischer Verfahren für Mimivirus	46
1.1	Etablierung molekularbiologischer Verfahren zum Mimivirus-Nachweis.....	46
1.2	Etablierung eines Verfahrens für die Serodiagnostik von Mimivirus	56
2	Studien zur Prävalenz von Mimivirus.....	61
2.1	Untersuchung von Blutspendern.....	62
2.2	Untersuchung von Patienten mit Verdacht auf Pneumonie oder mit anderer unerklärter respiratorischer Symptomatik.....	64
2.3	Untersuchung von Patienten unter Immunsuppression.....	65
D	Diskussion.....	68
1	Etablierung eines diagnostischen Systems zum direkten Nachweis von Mimiviren.....	68
2	Etablierung eines diagnostischen Systems zum indirekten Nachweis von Mimiviren...	71
3	Studien zur Prävalenz von Mimiviren	73
3.1	Abschließende Risikobewertung	77
E	Literaturverzeichnis	79
F	Eidesstattliche Versicherung.....	85
G	Tabellarischer Lebenslauf.....	88
H	Danksagung	89
I	Anhang.....	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Generierung des Signals bei der TaqMan real-time PCR. A: Die Sonde ist intakt und es kann kein Signal des Reporterfarbstoffs detektiert werden. B: Die Sonde wird während der Primer-Elongation hydrolysiert und der Reporterfarbstoff kann detektiert werden. C: Amplifikationskurven eines real-time PCR-Assays für eine DNA-Verdünnungsreihe.	17
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Immunfluoreszenztests. Der bei seropositiven Patienten im Serum befindliche Antikörper bindet an virale Strukturen in infizierten Zellen. Der Nachweis erfolgt über einen humanspezifischen Antikörper mit einer Fluoreszein-Markierung. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.....	18
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Mimivirus-infizierten Acanthamoeba (Lars Möller, RKI, ZBS 4). In dieser Abbildung wird die Größe der Viruspartikel deutlich.....	20
Abbildung 4: A: Schematische und B: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Mimivirus-Partikels. Die wesentlichen Strukturmerkmale der schematischen Darstellung sind gut in der EM-Aufnahme erkennbar.	21
Abbildung 5: Quantitative Bestimmung der Ausbeuten mit und ohne Anreicherung von Mimivirus und VACV-Partikeln. 1: NaCl-basierte NSF ohne Anreicherung; 2: NaCl-basierte NSF mit Anreicherung; 3: PBS-basierte NSF ohne Anreicherung; 4: PBS-basierte NSF mit Anreicherung.	48
Abbildung 6: Erhöhung der Ausbeute an Mimivirus-DNA durch mehrfaches Auftragen von Lysaten auf die Säule vor der Elution der DNA. Die Abnahme der CT-Werte mit der Anzahl der eingesetzten Lysate wird deutlich.	49
Abbildung 7: Amplifikationskurven der einzelnen Mimivirus real-time PCR-Systeme F/R (braun) und up/do (grün). Trotz unterschiedlicher Intensitäten der Fluoreszenzsignale ist der jeweilige CT-Wert nahezu identisch.....	50
Abbildung 8: Standardgeraden der Uniplex Mimi-PCRs F/R und up/do sowie die Kombination zur Duplex-Mimivirus-PCR mit jeweils einem der entsprechenden Plasmide für die PCR-Systeme F/R und up/do.....	51
Abbildung 9: Darstellung der Probit-Analyse für die Mimivirus Duplex-real-time PCR. Es werden 14,12 Genomäquivalente mit der Duplex-real-time PCR für Mimivirus mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% pro Reaktion erkannt.	52

Abbildung 10: Agarose-Gelelektrophorese (1,5%) der Produkte der konventionellen Mimivirus-PCR. M: 100 bp Leiter; 1: DNA aus Mimivirus-Anzucht 1; 2: DNA aus Mimivirus-Anzucht 2; Mimivirus-Kontroll-DNA (zu Beginn zur Verfügung gestellt von Didier Raoult), 4: Negativkontrolle. Eine distinkte Bande in der erwarteten Höhe von ~600 bp ist deutlich erkennbar.....	54
Abbildung 11: Ergebnisse der BLAST-Suche mit der aus der Sequenzierung des durch konventionelle PCR erhaltenen Sequenz. Mit diesem Verfahren kann bei ausreichender Viruslast verlässlich die Verwendung bzw. Detektion von Mimivirus-DNA bestätigt werden.....	55
Abbildung 12: Etabliertes Ablaufschema für die PCR-Diagnostik von Mimivirus-Infektionen.	56
Abbildung 13: Nachweis der Bindung von Antikörpern des polyklonalen Kaninchenserums an Mimivirus-Partikel mittels Immun-EM. Die mit Gold markierten Sekundärantikörper sind Kaninchen-spezifisch. Die Kaninchen-Antikörper erkennen vorwiegend die fibrillären Strukturen auf den Mimivirus-Partikeln (Lars Möller, RKI).....	57
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung einer mit gereinigten Mimivirus-Partikeln “beschichteten“ WI-38-Zelle. Der verwendete Primärantikörper ist ein polyklonales Kaninchenserum, welches durch Immunisierung eines Kaninchens mit UV-inaktivierten Mimiviren hergestellt wurde (Dr. Albrecht Kiderlen, RKI) und hier im Vergleich zur Kernfärbung mit DAPI ein grünes Signal liefert.	59
Abbildung 15: Etablierung einer Western-Blot-Analyse zur Bestätigung der Sero-Reaktivität gegen Mimivirus. Da zu Beginn der Studie keine humanen Seren mit anti-Mimivirus-Antikörpern vorlagen, wurde ein Kaninchen mit aufgereinigten Mimivirus-Partikeln immunisiert und das Kaninchenserum zur Etablierung des Western Blots verwendet. A: Acanthamöben-Lysat, M: Mimivirus-Lysat. Für die Identifizierung von anti-Mimivirus-Antikörpern wurden zwei Banden bei ca. 32 kDa und 90 kDa als geeignet angesehen...60	60
Abbildung 16: Etabliertes Ablaufschema für die Serodiagnostik von Mimivirus-Infektionen	61
Abbildung 17: Immunfluoreszenzaufnahmen von A: nicht mit Mimivirus beschichteten WI-38-Zellen als Kontrolle, B: einem nicht-reaktiven Serum, C, D: reaktiven Seren bei Serumverdünnungen von 1:320	63
Abbildung 18: Serologischer Nachweis von anti-Mimivirus-Antikörpern mit dem Western Blot. Auswahl von Ergebnissen untersuchter Blutspender. A: Acanthamöben-Lysat, M: Mimivirus-Lysat. Neg P: im IFA nicht-reaktiver Patient, Pos P1: IFA-reaktiver Patient 7-20, Pos P2: IFA-reaktiver Patient 3-35.	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wesentliche epidemiologische Charakteristika respiratorischer Viren	12
Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Studien zur Prävalenz von Mimivirus	24
Tabelle 3: Real-time PCR zum Nachweis von Orthopockenvirus-DNA (57).....	31
Tabelle 4: Real-time PCR zum Nachweis von Influenza A Virus-RNA (58).....	31
Tabelle 5: Real-time PCR zum Nachweis von humaner DNA (57).....	31
Tabelle 6: Primer und Sonden der verwendeten real-time PCR und konventionellen PCR zur Sanger-Sequenzierung zum Nachweis von Mimivirus.....	32
Tabelle 7: Primer und Sonde der verwendeten real-time PCR zum Nachweis von Acanthamöben (59).....	32
Tabelle 8: Zusammenfassung der bekannten Daten für die Patientengruppe 2 (G2)	34
Tabelle 9: Zusammenfassung der bekannten Daten für die Patientengruppe 3 (G3)	35
Tabelle 10: Proben (x) und Zeitpunkte in Tagen der Probenahme von immunsupprimierten Kindern	36
Tabelle 11: Reaktionsbedingungen für die real-time PCR zum Nachweis von Orthopockenviren (57).....	41
Tabelle 12: Reaktionsbedingungen für die real-time one-step RT-PCR zum Nachweis von Influenza A Viren(58).....	41
Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für die Uniplex-Mimivirus real-time PCRs F/R und up/do	42
Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für die Duplex-Mimivirus real-time PCR	42
Tabelle 15: Reaktionsbedingungen für die konventionelle Mimivirus-PCR.....	42
Tabelle 16: Reaktionsbedingungen für die c-myc-PCR zum Nachweis humaner DNA (57) ..	43
Tabelle 17: Reaktionsbedingungen der real-time PCR zum Nachweis von Acanthamöben (59)	43
Tabelle 18: Vergleich der CT-Werte für Kontrollviren nach Extraktion mit verschiedenen Kits. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 Messwerten und zwei unabhängigen Versuchen und die Standardabweichung	46
Tabelle 19: Standardgeraden der Uniplex- und Duplex-Mimivirus real-time PCR im Vergleich.....	51
Tabelle 20: Reproduzierbarkeit der Mimivirus-Duplex real-time PCR	52
Tabelle 21: Nachweis der Spezifität der Mimivirus-Duplex real-time PCR	53

Tabelle 22: Ergebnisse der serologischen Untersuchung von Blutspendern auf Mimivirus-spezifische Antikörper	64
Tabelle 23: Ergebnisse für Patienten mit Pneumonie oder anderen respiratorischen Symptomen	65
Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung der immunsupprimierten Patienten (KMT)	66

Zusammenfassung

Einleitung: In der Vergangenheit traten regelmäßig neuartige Erreger auf, die mitunter ein hohes Risiko für den Menschen darstellen können. In 70% der Fälle handelt es sich dabei um Zoonosen. Im Jahr 1992 wurden Mikroorganismen in Acanthamoeben entdeckt, die aufgrund ihrer Größe und ihres Verhaltens in der Gram-Färbung zuerst für Bakterien gehalten und nach dem Entdeckungsort als *Bradfordcoccus* bezeichnet wurden. Erst im Jahr 2003 bemerkten französische Wissenschaftler, dass es sich dabei um Viren handelt, und taufte diese Mimivirus, abgeleitet von *microbe mimicking virus*. Welche Rolle das Mimivirus für den Menschen spielt, ist unklar. Wenige Studien zur Seroprävalenz von Mimiviren zeigten, dass ca. 2% der gesunden Bevölkerung bereits Kontakt mit Mimiviren gehabt haben müssen und in Patienten mit respiratorischen Erkrankungen, vornehmlich Pneumonien, die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, für Mimivirus seropositiv zu sein. Eine echte Assoziation von Mimiviren und einer Pneumonie konnte nicht gezeigt werden, da der Nachweis der Nukleinsäuren dieser Viren nur zwei Mal gelingen konnte. Allerdings entwickelte ein Labormitarbeiter, der sich bei einem Laborunfall mit Mimivirus infizierte, mit der Serokonversion eine Pneumonie und das einzige Mimivirus-Isolat aus einem Menschen stammt von einer tunesischen Patientin mit einer Pneumonie.

Methodik: In dieser Arbeit wurden labordiagnostische Verfahren zum Nachweis einer Mimivirus-Infektion etabliert und damit anschließend die Prävalenz von Mimivirus in deutschen Proben bestimmt.

Ergebnisse: Die etablierte Duplex real-time PCR für zwei unterschiedliche Genregionen des Virus in Kombination mit einem optimierten Aufarbeitungsprotokoll zeigte eine Nachweisgrenze von ~140 Genomäquivalenten/mL Probe. Der serologische Nachweis erfolgte mit einem Immunfluoreszenztest, der auf dem Beschichten von WI-38-Zellen mit Mimivirus-Partikeln beruhte, da humane Zellen nicht mit Mimivirus infizierbar sind. Zur Bestätigung konnte ein weniger sensitiver, jedoch spezifischer Western Blot eingesetzt werden.

Die Untersuchung von 350 Blutspendern zeigte eine Seroprävalenz für Mimiviren von 2,3%. Drei/46 (6,5%) untersuchten Patienten mit einer respiratorischen Erkrankung waren seropositiv, jedoch nicht DNA-positiv (n=24). Von 18 stammzelltransplantierten Kindern wurden über 2 Jahre 68 Nasenspülflüssigkeiten und 31 Seren untersucht. Jeweils drei Patienten waren Mimivirus-DNA- bzw. Mimivirus-Antikörper-positiv (16%), wobei ein Patient vor der Transplantation sowohl seropositiv als auch DNA-positiv war.

Schlussfolgerungen: Aufgrund der Fallzahlen ist eine statistisch belegbare Aussage schwer möglich, die Ergebnisse ähneln jedoch denen beatmeter Patienten anderer Studien. Bei der erwarteten Prävalenz von Mimiviren in Gesunden und Patienten mit respiratorischen Symptomen, scheinen Kinder mit hämatologisch- onkologischen Grunderkrankungen eine höhere Wahrscheinlichkeit zu haben einen Mimivirus-positiven Test aufzuweisen. Ein erhöhtes pathogenes Potenzial von Mimiviren für den Menschen kann jedoch nicht gezeigt werden.

Abstract

Introduction: Past decades have confronted humankind with new and emerging diseases of usually unknown pathogenic potential for the human population, nearly 70% of them having a zoonotic origin. In 1992, a new microorganism was identified in *Acanthamoeba* and was called *Bradfordcoccus* due to its enormous size and its behavior in Gram staining tests. In 2003 French scientists proved this pathogen to be a virus and it was named Mimivirus, derived from microbe mimicking virus. So far the pathogenicity of Mimivirus for humans is not understood. A few studies show that ~2% of the healthy population can be seropositive for Mimivirus, increasing in patients with respiratory diseases and correlating best to pneumonia. However, Mimivirus DNA was only proven twice in a pneumonia patient. A lab accident of a person working with Mimivirus led to seroconversion and pneumonia. Moreover, the only Mimivirus isolate from a human could be obtained from a Tunisian patient suffering from pneumonia.

Methods: This study aimed at the establishment of a diagnostic system for Mimivirus to elucidate the prevalence of German Mimivirus samples.

Results: A duplex real-time PCR targeting two different genome regions of Mimivirus in combination with the modified sample preparation protocol was able to detect 140 genome equivalents of Mimivirus in 1 mL of a respiratory specimen. Serology was based on an immunofluorescence test which used the covering of WI-38 cells with Mimivirus particles, because tested human cells are not susceptible to Mimivirus. A more specific Western Blot could be used for confirmation. The seroprevalence of Mimivirus in blood donors could be determined as 2.3 %. Also, 3 out of 46 patients (6.5 %) with respiratory diseases were seropositive, while none of the 24 corresponding respiratory specimens was DNA positive for Mimivirus. From 18 children suffering from hematological disorders 68 respiratory specimens and 31 sera could be collected. Three patients were seropositive and 3 others were DNA positive in respiratory specimens. Interestingly, one patient was positive for Mimivirus antibodies as well as Mimivirus DNA prior to transplantation.

Take-home message: Although the case numbers from two years of monitoring are low, children with hematological disorders may have a higher risk to become infected with Mimivirus. The prevalence of Mimivirus in Germany in healthy blood donors and patients suffering from respiratory diseases seems to be comparable to other countries. Finally there is no evidence for an increased pathogenic potential arising from Mimivirus for humans.

A Einleitung

1 Virale Infektionen des Respirationstraktes

Neben einer Reihe von bakteriellen Infektionen der Atemwege des Menschen, wie zum Beispiel Infektionen mit *Haemophilus influenzae* oder *Streptococcus pneumoniae*, spielen vor allem virale Infektionen des Respirationstraktes eine zunehmend große Rolle und können Pneumonien bei Erwachsenen und Kindern verursachen [1].

In den Wintermonaten treten besonders häufig Infektionen mit bekannten Viren wie Inflenzaviren A und B, Respiratorischen Synzytialviren, Parainflenzaviren, Adenoviren, Herpesviren, Coronaviren, Metapneumoviren und Rhinoviren auf, wobei der Beitrag letzterer zu viral verursachten Pneumonien diskutiert wird [2]. Neuerdings werden in den USA auch vermehrt Infektionen mit Hantaviren beobachtet, die zum Hantavirus Pulmonalen Syndrom führen können, was jedoch im Vergleich zu saisonal auftretenden Virusinfektionen noch selten geschieht [3]. Respiratorische Viren werden in der Regel aerogen und durch Kontakt zu infiziertem Material übertragen. Tabelle 1 fasst die wesentlichen epidemiologischen Charakteristika respiratorischer Viren zusammen.

Tabelle 1: Wesentliche epidemiologische Charakteristika respiratorischer Viren

Virus	Jahreszeit	Periodizität	Inkubationszeit	Übertragung
Influenzavirus	Winter	jährlich	1-2 Tage	Aerogen
RSV	Spätherbst/Frühjar	jährlich	2-8 Tage	aerogen und Kontakt
Metapneumovirus	Winter	2 Jahre	5-6 Tage	aerogen und Kontakt
Parainfluenzavirus	Herbst/Frühjahr	2-3 Jahre	2-8 Tage	aerogen und Kontakt
Adenovirus	ganzjährig	jährlich	5-10 Tage	aerogen und Kontakt
Coronavirus	Winter	2-3 Jahre	1-3 Tage	aerogen und Kontakt

RSV: Respiratorisches Synzytialvirus [4,5].

Darüber hinaus treten in unvorhersehbaren Abständen immer wieder Infektionen mit neuartigen oder modifizierten Viren auf. Ein besonderer Fall war das Auftreten des SARS-Coronavirus im Jahr 2003, welches weltweit ca. 800 Todesfälle verursachte [6]. Aber auch das Auftreten von Varianten bereits bekannter Viren, wie des Influenzavirus H1N1v, welches in dieser antigenetischen Form nicht bekannt war und im Jahr 2009 die so genannte „Schweinegrippe“ verursachte, war ein Beispiel für das natürliche Erscheinen von Viren, denen weder immunologisch noch diagnostisch und teilweise auch nicht therapeutisch begegnet werden kann [7].

Dass es offensichtlich noch eine Vielzahl unbekannter Erreger gibt, die eine respiratorische Symptomatik hervorrufen, lässt sich an der hohen Anzahl der Fälle erkennen, die in der Diagnostik unerkannt bleiben. Trotz fortschrittlicher molekularer Diagnostik sind bei 40–60% der Fälle die Pathogene, die einen respiratorischen Infekt verursachen, unerkannt [8]. Daher werden auch immer wieder neue Erreger entdeckt, wobei der Beweis für den kausalen Zusammenhang mit einem bestimmten Krankheitsbild oft fehlt.

In der vorliegenden Arbeit soll für diese Fälle eine Vorgehensweise dargestellt werden, um die Relevanz eines neuartigen Virus für den Menschen einschätzen zu können. Dies geschieht am Beispiel der Mimiviren, einem Virus, das erst kürzlich entdeckt und mit dem Krankheitsbild der Pneumonie in Verbindung gebracht worden ist (8,9). Dabei befasst sich die Arbeit mit dem Aufbau diagnostischer Verfahren für Mimivirus und deren Anwendung.

2 Molekulare Virusdiagnostik

Standardverfahren in der virologischen Diagnostik sind entweder der direkte Virusnachweis oder der indirekte Nachweis von Virus-spezifischen Antikörpern in der Infektionsserologie [1,4]. Die mit diesen Verfahren erhaltenen Aussagen sind unterschiedlich, können sich jedoch ergänzen.

2.1 Direkter Virusnachweis

Bei Verfahren zum direkten Virusnachweis werden Bestandteile des Pathogens direkt aus der klinischen Probe nachgewiesen. Dies können virale Proteine sein, das Genom oder das komplette Viruspartikel, welches elektronenmikroskopisch dargestellt oder in geeigneten Modellen vermehrt werden kann [4]. Im Folgenden werden die einzelnen Verfahren kurz skizziert und deren Vor- und Nachteile andiskutiert. Anhand dieser Diskussion soll die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten diagnostischen Methoden erklärt werden.

2.1.1 Virusanzucht

Die Virusanzucht stellt den ultimativen Nachweis infektiöser Viruspartikel dar. Dazu wird die klinische Probe mit für dieses Virus geeigneten Zellen inkubiert und die Ausbildung eines zytopathischen Effekt (CPE) abgewartet. Dieser CPE kann nach wenigen Stunden, vielen Tagen bis Wochen oder auch gar nicht eintreten, obwohl trotzdem eine Infektion der Zellen stattfindet [11]. Der CPE kann des Weiteren charakteristisch für ein bestimmtes Virus sein, jedoch sollte die Vermehrung des Virus mit spezifischen Methoden bewiesen werden. Während heutzutage in der Regel Zelllinien in der Zellkultur verwendet werden [12], hat man früher die Virusanzucht entweder in bebrüteten Hühnereiern oder in entsprechenden Tieren durchgeführt. Dies wird aus ethischen Gründen heute nach Möglichkeit vermieden.

Ein großer Vorteil der Virusanzucht ist es, dass die Replikationsfähigkeit eines Virus nachgewiesen werden kann und man das Virus vermehrt und damit genügend Material für weitere Charakterisierungen erhalten kann. Theoretisch genügt ein einziges infektiöses Viruspartikel für eine erfolgreiche Anzucht – dies aber unter Idealbedingungen [12].

Wesentliche Nachteile der Methode sind bei noch nicht standardisierten Bedingungen (z.B. ist das Virus unbekannt) die unvorhersehbare Zeit bis zum erfolgreichen Nachweis, das Problem ständig infizierbare Zellen vorrätig zu haben und diese auch zu kennen und letztlich die große Expertise zur Bewertung der CPEs. Dies macht eine Routinediagnostik mit der Anzucht schwierig.

2.1.2 Elektronenmikroskopie

Bei der Elektronenmikroskopie (EM) werden statt Lichtwellen Elektronenstrahlen für die Abbildung des Objekts verwendet, wodurch die Auflösung des Mikroskops enorm verbessert wird und sehr kleine Objekte bis 0,1 nm abgebildet werden können [13]. Für die Diagnostik wird häufig die Präparationsmethode der so genannten Negativkontrastierung eingesetzt, bei der in 15 Minuten mit einem offenen Blick alle in einer Probe befindlichen Partikel abgebildet werden können, solange sie eine bestimmte Konzentration von $\sim 10^6$ Partikeln/ml erreichen [14].

Während die Präparation einfach und schnell ist, bleibt die Interpretation und damit die Erkennung und Zuordnung relevanter Partikel sehr anspruchsvoll und Experten überlassen. Eine exakte Typisierung von Pathogenen ist ebenfalls nicht möglich; häufig bleibt die Typisierung auf Ebene der Familie, und genauere Typisierungen sind nur durch den Einsatz spezifischer Antikörper zu schaffen [15].

Der Vorteil der EM ist sicherlich die kurze Zeit bis zum Nachweis und der offene Blick, der nicht nur die Erkennung der vermuteten Pathogene erlaubt, sondern darüber hinaus auch alle anderen Partikel zeigt [16].

Zu den Nachteilen zählen der apparativ große Aufwand und die erforderliche hohe Expertise [17]. Aus Sicht der Diagnostik ist jedoch der wesentliche Nachteil die mit Standardverfahren zu erreichende hohe Nachweisgrenze, was eine Beschränkung auf bestimmte klinische Proben und damit verbundene Infektionskrankheiten bedeutet. So ist die EM hervorragend für Hautveränderungen jeder Art geeignet, für Untersuchungen des Blutes eher weniger [18].

2.1.3 Antigen-Nachweis

Andere Verfahren beruhen auf dem Nachweis von Teilen der Viruspartikel. So können mit spezifischen Antikörpern bestimmte Proteine eines Viruspartikels oder auch deren im Verlauf der Replikation gebildete virale Proteine detektiert werden. Dies kann im Blut geschehen,

wofür meist Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)-basierte Techniken eingesetzt werden, oder auch in Zellen. Untersucht man Blutzellen, spricht man von Immunzytochemie, untersucht man Gewebe, handelt es sich um Immunhistochemie. Das zu untersuchende Gewebe wird fixiert und mit hochspezifischen Antikörpern gegen das nachzuweisende Protein inkubiert. Dies ist der Primärantikörper. Nach verschiedenen Waschvorgängen wird mit Antikörpern inkubiert, die spezifisch für die Spezies des Primärantikörpers sind, was man als Sekundärantikörper bezeichnet. Der Sekundärantikörper ist mit bestimmten Enzymen gekoppelt (Peroxidase, Alkalische Phosphatase) und wird letztlich über enzymatische Reaktionen nachgewiesen (4,1).

Der Nachweis viraler Proteine aus Blut erfolgt häufig mit so genannten Antigen-Capture-ELISA, die mit einem spezifischen Antikörper zunächst das virale Protein fangen, um es dann mit einem anderen markierten Antikörper nachzuweisen [19].

Die Vorteile dieser Methoden sind bei ELISA-basierten Verfahren die Möglichkeit des Hochdurchsatzes und die Aussage über das Auftreten bestimmter viraler Proteine, was vom verwendeten Primärantikörper abhängt. Blut als Untersuchungsmaterial ist in der Regel leicht zu gewinnen. Im Gegensatz dazu ist die Immunhistochemie invasiv und erfordert Gewebeproben des Patienten. Die Sensitivität Antikörper-basierter Verfahren variiert stark in Abhängigkeit von der Qualität der Primärantikörper [19].

2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hat die Biowissenschaften verändert wie keine andere Technik [20]. Dabei handelt es sich um eine Methode, die Nukleinsäuren nachweisen kann, und dies erlaubt den Nachweis des Erreger-Genoms, was entweder DNA sein kann oder in cDNA umgeschriebene RNA [21]. Das Prinzip der PCR sei nur kurz dargestellt, da es sich um eine Standardmethode handelt. Bei bekannter Zielsequenz werden zwei Oligonukleotide, so genannte Primer, eingesetzt, die komplementär zur Sequenz eines Bereichs des nachzuweisenden Erreger-Genoms zueinander ausgerichtet sind und als Startmoleküle der Amplifikation dienen. In einem definierten Temperaturzyklus wird die zu amplifizierende DNA denaturiert, und bei einer Primer-spezifischen Temperatur werden die Primer an die komplementären Zielsequenzen gebunden, was auch als Annealing bezeichnet wird. Eine Polymerase verlängert die spezifisch gebundenen Primer, wodurch ein neuer DNA-Strang für das Binden des jeweils anderen Primers hergestellt wird; ein Vorgang, der Primer-Elongation genannt wird. Nach diesem Schritt haben sich die DNA-Zielmoleküle im Idealfall verdoppelt und können nun wieder denaturiert werden. Die Anzahl der amplifizierten DNA-Moleküle nimmt daher mit jedem Zyklus der Denaturierung und Bindung exponentiell zu, und es

können so große Mengen der Ziel-DNA erzeugt werden, dass diese nun detektierbar sind. Die Amplifikation einer bestimmten Zielsequenz wird daher als Nachweis des Genoms eines Erregers betrachtet.

Die PCR ist in der Regel einfach durchzuführen, sehr sensitiv und hoch spezifisch, aber nur qualitativ auswertbar [1,22]. Weitere Nachteile sind die Gefahr der Kontamination, denn jedes Produkt einer PCR kann als Startmolekül derselben PCR dienen, und daher ist die Einhaltung bestimmter Regeln bei der diagnostischen PCR notwendig. Des Weiteren kann PCR lediglich die Anwesenheit von Nukleinsäuren beweisen, nicht jedoch die Infektiosität von Erregern.

2.1.5 Real-time PCR

Die real-time PCR ist eine Weiterentwicklung der PCR und erlaubt neben der Quantifizierung von Nukleinsäuren auch den Hochdurchsatz und hat vor allem eine verbesserte Spezifität [23]. Diese wird dadurch erreicht, dass zusätzlich zu den beiden Sequenz-spezifischen Primern ein oder mehrere Oligonukleotide, so genannte Sonden, zwischen den Primern an die amplifizierte Zielsequenz binden und während der PCR on-line detektiert werden. Damit wird die Spezifität erhöht, denn es müssen für die Signalproduktion zusätzliche Oligonukleotide zu den Primern binden, gleichzeitig kann das Auslesen des Detektionssignals der Sonden zur Quantifizierung genutzt werden. Dies ist in der Diagnostik eine wertvolle Option, wenn z.B. Therapie-begleitende Viruslasten bestimmt werden müssen [24,25].

Ein großer Vorteil der real-time PCR ist darüber hinaus, dass das Ergebnis nach dem Ende der PCR vorliegt und keine weiteren Analysen notwendig sind. Damit wird das Risiko der Kontamination und damit die Erzeugung von falsch positiven Ergebnissen massiv reduziert [25].

Das in dieser Arbeit verwendete real-time PCR-Format ist das der TaqMan- oder 5' Nuklease-Sonden [23]. Hierbei wird eine für die amplifizierte Sequenz spezifische Sonde entworfen, die an den beiden Enden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist. Befinden sich beide Farbstoffe an die Sonden gebunden, führt die Anregung der Farbstoffe mit Licht definierter Wellenlänge dazu, dass der an das 5'-Ende der Sonde gebundene Reporterfarbstoff Licht emittiert, welches jedoch vom zweiten, ans 3'-Ende der Sonde gekoppelten Quencher-Farbstoff aufgenommen wird. Dieser Quencher gibt die aufgenommene Energie in Form von Licht einer nicht detektierten Wellenlänge oder in Form von Wärme ab. Das Signal des Reporters wird daher bei intakten Sonden nicht gemessen [25].

Bindet die Sonde im Annealingschritt spezifisch an die zu amplifizierende Sequenz, trifft die Polymerase bei der Verlängerung des Primers, der die gleiche Orientierung wie die Sonde hat, auf die gebundene Sonde und beginnt diese exonukleolytisch zu verdauen. Dieser Verdau

trennt die beiden Farbstoffe Reporter und Quencher voneinander. Bei Anregung der Farbstoffe führt dies nun dazu, dass die Fluoreszenz des Reporters nicht vom Quencher absorbiert werden kann und messbar wird. Eine kontinuierliche Messung des Reportersignals erlaubt so den Nachweis der Amplifikation und anhand der Signalintensität zu einem bestimmten Zyklus der PCR auch die Quantifizierung der Ziel-DNA.

Abbildung 1 zeigt schematisch das Prinzip einer TaqMan-Sonden real-time PCR und die daraus resultierenden typischen Amplifikationskurven.

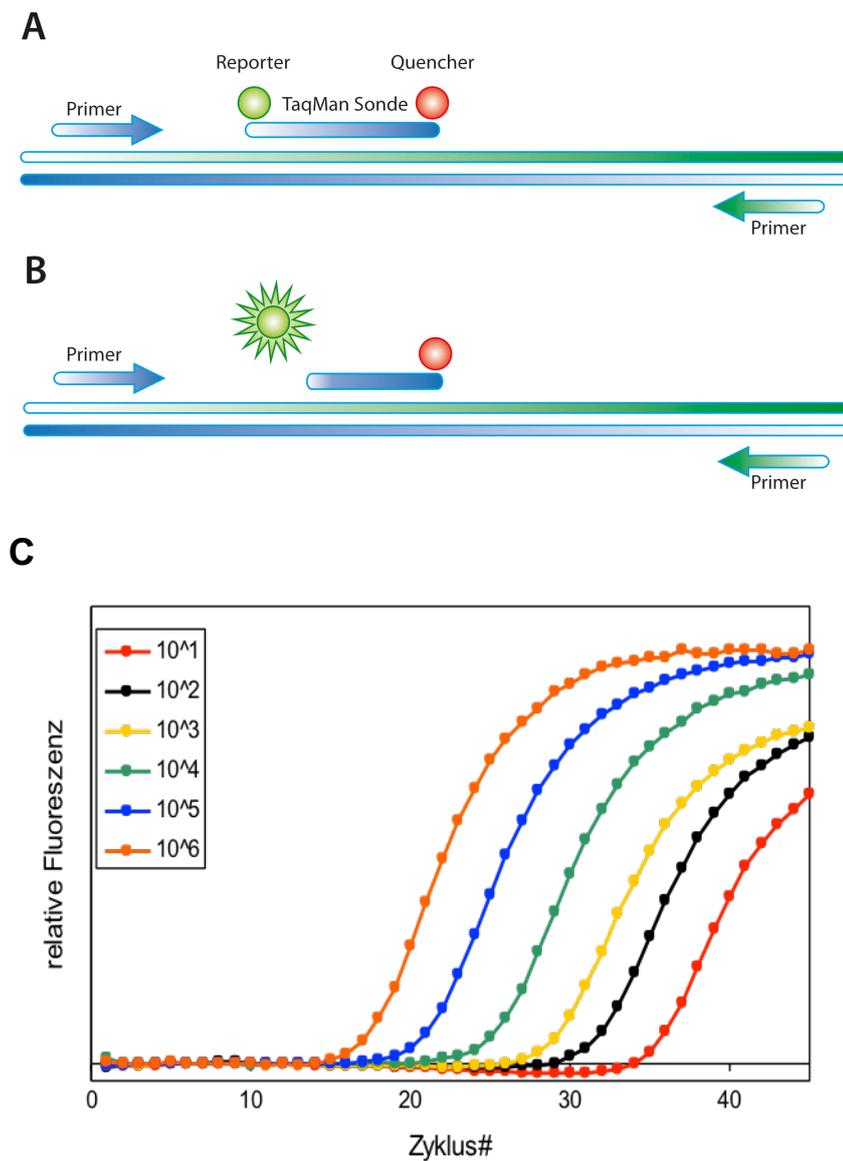


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Generierung des Signals bei der TaqMan real-time PCR. A: Die Sonde ist intakt und es kann kein Signal des Reporterfarbstoffs detektiert werden. B: Die Sonde wird während der Primer-Elongation hydrolysiert und der Reporterfarbstoff kann detektiert werden. C: Amplifikationskurven eines real-time PCR-Assays für eine DNA-Verdünnungsreihe.

2.2 Indirekter Virusnachweis

Beim indirekten Virusnachweis wird nicht das Virus selbst nachgewiesen, sondern die immunologische Reaktion des Körpers auf die erfolgte Infektion [26]. Konkret werden Antikörper im Blut des Patienten detektiert, die spezifisch für den zu untersuchenden Erreger sind. Findet man derartige Antikörper, bezeichnet man den Patienten als seropositiv für diesen Erreger. Die Differenzierung von IgM- und IgG-Antikörpern erlaubt zwar häufig die Unterscheidung einer frischen von einer zurückliegenden Infektion; da die Bildung von Antikörpern jedoch eine Zeit von Tagen bis Wochen erfordert, ist die Infektionsserologie für die Akutdiagnostik oft nicht geeignet, jedoch gut geeignet für retrospektive Studien [4].

Methodisch gibt es verschiedene Ansätze für serologische Nachweissysteme. Häufig werden ELISA-Verfahren eingesetzt, bei denen ein Antigen oder das gereinigte Virus selbst auf der Platte gebunden ist und, wie oben zum Antigen-Nachweis beschrieben wurde, sukzessive mit dem Patientenserum (als Primärantikörper) und einem human-spezifischen, markierten Antikörper die erfolgreiche Bindung der Antikörper des Patienten an das Antigen nachgewiesen wird [19].

Der ELISA gibt daher keinerlei Auskunft über die Lokalisation und Art des Signals. Im Gegensatz dazu erlaubt die Immunzytochemie die genaue Betrachtung der Art und Lokalisation des Signals, da die Zellen mikroskopisch bewertet werden können. Vergleichbar dem oben beschriebenen Antigen-Nachweis werden hier jedoch Zellen standardisiert infiziert, fixiert und als Primärantikörper das Serum des Patienten eingesetzt. Dieser wird wieder mit einem human-spezifischen Antikörper detektiert. Geschieht dies mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpers, spricht man von Immunfluoreszenztest (IFA). Abbildung 2 zeigt schematisch das Prinzip eines IFA.

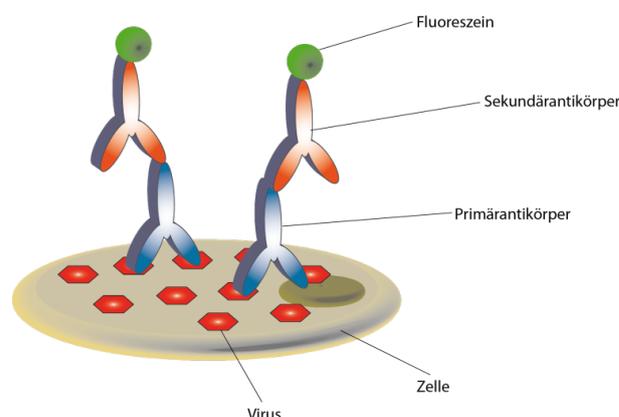


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Immunfluoreszenztests. Der bei seropositiven Patienten im Serum befindliche Antikörper bindet an virale Strukturen in infizierten Zellen. Der Nachweis erfolgt über einen humanspezifischen Antikörper mit einer Fluoreszein-Markierung. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

Für diese Arbeit wurde zum direkten Virusnachweis die real-time PCR ausgewählt, da sie sehr sensitiv ist und die Viruslasten für Mimivirus in den untersuchten Proben als gering eingeschätzt werden müssen. Zum serologischen Nachweis wurde die IFA ausgewählt, da diese eine gute Beurteilung der verwendeten Zellen zulässt und dies gerade bei der Etablierung eines Nachweissystems für ein neuartiges Virus wesentlich bei der Beurteilung helfen kann.

Beide Ansätze basieren auf unterschiedlichem Untersuchungsmaterial. Die PCR muss aus solchen klinischen Materialien durchgeführt werden, in denen das Virus tatsächlich zu finden ist, was abhängig vom Virus und dessen Pathogenese das Blut sein kann, bei respiratorischen Infektionen jedoch vor allem Material des oberen oder unteren Respirationstraktes erfordert. Darüber hinaus muss zum Untersuchungszeitpunkt das Virus im untersuchten Material präsent sein. Die Serologie wird mit Serum oder Plasma des Patienten durchgeführt und bedarf keiner akuten Infektion, um den vorhergegangenen Kontakt zum Virus zu beweisen.

3 Mimiviren

Das Mimivirus gehört laut Klassifizierung des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV.org) zur Familie der *Mimiviridae*. Diese Familie enthält ausschließlich den Genus Mimivirus und darin eingeordnet das Mimivirus oder auch *Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus* genannt (APMV). Mimiviren werden auch zu den Nucleocytoplasmic Large DNA Viruses (NCLDV) gezählt, die sich alle durch ein großes DNA-Genom und die spezielle Eigenschaft auszeichnen, im Zytoplasma und nicht im Kern der infizierten Zelle zu replizieren [27]. Bis vor Kurzem war das Mimivirus das größte bekannte Virus [9]. Offensichtlich vermehrt es sich in Amöben der Spezies *Acanthamoeba polyphaga* und nicht in humanen Zelllinien. Neben dem im Jahr 2008 gefundenen verwandten Mamavirus [28] wurde im Oktober 2011 das Megavirus identifiziert, welches ein naher Verwandter des Mimivirus ist und vermutlich in einer neuen Virusfamilie, den *Megaviridae* zusammengefasst werden soll [29,30]. Abbildung 3 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mimivirus-Partikeln in infizierten Acanthamöben.

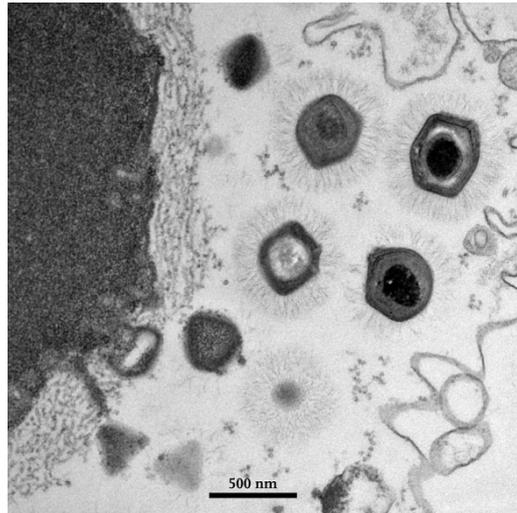


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Mimivirus-infizierten Acanthamöbe (Lars Möller, RKI, ZBS 4). In dieser Abbildung wird die Größe der Viruspartikel deutlich.

3.1 Entdeckung

Im Jahr 1992 wurde das Mimivirus zufällig bei Untersuchungen zu Legionellen von Kühlwasser in Kühltürmen in Bradford, Großbritannien, entdeckt [31]. Aufgrund seiner Größe und der Gram-positiven Färbung sowie der Tatsache, dass es aus der Amöbe *Acanthamoeba polyphaga* isoliert werden konnte, wurde das Mimivirus zuerst für ein Bakterium gehalten und als *Bradfordcoccus* bezeichnet. Intensive Versuche 16S-RNA zur Typisierung dieses neuen Bakteriums zu finden scheiterten jedoch. Erst Jahre später im Jahr 2003 konnten Didier Raoult und seine Kollegen von der Universität in Marseille das *Bradfordcoccus* als Virus identifizieren [9]. Sie bezeichneten das Virus deshalb als "Mimivirus", abgeleitet von *microbe mimicking virus*.

3.2 Struktur und Genom

Ein Mimivirus-Partikel hat einen Durchmesser von ca. 400 nm und zählt damit zu den drei größten bekannten Viren [9,32]. Diese Ausmaße des Viruspartikels erlauben dessen Sichtbarkeit im Lichtmikroskop. Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung eines Mimivirus-Partikels und zum Vergleich eine EM-Aufnahme. In beiden Abbildungen werden die charakteristischen Strukturen wie das Core, das hexagonale Kapsid, welches die dreidimensionale Struktur eines Ikosaeders annimmt, und die Fibrillen deutlich sichtbar [32]. Diese sind 80–100 nm lang und verleihen dem Viruspartikel eine Gesamtgröße von ~600 nm [33]. Aufgrund dieser Größe können Mimivirus-Partikel nicht wie andere Viren durch 0,3 µm Porenfilter gefiltert werden.

Das Genom des ersten Mimivirus-Isolates besteht aus linearer doppelsträngiger DNA (dsDNA) und hat eine Länge von 1.181.404 Millionen Basenpaaren, die sich in ca. 800 nm DNA widerspiegelt [34]. Das Genom kodiert für 979 Proteine, eine für Viren bislang nicht erreichte Anzahl. Als Vergleich enthält ein Hepatitis B Virus-Genom nur 3.320 Nukleotide und enthält vermutlich 4 bzw. 6 Offene Leserahmen [22].

Ungefähr 90% des Mimivirus-Genoms sind kodierend, was nur 10% junk-DNA bedeutet. Unter den Genen des Mimivirus befinden sich auch die 21 wesentlichen Gene, die man in der Virusgruppe der NCLDV wiederfindet, wie den Pockenviren, den Iridoviren und den Asfarviren. Darüber hinaus hat man im Viruspartikel mRNA-Spezies identifiziert, die zelluläre Funktionen ausüben wie Transkriptionsfaktoren und eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Das Mimivirus-Genom kodiert für zahlreiche Proteine des Zucker-, Fett- und Aminosäuremetabolismus; allein 10 Proteine sind in die Protein-Translation involviert [34,35]. Aufgrund ihrer Größe und der Kodierung von Proteinen, die man sonst nur aus zellulären Organismen kennt, haben die Mimiviren und die anderen *giant viruses*, oder auch *giruses* genannt, die Grenze zwischen lebenden und nicht lebenden Formen in Frage gestellt [36]. Daher nennt man diese Viren auch (TRUC *Things Resisting Uncompleted Classification*) [30].

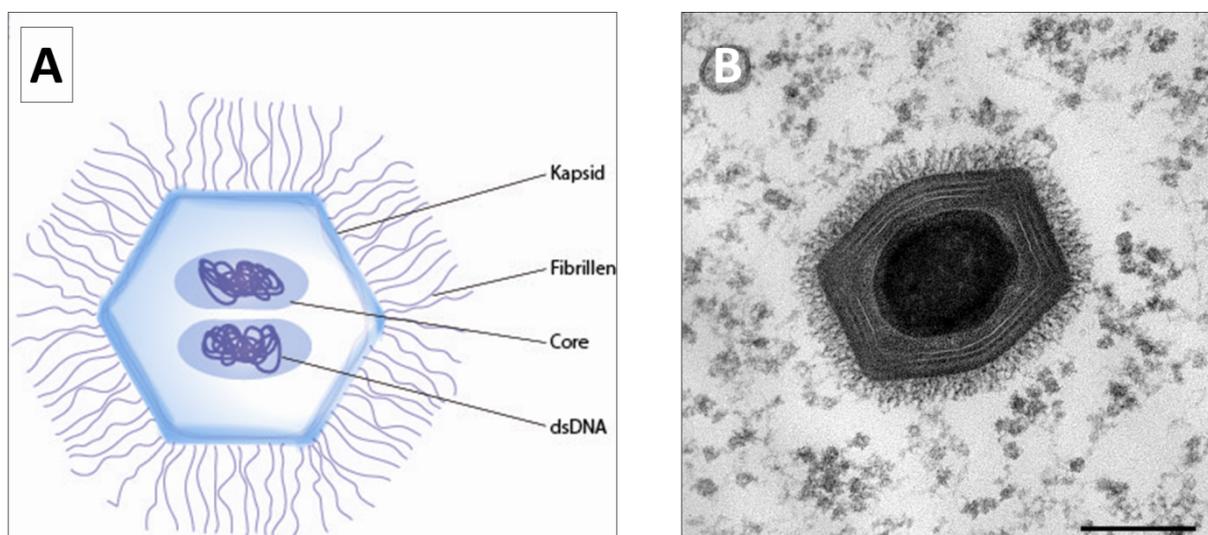


Abbildung 4: A: Schematische und B: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Mimivirus-Partikels. Die wesentlichen Strukturmerkmale der schematischen Darstellung sind gut in der EM-Aufnahme erkennbar.

3.3 Diagnostik von Mimivirus-Infektionen

Während es für Routineparameter fertige, zertifizierte Testverfahren aus den Bereichen des direkten und des indirekten Erregernachweises gibt, müssen für neuartige Erreger diese Verfahren erst etabliert und validiert werden.

Für Mimiviren gibt es nur sehr wenige Sequenzdaten, was bedeutet, dass Genom-basierte Verfahren wie die PCR lediglich auf wenigen Informationen beruhen und Varianten der bekannten Mimivirus-Typen möglicherweise nicht erkannt werden könnten. In der Regel ist der Genomnachweis mittels PCR oder real-time PCR jedoch einfach und verlässlich, wenn auch vergleichsweise kostenintensiv.

Der serologische Nachweis von Mimivirus beruht bislang auf dem Immunfluoreszenztest mit kompletten Viruspartikeln, die in *Acanthamoeben* vermehrt werden müssen, da eine effiziente Replikation *in vitro* in humanen Zellen bislang nicht erreicht werden konnte [10,37,38]. Daher wurden in *Acanthamoeba polyphaga* AP-1 vermehrte Mimivirus-Partikel aufgereinigt und direkt auf Objektträger gegeben, um daran die Inkubation mit dem Patientenserum durchzuführen. Dieses Verfahren birgt die Gefahr der schlechten Interpretierbarkeit, da selbst die Mimivirus-Partikel für die Lichtmikroskopie sehr klein sind und häufig ein Hintergrund durch unspezifische Bindung der Antikörper an Glas zu beobachten ist. In einer Studie wurde zur Bestimmung der Seroreaktivität eine zweidimensionale Immunproteom-Analyse durchgeführt, die jedoch nicht für die Routinediagnostik geeignet ist (42). Daher war es ein Ziel dieser Arbeit die serologische Diagnostik von Infektionen mit Mimivirus zu verbessern.

3.4 Mimivirus als Ursache von Pneumonien?

Pneumonien stellen weltweit einen wesentlichen Grund für Hospitalisierungen dar, und auch nosokomiale Pneumonien stellen 10–20% der im Krankenhaus erworbenen Infektionen dar [8,40]. Besonders auf Intensivstationen und bei beatmeten Patienten sind Pneumonien mit hoher Morbidität und Mortalität verbunden. Intra-amöbale Mikroorganismen werden in diesem Zusammenhang als Ursache bei einem gewissen Anteil der bisher unerklärten Pneumonien diskutiert [38,41,42]. Daher kommen auch Mimiviren als Ursache derartiger Infektionen in Frage. Eine bisher kleine Anzahl von Untersuchungen zur Rolle von Mimivirus bei Pneumonien mag darauf hindeuten. Diese Studien verwendeten die PCR und/oder die Serologie und untersuchten sowohl Kinder als auch Erwachsene mit respiratorischen Symptomen. Tabelle 2 fasst die wesentlichen Ergebnisse der bislang durchgeführten Studien zu Mimivirus zusammen. Interessanterweise gibt es bisher nur eine von 13 Studien, in der eine Mimivirus-DNA-positive Bronchial-Lavage gefunden werden konnte [10] und eine Studie mit erfolgreicher Isolierung des Virus aus einer Patientin mit Pneumonie [42,43] sowie

einen positiven Mimivirus–DNA real-time PCR-Befund in einer Nasenspülflüssigkeit bei einem Säugling in China. Dieser litt während eines stationären Aufenthaltes an einer akuten Infektion der unteren Atemwege, als mögliche Komplikation seines angeborenen Atemnotsyndroms [44]. Alle weiteren Studien lieferten für verschiedene respiratorische Proben negative PCR-Ergebnisse.

Besonders interessant ist der Fall eines 38-jährigen Labormitarbeiters, der sich offensichtlich bei Arbeiten mit Mimivirus infiziert hat [39]. Er entwickelte eine respiratorische Klinik mit unproduktivem Husten, Fieber, Schüttelfrost und Symptomen einer Pneumonie. Eine beginnende Regeneration war nach 4 Wochen nachweisbar. Die klinischen Symptome persistierten vollständig. Infektionsbegleitend wurden Serumproben untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass der Patient einen Anstieg des anti-Mimivirus-Antikörper-Titers von 1:50 bis 1:3200 entwickelte.

Ähnliche Ergebnisse konnten durch die gezielte Infektion von BALB/c- und C57BL6-Mäusen mit einer enorm hohen Dosis von 10^9 Viruspartikeln beobachtet werden [45]. Von 12 Tieren entwickelten 9 (75%) histopathologische Anzeichen einer Pneumonie, während mit inaktivierten Viren behandelte Tiere gesund blieben. Bei erkrankten Tieren konnte Mimivirus aus der Lunge kultiviert werden.

Die dargestellten Daten lassen einen Zusammenhang zwischen der Seropositivität für Mimivirus und der Entwicklung einer Pneumonie vermuten. Dabei sind jedoch zahlreiche Fragen offen: Wie infizieren sich Patienten auf einer Intensivstation mit in Amöben replizierenden Viren? Sind die Infektionen in gesunden Kontrollpersonen asymptomatisch verlaufen? Sind Kinder eher gefährdet als erwachsene Patienten?

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Studien zur Prävalenz von Mimivirus

Region	Patienten	Material	n	Positiv
Kanada [10]	Erwachsene mit Pneumonie	Serum	376	36 (9,7%)
	Kontrollen: Gesunde Erwachsene	Serum	511	12 (2,3%)
Frankreich [10]	Erwachsene mit Pneumonie	Serum	26	5 (19,2%)
	Kontrollen: Gesunde Erwachsene	Serum	50	0
Frankreich [10]	Erwachsene auf der ITS mit Pneumonie	BAL	32	1 (3,1%)
	Kontrollen: Intubierte Patienten ohne Pneumonie	BAL	21	0
Frankreich [38]	Erwachsene auf ITS, Pneumonie, andere respiratorische Symptome	Serum	157	14 (8,9%)
	Kontrollen: Keine			
Frankreich [39]	Labormitarbeiter		1	1 (100%)
	Kontrollen: Entfällt			
Australien [46]	Erwachsene und Kinder mit ARTI	NSF	477	0
	Kontrollen: Keine			
Österreich [47]	Kinder mit CAP	NSF	214	0
	Kontrollen: Keine			
USA, Canada, Thailand [41]	Erwachsene und Kinder mit CAP und HAP	div. respi. Proben	496	0
	Kontrollen: Keine			
Italien [48]	Beatmete Patienten	BAL	69	0
	Kontrollen: Keine			

Holland [49]	COPD-Patienten	Sputum	220	0
	Kontrollen: Keine	Serum	109	3/109 (2,7%)
Frankreich [37]	Patienten mit Pneumonie	Serum	88	9/88 (10,2%)
	Kontrollen: Aufnahmeseren	Serum	29	1/29 (3,5%)
Tunesien (42)	Patienten mit CAP	div. respi. Proben	196	1/196 (0,5%)
China (74)	Kinder mit Infektionen die Bronchien betreffend/Pneumonie	NSF	2304/2034	1/3696 (0,027%)
	Kinder, Erwachsene mit Infektion der oberen und unteren Atemwege/Pneumonie	Rachenabstrich	768+624/ 401	

ITS: Intensivstation, NSF: Nasenspülflüssigkeit, ARTI: Acute respiratory tract infection, BAL: Bronchoalveolar-Lavage, CAP: Community-acquired pneumonia, HAP: Hospital-acquired pneumonia, COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

3.5 Acanthamöben als Erreger von Infektionen beim Menschen

Da Mimiviren abgesehen von Mäusen bislang nur in Acanthamöben kultiviert werden konnten und auch aus diesen isoliert wurden, ist davon auszugehen, dass auch eine Infektion des Menschen mit Mimiviren im Zusammenhang mit Amöben steht.

Acanthamöben werden weltweit gefunden und zählen zu den häufigsten Amöben in der Umwelt [50]. Sie werden in Süßwasser und im Boden, aber auch in Lüftungsanlagen gefunden, wo sie sich von Bakterien ernähren. Sie können im Menschen seltene, aber schwere Infektionen des Auges [51], der Haut oder des zentralen Nervensystems verursachen [52]. Über Läsionen der Haut oder die Lunge können die Amöben aufgenommen werden. Die meisten Menschen haben mindestens einmal im Leben Kontakt zu Acanthamöben, aber erkranken nur sehr selten [53]. Die Infektion des Auges, die Acanthamöben-Keratitis, kann bei immunkompetenten Personen auftreten und kann zur Blindheit führen [51]. Unter den Gesunden ist es gerade bei Trägern von Kontaktlinsen zu Infektionen durch kontaminierte Waschlösungen gekommen [54]. Die Granulomatöse-Amöben-Enzephalitis (GAE) tritt in der Regel bei immunsupprimierten Personen auf, wenn die Amöben es schaffen die Blut-Hirn-Schranke zu überschreiten, und ist mit einer Letalität von 95% verbunden. Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist bislang nicht beobachtet worden (48,49).

4 Ziele der Arbeit

Aus Deutschland sind keinerlei Daten zu Infektionen des Menschen mit Mimivirus bekannt. Die vorliegende Arbeit soll daher erstmals Daten zur Prävalenz von Mimivirus in Deutschland erheben, um Hinweise darauf zu erlangen, ob Mimivirus bisher für Infektionen unklarer Genese verantwortlich sein könnte.

- Das erste Ziel dieser Arbeit war es deshalb diagnostische Methoden zu etablieren, die
 - einerseits den sensitiven direkten Nachweis von Mimivirus erlauben, was mit Hilfe des Genomnachweises mit der PCR geschehen sollte und
 - andererseits Aussagen zur Seroprävalenz von Mimivirus ermöglichen und eine Differenzierung von Infektionen mit Acanthamöben zulassen.Diese Methoden sollten etabliert, optimiert und validiert werden.

- Die etablierten Methoden sollten anschließend genutzt werden um
 - die Seroprävalenz von Mimivirus in gesunden Blutspendern zu bestimmen
 - die Seroprävalenz und Virusprävalenz in Risikopatienten mit respiratorischen Erkrankungen zu bestimmen
 - sowohl mit serologischen als auch PCR-Verfahren zu untersuchen, ob immunsupprimierte Kinder im Verlauf der Stammzelltransplantation ein erhöhtes Risiko haben Mimivirus-positiv zu werden. Dazu mussten in Zusammenarbeit mit der Pädiatrischen Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie der Charité Berlin Proben gesammelt werden.

Die erhobenen Daten sollten dazu dienen, eine Risikobewertung von Mimiviren für den Menschen zu erstellen.

B Material und Methoden

1 Material

1.1 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte sind im folgenden Absatz aufgelistet. Standardlaborgeräte wie Zentrifugen, Pipetten, Vortexer etc. werden nicht aufgeführt.

Brutschränke	Heraeus, Hanau
Sicherheitswerkbänke	Heraeus, Hanau
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovert 200, Jena
PCR Cycler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Real-time PCR Cycler AB7500	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Real-time PCR Cycler MX3000	Stratagene, Santa Clara, CA, USA
Thermosealer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Elektrophoresegeräte DNA und Protein	GIBCO BRL, Eggenstein
Elektrophoresekammern DNA und Protein	GIBCO BRL, Eggenstein
Semi-Dry Blotter	BioRad, München
Geldokumentation	Herolab, Wiesloch
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
Ultrazentrifugen-Rotor 45Ti	Beckmann Coulter, Krefeld
Nanodrop Photometer	Nanodrop, Wilmington, DE, USA

1.2 Verbrauchsmaterialien

Wie bei den Geräten sind hier nur die Verbrauchsmaterialien gelistet, die nicht zur Standardausstattung eines virologisch-molekularbiologischen Labors gehören.

12-Feld Glasobjektträger	Menzel, Göttingen
Proteingele	Pierce, Rockford, IL, USA
Whatmann-Papier	VWR, Darmstadt
PVDF-Membran	VWR, Darmstadt
PCR-Platten	Applied Biosystems, Darmstadt
PCR-Versiegelungsfolien	Applied Biosystems, Darmstadt
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter, Krefeld

1.3 Reagenzien

Standardreagenzien sind nicht gelistet und werden gegebenenfalls in der Beschreibung der Methodendurchführung genannt.

Agarose	Sigma Aldrich, Darmstadt
DNA-Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Roth
100 bp DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Fluoreszenz Mounting Medium	Dako, Glostrup, DK
DAPI	Sigma Aldrich, Darmstadt
SDS	Sigma Aldrich, Darmstadt
Proteinstandard pageruler	Fermentas, St. Leon-Roth
Ponceaurot	Sigma Aldrich, Darmstadt
ECL-Reagenz	Pierce, Rockville, MD, USA
Trypsin /EDTA 0,25%/0,02%	BioChrom AG, Berlin

1.4 Zellen

WI-38	Adhärent wachsende humane Lungenfibroblasten, ATCC (#CCL-75)
Vero E6/7	Adhärent wachsende Affennieren-Epithelzellen, ATCC (#CCL-81)
Hep-2	Adhärent wachsende humane Carcinoma-Epithelzellen, ATCC (#CCL-23)
RAW 264.7	Adhärent wachsende murine Makrophagen (TIB-71)

1.5 Medien

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	Sigma Aldrich, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma Aldrich, Darmstadt
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe

1.6 Viren

Mimivirus

Mimivirus wurde von Dr. Albrecht Kiderlen, Robert Koch-Institut, zur Verfügung gestellt.

Modellviren

Influenzaviren A und Vaccinia-Viren VR1536 wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt [57] und dienten in definierten Titern als Modellviren zur Optimierung der Nukleinsäureextraktion aus simulierten Nasenspülflüssigkeiten.

1.7 Antikörper

Kaninchen anti-Mimivirus-Serum	RKI, FG 16
Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (Cy3-gekoppelt)	Dianova, Hamburg
Goat-Anti-Human IgG/FITC	Invitrogen, Karlsruhe

1.8 Kits

Nukleinsäureextraktion

PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit	Invitrogen, Karlsruhe
2Stratec RTP® DNA/RNA Virus Mini Kit	Stratec, Birkenfeld
NucleoSpin® RNA/DNA Buffer Set	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin® Triprep	Macherey & Nagel, Düren
Dynabeads® SILANE Viral NA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QIAamp MinElute Virus Spin Kit	Qiagen, Hilden
UltraSens Virus Kit	Qiagen, Hilden

Molekularbiologie

Qiagen one-step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Platinum DNA Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA-cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

1.9 PCR

In dieser Arbeit wurden verschiedene PCR-Assays verwendet. Im Rahmen der Methodenetablierung wurden die Modellviren Vaccinia-Virus und Influenza A Virus nachgewiesen. Für die Studie zur Prävalenz von Mimiviren wurden Mimivirus-spezifische PCRs etabliert sowie bereits etablierte PCRs für den Nachweis zellulärer DNA und von Acanthamoeben-DNA eingesetzt.

Tabelle 3: Real-time PCR zum Nachweis von Orthopockenvirus-DNA [58]

System	Gen	O L	Tm °C
Kurth et al.	Viral core cysteine proteinase (129 bp)		EF675191
Pox4all F	TAATACTTCgATTgCTCATCCAgg	S	54898-921 56,8
Pox4all R	ACTTCTCACAAATggATTTgAAAATC	A	55026-001 56,4
Pox4all TM	FAM-TCCTTTACgTgATAAATCAT MGB	S	54980-99 70,0

O: Orientierung, S= Sense, A= Antisense; bp: Basenpaare; L: Lokalisierung: Bindungsstellen der Primer und Sonden auf dem Influenzavirus Genbank-Eintrag EF675191; Tm: Schmelztemperatur der Oligonukleotide berechnet nach der Nearest Neighbor Methode; FAM: Fluorescein-Markierung als Reporter am 5'-Ende der Sonde; MGB: Minor Groove Binder; NFQ: Nicht Fluoreszierender Quencher.

Tabelle 4: Real-time PCR zum Nachweis von Influenza A Virus-RNA [59]

System	Gen	O L	Tm °C
Schulze et al.	Matrix protein (101 bp)		KU761515
M+25	AgATgAgTCTTCTAACCgAggTCg	S	9-32 57,8
M-124BB	CCWgCAAARACATCYTCAAgTYTCTg	A	110-86 56,5
M-124sw	-CTgCAAAGACACTTTCAGTCTCTg	A	109-86 58,4
M+64 MGB	FAM-TCAggCCCCCTCAA MGB	S	59-72 69,0

O: Orientierung, S= Sense, A= Antisense; bp: Basenpaare; L: Lokalisierung: Bindungsstellen der Primer und Sonden auf dem Influenzavirus Genbank-Eintrag KU761515; Tm: Schmelztemperatur der Oligonukleotide berechnet nach der Nearest Neighbor Methode; FAM: Fluorescein-Markierung als Reporter am 5'-Ende der Sonde; MGB: Minor Groove Binder; NFQ: Nicht Fluoreszierender Quencher.

Tabelle 5: Real-time PCR zum Nachweis von humaner DNA [58]

System	Gen	O L	Tm °C
Kurth et al.	c-myc (81 bp)		K01906
c-myc F	gCCAgAggAggAACgAgCT	S	427-445 58,8°C
c-myc R	gggCCTTTTCATTgTTTTCCA	A	507-487 59,2°C
c-myc TM	FAM-ATgCCCTgCgTgACCAgATCC q	S	480-461 66,4°C

O: Orientierung, S= Sense, A= Antisense; bp: Basenpaare; L: Lokalisierung: Bindungsstellen der Primer und Sonden auf dem c-myc Genbank Eintrag K01906; Tm: Schmelztemperatur der Oligonukleotide berechnet nach der Nearest Neighbor Methode; FAM: Fluorescein-Markierung als Reporter am 5'-Ende der Sonde; q: Quencher.

Tabelle 6: Primer und Sonden der verwendeten real-time PCR und konventionellen PCR zur Sanger-Sequenzierung zum Nachweis von Mimivirus

System	Gen	O	L	Tm °C
F/R	COG1758 DNA-directed RNA polymerase (89 bp)		JN036606.1	
Mimi F	TgATgCTCCAgATgACgAATTA _g	S	153303-25	56,0
Mimi R	CgTCACCATCAgTATCATACTCAgC	A	153391-67	57,2
Mimi TMGB	FAM-TCAgCCACTTTAgATATT MGB NFQ	S	153334-51	69,0
up/do	COG0513 Superfamily II DNA/RNA helicases (81 bp)			
Mimi up	gCCCAATTCAgAATCCACTTgT	S	688043-64	58,4
Mimi do	gCCgTTCCCATATTTTTgTAA	A	688123-02	58,1
Mimi 2 TMGB	FAM-AATggATCATTCAAATTATCAA MGB NFQ	S	688067-88	68,0
SeqPCR	hypothetical protein (604 bp)			
Mimi seqF	gTCAACggAACAgTTCTTCTACC	S	409666-88	55,9
Mimi seqR	TCACgTAATCCATCCAATACTgATACT	A	410270-44	56,3

O: Orientierung, S= Sense, A= Antisense; bp: Basenpaare; L: Lokalisierung: Bindungsstellen der Primer und Sonden auf dem Mimivirus-Genom mit dem Genbank-Eintrag JN036606.1; Tm: Schmelztemperatur der Oligonukleotide berechnet nach der Nearest Neighbor Methode; FAM: Fluorescein-Markierung als Reporter am 5'-Ende der Sonde; MGB: Minor Groove Binder; NFQ: Nicht Fluoreszierender Quencher.

Tabelle 7: Primer und Sonde der verwendeten real-time PCR zum Nachweis von Acanthamoeben [60]

System	Gen	O	L	Tm °C
Qvarnstrom et al.	18S rRNA (180 bp)			
AcantF900	CCCAgATCgTTTACCgTGAA	S	3-22	57,4
AcantR1100	TAAATATTAATGCCCCCAACTATCC	A	182-158	58,1
AcantP1000	Cy5 CTgCCACCGAATACATTAgCATgg BHQ3	S	59-82	62,7

O: Orientierung, S= Sense, A= Antisense; bp: Basenpaare; L: Lokalisierung: Bindungsstellen der Primer und Sonden auf dem *Acanthamoeba*-Genom mit dem Genbank-Eintrag KT892925.1; Tm: Schmelztemperatur der Oligonukleotide berechnet nach der Nearest Neighbor Methode; Cy5: Markierung als Reporter am 5'-Ende der Sonde; BHQ3: Nicht Fluoreszierender Quencher.

1.10 Untersuchte Proben

1.10.1 Blutspender

Zur Untersuchung der Seroprävalenz von Mimivirus in gesunden Blutspendern konnte auf ein anonymisiertes Probenkollektiv von Serumproben der Blutbank der Charité zurückgegriffen werden, welches von Prof. Axel Pruss zu diesem Zweck zur Verfügung gestellt wurde (aus den Jahren 2010 und 2011). Blutspender wurden ausschließlich serologisch untersucht.

1.10.2 Patienten mit Verdacht auf Pneumonie und anderer respiratorischer Symptomatik

Für die Untersuchung von Patienten mit respiratorischer unerklärter Symptomatik oder einer diagnostizierten Pneumonie wurden insgesamt 49 Proben untersucht. Davon wurden 43 Proben von Dr. Albrecht Kiderlen, RKI, FG 16, zur Verfügung gestellt. Während von 25 der 43 Proben ausschließlich Serumproben ohne weitere Angaben als eine respiratorische Erkrankung bzw. Pneumonie zur Verfügung standen (Gruppe 1), konnten Proben von 15 Patienten sowohl serologisch als auch mittels PCR in korrespondierenden Bronchiallavagen untersucht werden (Gruppe 2, Tabelle 8). Proben von 6 Patienten wurden in der Rettungsstelle der Kinderklinik der Charité Campus Virchow Klinikum nach Aufklärung der Patienten und Eltern gesammelt und wurden sowohl serologisch mit der IFA als auch in korrespondierenden Nasenspülwasser- bzw. Rachenspülwasser-Proben mittels PCR auf Mimivirus untersucht (Gruppe 3, Tabelle 9).

Tabelle 8: Zusammenfassung der bekannten Daten für die Patientengruppe 2 (G2)

Patient#	Material	Vom	Alter	w/m	Anamnese	Respi-PCR
G2-01	Serum	02.01.12	67	m	Z.n. KMT	
G2-01	BAL	19.12.11	67	m	Z.n. KMT	Negativ
G2-02	Serum	27.12.11	65	m	Pneumonie Z.n. allo PBSZT bei B-ALL	
G2-02	BAL	27.12.11	65	m	Pneumonie Z.n. allo PBSZT bei B-ALL	Negativ
G2-02	Serum	22.12.11	65	m	Pneumonie Z.n. allo PBSZT bei B-ALL	
G2-02	BAL	13.12.11	65	m	Pneumonie Z.n. allo PBSZT bei B-ALL	Negativ
G2-03	Serum	21.12.11	57	m	Infektion der Luftwege	
G2-03	BAL	21.12.11	57	m	Infektion der Luftwege	Negativ
G2-04	Serum	18.11.11	67	m	Infektion der Luftwege	
G2-04	BAL	11.05.11	67	m	Infektion der Luftwege	Negativ
G2-05	Serum	13.12.11	54	m	Z.n. HTX	
G2-05	BAL	13.12.11	54	m	Z.n. HTX	Negativ
G2-06	Serum	12.12.11	48	w	Pneumonie, CVID	
G2-06	BAL	12.12.11	48	w	Pneumonie, CVID	Negativ
G2-07	Serum	12.12.11	14	w	Chron. Pneumonie	
G2-07	BAL	13.12.11	14	w	Chron. Pneumonie	Negativ
G2-08	Serum	12.12.11	8	w	Unklarer Immundefekt	
G2-08	BAL	12.12.11	8	w	Unklarer Immundefekt	Negativ
G2-09	Serum	08.12.11	26	w	Pneumonie, Z.n. KMT	
G2-09	BAL	08.12.11	26	w	Pneumonie, Z.n. KMT	Negativ
G2-10	Serum	09.12.11	35	w	Keine Diagnose	
G2-10	BAL	07.12.11	35	w	Keine Diagnose	Negativ
G2-11	Serum	06.12.11	64	w	Infektion der Luftwege	
G2-11	BAL	22.12.11	64	w	Infektion der Luftwege	Negativ
G2-12	Serum	16.11.11	64	w	Z.n. LTX	
G2-12	BAL	22.12.11	64	w	Z.n. LTX	Negativ
G2-12	Serum	09.11.11	64	w	Z.n. LTX	
G2-12	BAL	15.11.11	64	w	Z.n. LTX	Negativ
G2-13	Serum	21.12.11	21	w	Z.n. LTX, Mukoviszidose	
G2-13	BAL	22.12.11	21	w	Z.n. LTX, Mukoviszidose	Rhinovirus
G2-14	Serum	22.11.11	52	m	Z.n. LTX	
G2-14	BAL	28.10.11	52	m	Z.n. LTX	Negativ
G2-14	Serum	21.10.11	52	m	Z.n. LTX	
G2-14	BAL	21.10.11	52	m	Z.n. LTX	Negativ
G2-15	Serum	17.10.11	46	w	COPD bei α 1-Antitrypsin-Mangel Vor LTX	
G2-15	BAL	14.10.11	46	w	COPD bei α 1-Antitrypsin-Mangel Vor LTX	Rhinovirus

BAL: Bronchoalveoläre Lavage, m: männlich, w: weiblich, Z.n. Zustand nach, KMT: Knochenmark-Transplantation, PBSZT: Periphere Blutstammzell-Transplantation, B-ALL: B- Akute lymphatische Leukämie, HTX: Herz-Transplantation, CVID: Common variable immune deficiency, LTX: Leber-Transplantation, COPD: Chronic obstructive pulmonary disease.

Tabelle 9: Zusammenfassung der bekannten Daten für die Patientengruppe 3 (G3)

Patient#	Material	vom	Alter	w/m	Anamnese	
G3-01	Serum	13.01.12	2	w	Bronchopneumonie	RSV-Schnelltest positiv
G3-01	NSF					RSV-PCR positiv
G3-02	Serum	20.01.12	11	m	Bronchopneumonie	RSV fraglich
G3-02	NSF					Bocavirus fraglich
G3-03	Serum	20.01.12	1	m	RSV-Bronchiolitis	RSV staG3-positiv
G3-03	NSF					
G3-04	Serum	27.01.12	3	m	Bronchopneumonie mit obstruktiver Bronchitis	
G3-04	NSF					
G3-05	Serum	31.01.12	2	w	Bronchopneumonie RSV-Bronchiolitis	
G3-05	NSF					
G3-06	Serum	31.1.12	12	w	Pneumonie	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
G3-06	NSF					<i>Enterobacter Cloreacea</i>

NSF: Nasenspülflüssigkeit, m: männlich, w: weiblich, RSV: Respiratorisches Synzytialvirus

1.10.3 Immunsupprimierte Patienten der Pädiatrischen Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie

In dieser Gruppe wurden zwischen März 2011 und November 2012 insgesamt 24 Kinder beprobt, von denen 18 Kinder im Alter von 1 bis 18 Jahren in die Studie eingeschlossen werden konnten. Diese wurden im Verlauf ihrer hämatopoetischen Stammzelltransplantation an der Berliner Charité – Campus Virchow Klinikum auf das Mimivirus untersucht. Basierend auf den unterschiedlichen hämatologisch-onkologischen Diagnosen wurden die Indikationen der Transplantationen gestellt. Die Proben wurden im Verlauf der Transplantation an vorher festgelegten Tagen gewonnen und für die spätere Untersuchung aliquotiert. Die ersten Proben wurden jeweils vor der geplanten Transplantation, alle weiteren Proben möglichst an den Tagen 30, 60, 100 und 200 nach der Stammzelltransplantation abgenommen.

Das Probenmaterial umfasste für jeden eingeschlossenen Patienten nach Möglichkeit jeweils Nasopharyngealsekrete für die PCR und Serum für serologische Untersuchungen vor und zu einem späten Zeitpunkt nach der Transplantation. Insgesamt wurden in dieser Gruppe 68 Nasopharyngealsekrete mit der PCR und 31 Seren mit serologischen Verfahren untersucht. Tabelle 10 fasst die einzelnen Proben im Verlauf jedes untersuchten Patienten zusammen.

Tabelle 10: Proben (x) und Zeitpunkte in Tagen der Probenahme von immunsupprimierten Kindern

Patient#	Material	Alter	w/m	Prä TX	d30	d60	d100	d200
KMT01	NSF	18	m	x	x			x
KMT01	Serum			x				x
KMT02	NSF	7	m	x	x	x	x	x
KMT02	Serum			x				x
KMT03	NSF	10	m	x	x			x/x
KMT03	Serum			x				x
KMT04	NSF	5	w	x	x	x		x
KMT04	Serum			x				x
KMT05	NSF	3	m	x	x		x	
KMT05	Serum			x			x	
KMT06	NSF	12	w	x	x	x	x	x
KMT06	Serum			x				x
KMT07	NSF	4	m	x	x		x	x/x
KMT07	Serum			x				x
KMT08	NSF	12	m	x	x			x
KMT08	Serum			x				x
KMT09	NSF	7	w	x			x	
KMT09	Serum			x			x	
KMT10	NSF	15	m	x			x	x
KMT10	Serum			x				x
KMT11	NSF	17	m	x		x	x	x
KMT11	Serum			x			x	
KMT12	NSF	17	w	x		x		x
KMT12	Serum			x				x
KMT13	NSF	1	m	x				x
KMT13	Serum							x
KMT14	NSF	12	w	x	x		x	x/x
KMT14	Serum							x
KMT15	NSF	14	m	x	x	x	x	x
KMT15	Serum							x
KMT16	NSF	15	m	x	x	x		x
KMT16	Serum							x
KMT17	NSF	8	m	x	x	x		x
KMT17	Serum							x
KMT18	NSF	12	w	x		x	x	x
KMT18	Serum							x

NSF: Nasenspülflüssigkeit, m: männlich, w: weiblich

Neben diesen in Tabelle 10 genannten Proben wurden ebenfalls einzelne Nasopharyngealsekret-Proben mit der PCR untersucht, zu denen kein Zeitverlauf und kein korrespondierendes Serum zur Verfügung standen.

2 Methoden

2.1 Zellkultur und Virusanzucht

Anzucht von Mimiviren in *Acanthamoeba polyphaga* Linc AP-1

Die Anzucht der Viren erfolgte in Kooperation mit Dr. Albrecht Kiderlen, FG 16 des Robert Koch-Instituts, da dort eine große Expertise im Arbeiten mit Amöben besteht und in den Räumen der Virologie nicht mit Amöben gearbeitet werden sollte. In Kürze wurden Acanthamöben in 75 cm² Zellkulturflaschen mit Peptone Hefeextrakt Glukose Medium angezüchtet, und nach Begutachtung der Lyse der Amöben wurden die Zellen geteilt und nicht infizierten Amöben zugefüttert. Eine genaue Quantifizierung infektiöser Mimivirus-Partikel war nicht möglich.

Aufreinigung von Mimiviren

Für die Aufreinigung von Mimivirus-Partikeln wurden Amöben bis zur höchstmöglichen Lyse kultiviert. Nicht lysierte Amöbenzellen wurden bei 100 × g für 15 Minuten pelletiert und der Mimivirus-Partikel-haltige Überstand abgenommen und bei 4.000 × g für 30 min pelletiert und 3 mal mit PBS gewaschen. Das Pellet des letztes Waschschrtes wurde in 1 mL PBS aufgenommen und resuspendiert. Für besonders reine Mimivirus-Präparationen wurde der Zellkulturüberstand durch Zentrifugation durch ein Saccharose-Kissen (30%) bei 60.000 × g in einem SW28 Rotor bei 4°C im Vakuum für 2 Stunden zentrifugiert und das Pellet in 200 µL PBS resuspendiert.

Mimivirus-Genomsequenzierung

Um eine genauere Kenntnis des Mimivirus-Stamms zu erhalten, mit dem hier gearbeitet wurde, konnte im RKI-internen Sequenzierlabor eine Vollgenomsequenzierung durchgeführt werden. Aus aufgereinigten Mimivirus-Partikeln wurde die DNA mit dem Invitrogen PureLink Kit nach Angaben des Herstellers extrahiert und wie in der Gruppe etabliert [61] mit Hilfe der 454-Technologie mit Standardreagenzien von Dr. Aleksandar Radonić sequenziert. Die erhaltenen *reads* wurden von Dr. Aleksandar Radonić mit der Roche Software FLX *mapper* auf den Genbank-Eintrag JN036606.1 gemappt [34]. Die mittlere *coverage* betrug 125, und es ergab sich eine Übereinstimmung von 99,9% im Vergleich zur Referenz.

Propagierung von Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien fand in 75 cm²-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Feuchtbrutschrank statt. WI-38-Zellen wurden in EMEM kultiviert. Für die

Infektionsversuche wurden Vero- und Hep-Zellen in DMEM, RAW 264-Zellen in RPMI 1640 vermehrt. Allen Medien wurden 10 % FKS und 2 mM L-Glutamin zugesetzt. Die Zellen wurden 2 mal pro Woche passagiert, wofür sie mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) abgelöst, in 10 mL frischem Medium resuspendiert und auf weitere Flaschen verteilt wurden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

Infektionsversuche mit Mimivirus

Für die Untersuchung der Suszeptibilität verschiedener Zelllinien für Mimiviren wurden die genannten Zellen mit aufgereinigten Mimiviren in einem kleinen Volumen inkubiert. Das Medium wurde dazu abgenommen, die Viren zugegeben und nach 1 h Inkubation im Feuchtbrutschrank wieder abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit frischem Medium weitere 4–7 Tage inkubiert. Die Infektion der Zellen wurde mit den etablierten Methoden PCR und Immunfluoreszenzfärbung untersucht.

2.2 Herstellung der Modell-BALs

Zur Optimierung der Probenaufarbeitung wurde sterile isotone Kochsalzlösung mit verschiedenen Viren (Influenza A Virus, Vaccinia-Virus und Mimivirus) gespikt, wobei versucht wurde mit möglichst kleinen Volumina der Virus-Suspensionen in das Gesamtvolumen von 5 mL zu spiken. Die Viren wurden als Zellkulturüberstand oder Allantoisflüssigkeit aus der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt und die Genomäquivalente der einzelnen Viren mittels quantitativer real-time PCR quantifiziert. Die Viren wurden so verdünnt und in die Lösung eingesetzt, dass nach der Extraktion pro PCR-Reaktion etwa eine Menge von 1.000 Genomäquivalenten nachgewiesen werden konnte ($\sim C_T$ -Wert 30).

2.3 Anreicherung der Viren aus Nasenspülflüssigkeiten

Um die Ausbeute an Viren bei der PCR-Diagnostik zu erhöhen, wurden verschiedene Ansätze der Anreicherung von Viruspartikeln vor der Nukleinsäureextraktion verglichen.

Ultrazentrifugation

Die simulierten Nasenspülflüssigkeiten wurden in Zentrifugenröhrchen gegeben, austariert und bei 4°C im Vakuum für 30 Minuten bei 35.000 rpm ohne Bremse in einem 45Ti-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Restvolumen so gering wie möglich gehalten; im Idealfall wurde das Pellet in 200 µL PBS resuspendiert. Für die

Nukleinsäureextraktion und Quantifizierung mittels PCR wurde das Volumen in die Berechnung der Ausbeute einbezogen.

Anreicherung durch Polymerfällung

Da dieses Verfahren noch nicht kommerziell erhältlich war, ist die Vorgehensweise detailliert beschrieben.

Die Anreicherung beginnt mit dem Vorlegen von 10 µl Reagens VCR 1 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Genau 1.0 ml der Probe wird in dasselbe Reaktionsgefäß gegeben und die Probe durch Vortexen gut gemischt. Die Probe sollte Raumtemperatur haben und der pH-Wert nach Möglichkeit neutral sein. Es erfolgt die Zugabe von 40 µl Reagens VCR 2 und kräftiges Vortexen für 5 s. Die Mischung wird für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei mindestens 14.000 rpm für 2 Minuten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Der Überstand wird vollständig entfernt und anschließend werden 50 µl VCR 3 sowie 1 µl VCR 4 (bei mehreren Proben kann auch ein Mix angesetzt werden) zugegeben. Es folgt eine Inkubation auf einem Thermomixer unter kontinuierlichem Schütteln (1.400 rpm) bei 37°C bis zur Lösung der Pellets. Die Inkubationsdauer ist abhängig von der Probe und kann zwischen 5 min und 20 min schwanken. Sollte sich das Pellet nicht aufgelöst haben, dann ist die Inkubationszeit zu erhöhen. Das Auflösen des Pellets sollte genauestens beobachtet werden, da ein unvollständig aufgelöstes Pellet zu einer schlechten Virusausbeute führt. Die Lösung wird direkt in die Nukleinsäureextraktion eingesetzt.

Mehrfachlyse und Extraktion

Bei diesem Ansatz wurde grundsätzlich nach den Angaben des Herstellers für das PureLink RNA/DNA Mini Kit der Firma Invitrogen verfahren. In Kürze wurde die Lyse von 200 µL Probe mit 25 µL Proteinase K und 200 µL Lysepuffer durch 15 s Vortexen und 15-minütige Inkubation bei 56°C im Heizblock durchgeführt. Die Röhrchen wurden kurz anzentrifugiert und 250 µL Ethanol (96–100%) zugegeben und gevortext. Es folgte eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur und die Übertragung des gesamten Volumens auf eine *Viral Spin Column*. Die Flüssigkeit wurde durch 1-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge durch die Membran zentrifugiert. Anstatt nun mit dem Waschen zu beginnen, wurden mehrere Lysate auf die Säule gegeben und nacheinander durch die Matrix der Säule zentrifugiert. Waren alle Lysate aufgetragen, wurde nach Protokoll mit dem Waschen und der Elution fortgefahren.

2.4 Nukleinsäureextraktion

Die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgte sowohl während der Etablierungs- und Optimierungsphase als auch im Rahmen der Prävalenzstudien immer nach Angaben des Herstellers und ist hier nicht im Einzelnen vermerkt.

2.5 PCR-Protokolle

Alle PCR-Reaktionen wurden mit der Platinum DNA Taq Polymerase und den entsprechenden Reagenzien der Firma Invitrogen durchgeführt. Lediglich für die Versuche zur Optimierung der Nukleinsäureextraktion wurde das Qiagen one-step RT-PCR Kit zur Quantifizierung von Influenzavirus-Genomen verwendet.

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen für die real-time PCR zum Nachweis von Orthopockenviren [58]

Reagens		T	Zeit	Zyklen
10x Platinum Puffer – MgCl ₂	2,5 µL	95°C	600 s	1x
dUTP (je 2,5 mM)	1,0 µL	95°C	15 s	40x
Taq DNA Polymerase	1,0 U	60°C	30 s	
MgCl ₂	4,0 mM			
pox4all F (10mM)	0,75 µL			
pox4all do (10 mM)	0,75 µL			
pox4all TMGB (10 mM)	0,25 µL			
PCR Wasser	add 20,0 µL			
DNA	5,0 µL			
Reaktionsvolumen	25,0 µL		Laufzeit	95 min

Tabelle 12: Reaktionsbedingungen für die real-time one-step RT-PCR zum Nachweis von Influenza A Viren (58)

Reagens		T	Zeit	Zyklen
2x Qiagen-Puffer	12,5 µL	50°C	1800 s	1x
RT-Mix	0,25 µL	95°C	900 s	1x
M+25 (10 mM)	1,25 µL	95°C	15 s	45x
M-124BB (10 mM)	0,65 mM	60°C	3 0s	
M-124sw (10 mM)	0,65 µL			
M+64 MGB (10 mM)	0,5 µL			
PCR-Wasser	add 23,0 µL			
RNA	2,0 µL			
Reaktionsvolumen	25,0 µL		Laufzeit	130 min

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für die Uniplex-Mimivirus real-time PCRs F/R und up/do

Reagens		T	Zeit	Zyklen
10x Platinum-Puffer – MgCl ₂	2,5 µL	95°C	600 s	1x
dUTP (je 2,5 mM)	1,0 µL	95°C	15 s	40x
Taq DNA Polymerase	1,0 U	60°C	30 s	
MgCl ₂	4,0 mM			
Primer F oder up (10 mM)	0,75 µL			
Primer R oder do (10 mM)	0,75 µL			
TMGB oder 2 TMGB (10 mM)	0,25 µL			
PCR-Wasser	add 20,0 µL			
DNA	5,0 µL			
Reaktionsvolumen	25,0 µL		Laufzeit	95 min

Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für die Duplex-Mimivirus real-time PCR

Reagens		T	Zeit	Zyklen
10x Platinum-Puffer – MgCl ₂	2,5 µL	95°C	600 s	1x
dUTP (je 2,5 mM)	1,0 µL	95°C	15 s	40x
Taq DNA Polymerase	1,0 U	60°C	30 s	
MgCl ₂	4,0 mM			
Primer F und up (10 mM)	je 0,75 µL			
Primer R und do (10 mM)	je 0,75 µL			
TMGB und 2 TMGB (10 mM)	je 0,25 µL			
PCR-Wasser	add 20,0 µL			
DNA	5,0 µL			
Reaktionsvolumen	25,0 µL		Laufzeit	95 min

Tabelle 15: Reaktionsbedingungen für die konventionelle Mimivirus-PCR

Reagens		T	Zeit	Zyklen
10x Platinum-Puffer – MgCl ₂	2,5 µL	95°C	600 s	1x
dUTP (je 2,5 mM)	1,0 µL	95°C	15 s	
Taq DNA Polymerase	1,0 U	60°C	30 s	40 x
MgCl ₂	2,0 mM	72°C	30 s	
Primer MimiseqF (10 mM)	je 0,75 µL	4°C	∞	
Primer Mimiseq R (10 mM)	je 0,75 µL			
PCR-Wasser	add 20,0 µL			
DNA	5,0 µL			
Reaktionsvolumen	25,0 µL		Laufzeit	120 min

Tabelle 16: Reaktionsbedingungen für die c-myc-PCR zum Nachweis humaner DNA [58]

Reagens		T	Zeit	Zyklen
10x Platinum-Puffer – MgCl ₂	2,5 µL	95°C	600 s	1x
dUTP (je 2,5 mM)	1,0 µL	95°C	15 s	40x
Taq DNA Polymerase	1,0 U	60°C	30 s	
MgCl ₂	4,0 mM			
c-myc F (10 mM)	0,75 µL			
c-myc R (10 mM)	0,75 µL			
c-myc TM (10 mM)	0,25 µL			
PCR-Wasser	add 20,0 µL			
DNA	5,0 µL			
Reaktionsvolumen	25,0 µL		Laufzeit	95 min

Tabelle 17: Reaktionsbedingungen der real-time PCR zum Nachweis von Acanthamoeben [60]

Reagens		T	Zeit	Zyklen
10x Platinum-Puffer – MgCl ₂	2,5 µL	95°C	120 s	1x
dUTP (je 2,5 mM)	1,0 µL	95°C	15 s	40x
Taq DNA Polymerase	1,0 U	63°C	60 s	
MgCl ₂	4,0 mM			
AcantF900 (10 mM)	1,25 µL			
AcantR1100 (10 mM)	1,25 µL			
AcantP1000 (10 mM)	0,6 µL			
PCR-Wasser	add 20,0 µL			
DNA	1,0 µL			
Reaktionsvolumen	25,0 µL		Laufzeit	95 min

2.6 Ermittlung der Nachweisgrenze der Mimivirus real-time PCR

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze der Mimivirus real-time PCR wurden Plasmide kloniert, welche die jeweiligen Zielregionen der PCR-Assays enthielten. Dazu wurden nach Angaben des Herstellers für das TOPO-TA Cloning Kit der Firma Invitrogen verfahren. Die Plasmide wurden mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit präpariert (www.qiagen.com/Plasmid-Kits) und die Konzentration mit Hilfe des Nanodrop-Geräts bestimmt. Es wurden Verdünnungsreihen erstellt und mit den Uniplex-PCR-Assays sowie der Duplex-Mimivirus-PCR gemessen. Für die Probitanalyse wurden je 8 Verdünnungsstufen vorgelegt und mit der PCR gemessen. Die Berechnung der Nachweisgrenze erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 10.0.

2.7 Nachweis der Spezifität der Mimivirus real-time PCR

Obwohl die Primer und Sonden der Mimivirus real-time PCR so ausgewählt wurden, dass theoretisch keine Kreuzreaktionen mit anderen Pathogenen oder humaner DNA auftreten sollten, wurde dies in der Praxis noch einmal untersucht. Zu diesem Zweck wurde DNA bzw. cDNA von 18 verschiedenen Pathogenen und humane DNA mit der Mimivirus-PCR getestet. Die einzelnen Nukleinsäuren hatten wo bekannt hohe Konzentrationen und mindestens C_T -Werte von <30 in den jeweiligen spezifischen real-time PCR-Assays.

2.8 Präparation der IFA slides

Zur Herstellung der Glasobjektträger für den Immunfluoreszenztest wurden WI-38-Zellen der 32. Passage über Nacht auf 12-Feld-Glasobjektträgern im Brutschrank inkubiert, damit am nächsten Tag ca. 3.000 Zellen pro Feld erhalten wurden. Das Medium wurde abgenommen und aufgereinigte Mimivirus-Partikel über Nacht im Brutschrank auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet, für 1 h in Aceton fixiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Färbung wurden $20\ \mu\text{l}$ /Feld Serum-Verdünnungen der Stufen 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280 (in PBS + 2% BSA) 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach $3 \times$ PBS-Waschschritten wurden FITC-markierte anti-human Sekundärantikörper inkubiert. Wieder wurde $3 \times$ mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Färbung der Zellkerne mit DAPI in PBS bei 37°C für 10 min. Nach einem letzten Waschschritt wurden die Objektträger mit Mounting-Medium eingedeckelt und an einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.9 Etablierung des Mimivirus-Western Blots

Der Western Blot als Bestätigungstest für den Immunfluoreszenztest erforderte die denaturierende Gelelektrophorese, in welcher die Mimivirus-Proteine in einem Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) aufgetrennt werden mussten. Die Quantifizierung der Mimivirus-Proteinlysate erfolgte mittels BCA Protein Assay Kit in Mikrotiterplatten nach Angaben des Herstellers, war jedoch bei den aufgereinigten Mimivirus-Partikeln außerhalb des Messbereichs. Als Gele wurden Gradientengele (8–16%) verwendet. Die Proben wurden 5 min bei 95°C mit 2-fach Probenladepuffer gekocht und nach dem Abkühlen im Eisbad auf die Gele aufgetragen. Die Trennung erfolgte für 45 min bei 150 V in Tris-HEPES-SDS-Laufpuffer. Je $5\ \mu\text{l}$ Proteinstandard wurden zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine mitgeführt.

Der Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen erfolgte nach Äquilibrierung der Gele für 2×5 min in Transferpuffer. Von unten (Anode) nach oben (Kathode) wurden 3 Schichten in

Transferpuffer eingeweichtes Whatman-Papier, Methanol-aktivierte PVDF-Membran, das Gel sowie 3 weitere Schichten Whatman-Papier luftblasenfrei aufgestapelt und mit dem Deckel verschlossen. Der Blotvorgang selbst erfolgte für 20 min bei 15 V und 400 mA. Die Kontrolle des Transfers erfolgte durch 1-minütige Färbung mit Ponceaurot-Lösung.

Die PVDF-Membran wurde über Nacht bei 4°C geblockt, 1 h bei Raumtemperatur mit Serumverdünnungen von 1:250 inkubiert, gefolgt von 3 Waschschritten und 1 h Inkubation mit anti-Human IgG HRP in einer Verdünnung von 1:5000 oder 1:10000 inkubiert. Es folgte die Detektion mit dem SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrats am Chemi-Smart[™] 3 000.

2.10 Probengewinnung im Rahmen der Untersuchung immunsupprimierter Kinder

Nach Aufklärung der Patienten und derer Eltern, wie im Ethikantrag beschrieben (gestellt durch PD Dr. Sebastian Voigt, EA2/111/11) und in der Anlage gezeigt, wurden die Patienten in die Studie eingeschlossen. Die Probenahme erfolgte durch mich selbst oder das ärztliche Personal der Pädiatrischen Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie.

Venöses Blut wurde in Antikoagulant-freie Vacutainer-Röhrchen in der Kinderklinik entnommen, die Röhrchen 5–6 mal invertiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Wurden die Proben nicht sofort bearbeitet, erfolgte die Lagerung über Nacht bei 4°C gekühlt. Spätestens am Tag nach der Abnahme wurde das Blut im Labor bei 3.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen, aliquotiert und gegebenenfalls bei -20°C eingefroren.

Zur Probengewinnung von erregerbedingtem Material aus der Nasenhöhle wurden 5 ml sterile isotonische Kochsalzlösung (0,9%) in eine 5 mL Einwegspritze aufgezogen und der Kopf des Patienten zurückgebeugt (Reklination) und wenn möglich der "K"-Laut phoniert um die Choanen zu verschließen. Das gesamte Volumen wurde in den 1. unteren Nasengang eingeführt und sollte im Idealfall für ca. 5–10 Sekunden in der Nasenhaupthöhle verbleiben. Danach wurde der Kopf des Patienten nach vorne gebeugt (Inklination) und das Material in einem sterilen Röhrchen aufgefangen. Das Procedere wurde mit dem 2. unteren Nasengang wiederholt. Um das Risiko einer Infektion für die Patienten so gering wie möglich zu halten wurden Proben in der Regel von Klinikpersonal gewonnen.

C Ergebnisse

1 Etablierung diagnostischer Verfahren für Mimivirus

Ziel dieses Teilprojektes war die Etablierung von diagnostischen Verfahren, welche einerseits den direkten und sensitiven Nachweis des Mimivirus-Genoms mittels PCR erlauben, andererseits den indirekten, serologischen Nachweis von Mimivirus und deren Abgrenzung von Acanthamoeben in verschiedenen Patientenkollektiven ermöglichen sollten.

1.1 Etablierung molekularbiologischer Verfahren zum Mimivirus-Nachweis

1.1.1 Optimierung der Extraktion von Gesamtnukleinsäuren aus Nasenspülflüssigkeiten

Aus der Literatur ist bekannt, dass nur in zwei Patienten bislang Mimivirus-DNA in respiratorischen Proben nachweisbar war [10,42]. Um die Nachweiswahrscheinlichkeit möglichst hoch zu gestalten, wurden deshalb verschiedene Kits für die Präparation von Nukleinsäuren aus Nasenspülflüssigkeiten bezüglich ihrer Ausbeuten für DNA und RNA aus Modellviren verglichen. Obwohl es sich bei Mimivirus um ein DNA-Virus handelt, sollte so die Möglichkeit erhalten werden, differentialdiagnostisch relevante RNA-Viren aus denselben Proben nachweisen zu können.

Für den Vergleich wurden Nasenspülflüssigkeiten erstellt, die als Modellviren Influenzavirus A (FLU) und Vaccinia-Virus (VACV) im Bereich ~1000 Kopien/PCR-Reaktion enthielten. Die folgenden Kits wurden entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt und die eluierten viralen Nukleinsäuren mit Virus-spezifischen real-time PCR-Systemen quantifiziert. Die Messung wurde einmal wiederholt. Es zeigte sich, dass das PureLink Kit der Firma Invitrogen die besten Ausbeuten für DNA und RNA aus den verwendeten Modellviren lieferte. Tabelle 18 zeigt repräsentative Ergebnisse der Versuche.

Tabelle 18: Vergleich der C_T -Werte für Kontrollviren nach Extraktion mit verschiedenen Kits. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2 Messwerten und zwei unabhängigen Versuchen und die Standardabweichung

	PureLink Mini ¹	RTP Pathogene ²	Kombi Kit1 ³	Kombi Kit2 ⁴	Dynabeads ⁵	MinElute ⁶	Ultrasense ⁷
FLU	29,9±0,8	33,2±0,5	36,6±0,9	34,0±0,8	31,6±0,5	30,7±0,5	33,2±0,6
VACV	27,8±0,6	29,6±0,7	34,2±0,7	32,3±0,6	30,4±0,4	27,5±0,3	29,4±0,4

¹Invitrogen PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit; ²Strattec RTP® DNA/RNA Virus Mini Kit; ³Macherey & Nagel NucleoSpin® RNA/DNA; ⁴Macherey & Nagel Triprep; ⁵Invitrogen Dynabeads® SILANE Viral NA Kit, ⁶Qiagen, QIAamp MinElute Virus Spin Kit; ⁷Qiagen UltraSens Virus Kit.

1.1.2 Anreicherung von Mimivirus-Partikeln in NSF

Da nicht bekannt war, mit welchen Mimivirus-Lasten in klinischen Proben des Respirationstraktes zu rechnen ist und von geringen Viruslasten auszugehen war, wurden zusätzlich Anreicherungsverfahren für Viren aus Nasenspülflüssigkeiten verglichen. Hierfür wurden verschiedene Ansätze verfolgt.

1.1.3 Anreicherung der Viruspartikel durch Ultrazentrifugation

Bei diesem Ansatz sollten die in den verschiedenen Volumina von NSF enthaltenen Viruspartikel mittels Ultrazentrifugation sedimentiert und in einem geringen Volumen resuspendiert werden. Es erfolgte eine Standardpräparation mit dem Invitrogen PureLink Kit. Es zeigte sich, dass sich Mimivirus-Partikel nicht reproduzierbar mit der Ultrazentrifugation sedimentieren lassen. Während in einigen Proben die eingesetzten Partikel wiedergefunden werden konnten, wurden in anderen Proben keine der eingesetzten Partikel nachgewiesen. Die Ursache für die schlechte Reproduzierbarkeit der Ultrazentrifugation ist unbekannt. Die verwendeten Protokolle sind jedoch für Orthopockenviren etabliert und funktionieren dort reproduzierbar gut (Daten nicht gezeigt).

1.1.4 Anreicherung der Viruspartikel durch Fällung mit Polymeren

Ein anderer Weg der Anreicherung der Viruspartikel in NSF war die so genannte Fällung mit Polymeren. Dies ist ein Verfahren, welches auf einem Kit der Firma AJ Innuscreen beruht und sich bereits für andere Viren, wie Flaviviren (persönliche Mitteilung Dr. Cristina Domingo-Carrasco, RKI, ZBS 1), als effizient erwiesen hatte. Bei diesem Verfahren werden die in einer Suspension enthaltenen Partikel präzipitiert, wobei die Art der Partikel – Viren, Bakterien, Proteine – keine Rolle spielen soll. Die präzipitierten Partikel werden in kleinem Volumen aufgenommen und in die Nukleinsäureextraktion eingesetzt. Mit nachgestellten NSF, die Mimivirus-Partikel definierter Menge enthielten, wurde das Verfahren mehrfach durchgeführt. Dabei wurde unterschieden, ob es sich um eine NaCl-basierte oder eine PBS-basierte Nasenspülflüssigkeit handelt, weil für andere Viren dieses Verfahren mit PBS-gepufferten Lösungen bereits erfolgreich war.

Hier zeigte sich, dass eine Anreicherung der Mimivirus-Partikel entgegen den Angaben des Herstellers und den Vorerfahrungen in der Arbeitsgruppe mit diesem Verfahren nicht möglich war. Dies gilt sowohl für NaCl- als auch PBS-gepufferte Virus-Suspensionen. Im Gegenteil wurde ein Verlust der DNA mit dem Faktor 5 verzeichnet. Für VACV konnte eine Anreicherung aus PBS-gepufferten Suspensionen beobachtet werden, was die richtige Anwendung des Polymers beweist. Abbildung 5 fasst die Ergebnisse zusammen.

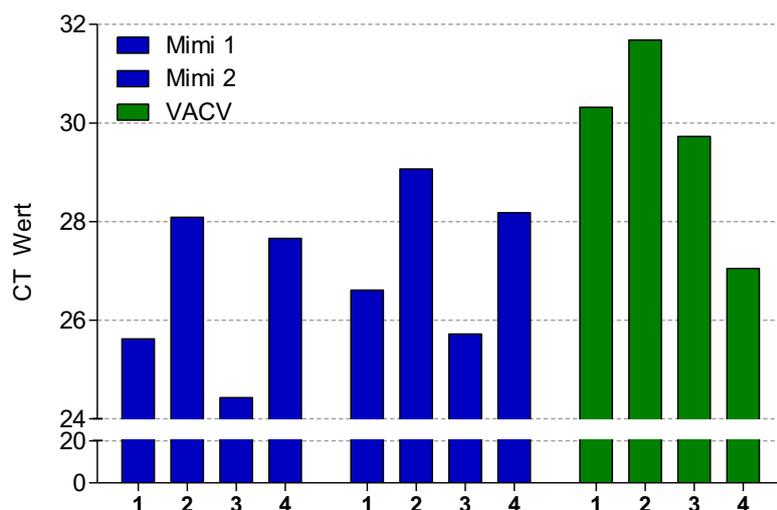


Abbildung 5: Quantitative Bestimmung der Ausbeuten mit und ohne Anreicherung von Mimivirus- und VACV-Partikeln. 1: NaCl-basierte NSF ohne Anreicherung; 2: NaCl-basierte NSF mit Anreicherung; 3: PBS-basierte NSF ohne Anreicherung; 4: PBS-basierte NSF mit Anreicherung.

1.1.5 Erhöhung der Ausbeute durch Mehrfachlyse und Nukleinsäurekonzentrierung bei der Elution

In diesem Ansatz sollte die Konzentration der Virus-Nukleinsäure durch Anreicherung auf der zur Extraktion verwendeten Säule erreicht werden. Dazu wurden die NSF in Aliquots à 200 µL entsprechend dem Standardprotokoll mit dem PureLink Kit lysiert und nacheinander auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Nachdem 1 Aliquot bzw. 3, 5 oder 7 Aliquots à 200 µL an die Säulenmatrix gebunden waren, wurde gewaschen und in 50 µL eluiert. Bei diesem Verfahren zeigte sich mit der Anzahl der Lysate eine deutliche Anreicherung der Mimivirus-Nukleinsäure im Eluat durch niedrigere C_T -Werte in der entsprechenden real-time PCR. Bei 5 verwendeten Lysaten wurde nahezu eine 10-fache Ausbeute erreicht, was auf nicht quantitative Ausbeuten bei einzelnen Elutionsschritten für kleine DNA-Mengen hindeutet.

Da das Volumen der Nasenspülflüssigkeiten nicht immer gleich groß war, jedoch meistens 1 ml Nasenspülflüssigkeit verfügbar war, wurde dieses Verfahren für die Studie gewählt und immer 5 Aliquots à 200 µL für die DNA-Extraktion eingesetzt.

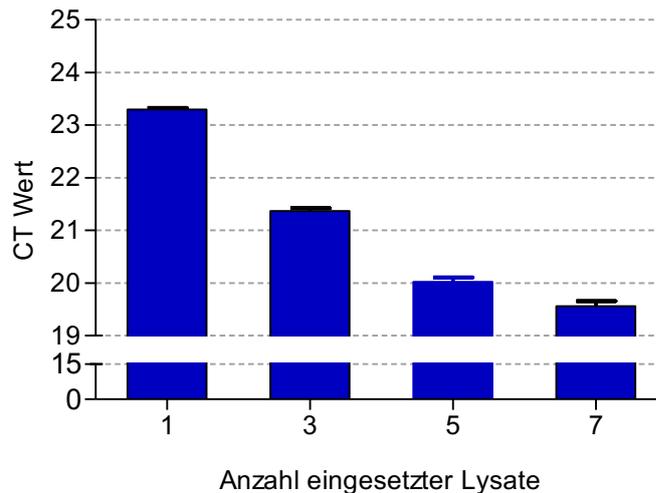


Abbildung 6: Erhöhung der Ausbeute an Mimivirus-DNA durch mehrfaches Auftragen von Lysaten auf die Säule vor der Elution der DNA. Die Abnahme der C_T -Werte mit der Anzahl der eingesetzten Lysate wird deutlich.

1.1.6 Aufbau eines real-time PCR-basierten Screeningtests zum Nachweis von Mimivirus-DNA

Die real-time PCR ist die sensitivste und schnellste Methode zum Nachweis von Virus-Genomen in klinischen Proben [20, 21]. Um die im Rahmen der Studie gewonnenen NSF mit der PCR untersuchen zu können, wurden zwei verschiedene real-time PCR-Systeme, F/R und up/do, im ZBS 1 etabliert. Diese sind so entworfen, dass sie in verschiedenen Bereichen des einzigen bekannten Mimivirus-Genoms lokalisiert sind und durch die parallele Amplifikation von zwei Regionen mögliche Variationen im Genom anderer Mimivirus-Isolate kompensieren sollen (

Tabelle 6). Die Genomsequenzierung belegte, dass diese PCR-Systeme auch das zur Verfügung stehende Virusisolat erkennen müssen. Zur Charakterisierung der Mimivirus-PCR-Systeme wurden Plasmide kloniert, welche die entsprechenden Zielsequenzen der real-time PCR-Systeme enthielten. Diese Plasmide wurden mittels Bestimmung der optischen Dichte quantifiziert und dekadische Verdünnungsreihen angelegt.

Abbildung 7 zeigt je eine Verdünnungsreihe von 10.000 bis 10 Kopien der Mimivirus F/R-PCR und Mimivirus-PCR up/do exemplarisch. Es sind nur Einzelproben gezeigt, um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten. Die Kurven der Mimivirus real-time PCR up/do zeigt höhere Kurven, obwohl die C_T -Werte nahezu identisch mit denen der Mimivirus F/R real-time PCR sind. Diese höheren Kurven bedeuten eine bessere Ausbeute des Fluoreszenzsignals. Dies kann häufig mit der Sonde selbst erklärt werden, d.h. entweder ist

aufgrund der Sequenz und Länge der Sonde das Quenching effizienter oder es ist in der Qualität bezüglich der Kopplung der Fluorophore begründet.

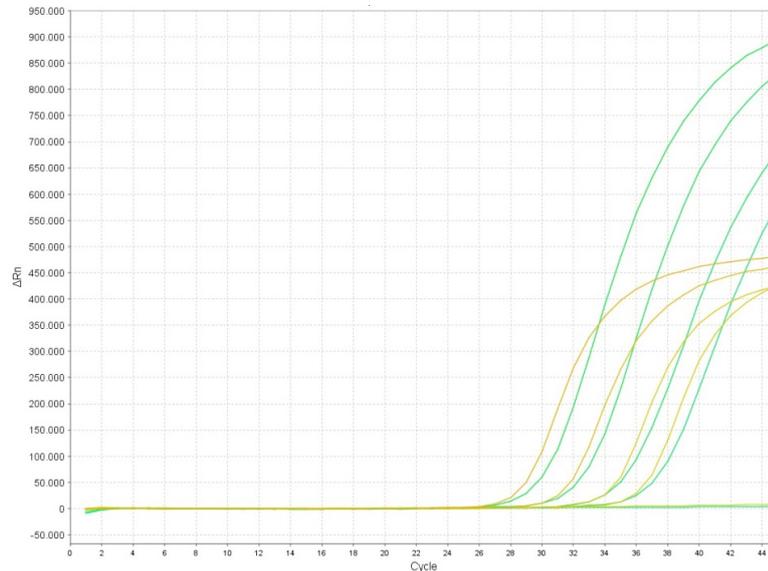


Abbildung 7: Amplifikationskurven der einzelnen Mimivirus real-time PCR-Systeme F/R (braun) und up/do (grün). Trotz unterschiedlicher Intensitäten der Fluoreszenzsignale ist der jeweilige C_T -Wert nahezu identisch.

1.1.6.1 Ermittlung der Sensitivität

Die Ergebnisse dieser Verdünnungsreihen bezüglich der Nachweisgrenzen sind in Abbildung 8 gezeigt. Hier wurden die C_T -Werte der PCR über den Kopiezahlen der eingesetzten Plasmide aufgetragen. Man sieht, dass die Standardgeraden für die Uniplex-PCRs und die Duplex-PCR sehr ähnlich sind. Aus den Standardgeraden kann man die Effizienz der PCR berechnen, d.h. ob ein Zyklus in der PCR nahezu eine Verdopplung der Amplikons ermöglicht. Dazu sollte die Steigung der Standardgerade -3,28 sein. Wie in Tabelle 19 zu erkennen ist, liegen die Effizienzen der PCRs nahe am Idealwert.

Um Probenmaterial und Zeit einzusparen wurden beide real-time PCR-Systeme zu einer Duplex-PCR kombiniert. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen von Mimivirus-DNA konnte gezeigt werden, dass die Kombination beider Systeme zu keinem Verlust in der Nachweisgrenze führte. Abbildung 8 zeigt die resultierenden Standardgeraden.

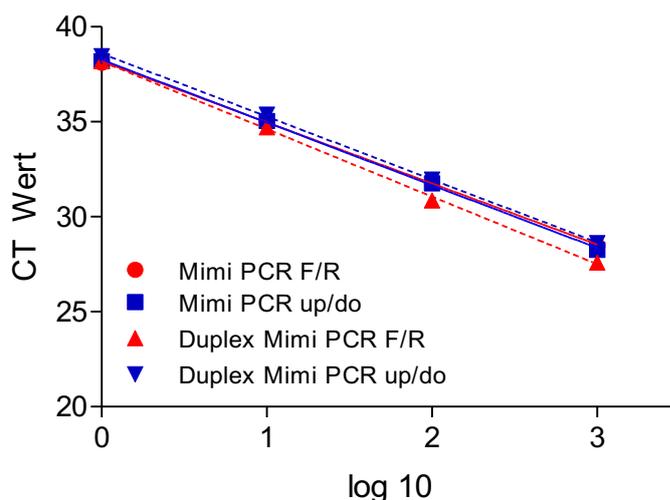


Abbildung 8: Standardgeraden der Uniplex-Mimi-PCRs F/R und up/do sowie die Kombination zur Duplex-Mimivirus-PCR mit jeweils einem der entsprechenden Plasmide für die PCR-Systeme F/R und up/do.

Tabelle 19: Standardgeraden der Uniplex- und Duplex-Mimivirus real-time PCR im Vergleich

	Geradengleichung	Effizienz	Korrelation
Mimi F/R	$C_T = -3,22 \log(\text{Kopie\#}) + 38,2$	104%	0,9997
Mimi up/do	$C_T = -3,30 \log(\text{Kopie\#}) + 38,3$	101%	0,999
Duplex Mimi F/R	$C_T = -3,56 \log(\text{Kopie\#}) + 38,2$	91%	0,997
Duplex Mimi up/do	$C_T = -3,32 \log(\text{Kopie\#}) + 38,6$	100%	0,999

Daher wurde für die Duplex real-time PCR eine Probit-Analyse zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der Duplex real-time PCR durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde Mimivirus-DNA mit beiden PCR-Systemen quantifiziert in absteigenden DNA-Konzentrationen pro Reaktion in 8-fach Proben gemessen.

Mit Hilfe der Probit-Analyse der gemessenen Daten konnte ermittelt werden, dass 14,12 Genomäquivalente eines Mimivirus-Genoms mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% erfasst werden können (Konfidenzintervall 9,3–18,7). Dies ist im Rahmen optimaler real-time PCR-Systeme und verspricht eine hohe Wahrscheinlichkeit Mimivirus-positive Proben auch zu detektieren. Abbildung 9 zeigt die graphische Darstellung der Probit-Analyse.

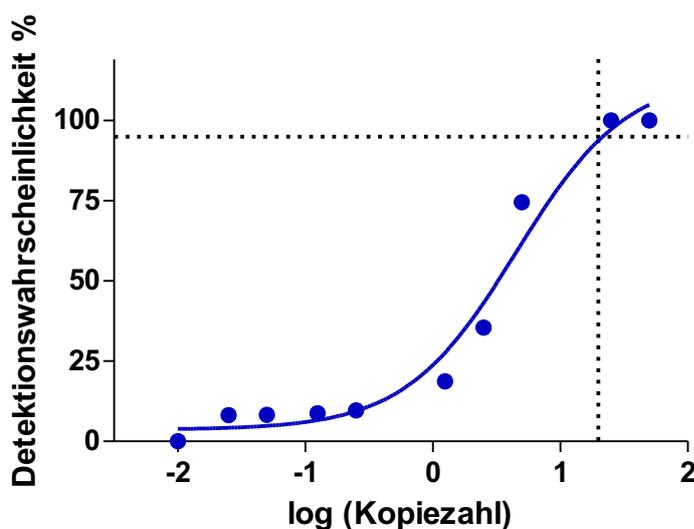


Abbildung 9: Darstellung der Probit-Analyse für die Mimivirus-Duplex real-time PCR. Es werden 14,12 Genomäquivalente mit der Duplex-real-time PCR für Mimivirus mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% pro Reaktion erkannt.

1.1.6.2 Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Duplex-PCR

Um die Reproduzierbarkeit der Duplex-PCR zu bestimmen wurde Mimivirus-DNA anhand von Plasmidverdünnungsreihen quantifiziert und so eingestellt, dass Konzentrationen von 1000, 100 und 10 Mimivirus-Genomen pro Reaktion erreicht wurden. Diese wurden zur Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität an drei aufeinanderfolgenden Tagen in Triplikaten gemessen, wobei zur Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität nur 10 Genomäquivalente pro Reaktion an einem der Tage in 8-fach Proben gemessen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 gezeigt.

Tabelle 20: Reproduzierbarkeit der Mimivirus-Duplex real-time PCR

Kopienzahl	1000	100	10
Intra-Assay (n=8)	nb	nb	36,91 ± 0,41
Inter-Assay (n=3)	30,02 ± 0,07	33,49 ± 0,24	37,18 ± 0,39

nb= nicht bestimmt

Diese Daten zeigen, dass die Mimivirus-Duplex-PCR sehr sensitiv und reproduzierbar Mimivirus-DNA aus klinischen Proben detektieren kann.

1.1.6.3 Nachweis der Spezifität

Obwohl beide PCR-Systeme im Rahmen des Designs theoretisch so entworfen wurden, dass sie spezifisch für Mimivirus-DNA sein sollten [62], wurde deren Spezifität praktisch evaluiert. Dazu wurde DNA bzw. in cDNA umgeschriebene RNA verschiedener für eine mögliche Differentialdiagnostik relevanter verfügbarer Viren aus der Virussammlung der Arbeitsgruppe verwendet und als Template in die einzelnen Mimivirus real-time PCR-Assays eingesetzt. Tabelle 21 zeigt, dass die Mimivirus real-time PCRs hoch spezifisch für Mimivirus sind und weder das Genom anderer Erreger noch humane DNA erkennt. DNA von *Acanthamoeba*, in denen Mimivirus angezüchtet wird, zeigte ebenfalls keine Signale. Ein C_T -Wert von 45 bedeutet keine spezifischen Signale bis zum Zyklus 45 und wird als negativ interpretiert. Die Kombination zur Duplex-PCR kann nach theoretischen Betrachtungen keine anderen Ergebnisse der Spezifität liefern.

Tabelle 21: Nachweis der Spezifität der Mimivirus-Duplex real-time PCR

Erreger	C_T-Wert Mimivirus-PCR F/R	C_T-Wert Mimivirus-PCR up/do
Influenza Virus A H1N1 sw	45	45
Influenza Virus A H3N2	45	45
Influenza Virus B Victoria	45	45
Influenza Virus B Yamagata	45	45
Influenza Virus A H5N1	45	45
Parainfluenzavirus Typ 2	45	45
Coxsackie Virus	45	45
Adenovirus 2	45	45
Adenovirus 3	45	45
Adenovirus 4	45	45
Coronavirus 229E	45	45
Respiratorisches Synzytialvirus A	45	45
Respiratorisches Synzytialvirus B	45	45
Rhinovirus 1B	45	45
Rhinovirus 37	45	45
Rhinovirus 89	45	45
Humanes Bocavirus	45	45
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	45	45
Humane DNA	45	45

1.1.7 Konventionelle PCR zur Sequenzanalyse

Da die Amplikons der beiden real-time PCR-Systeme sehr kurz sind um eine hohe Sensitivität zu gewährleisten, eignen sie sich nicht für die Sequenzanalyse mittels Sanger-Sequenzierung. Bei der Sanger-Sequenzierung werden in der Regel die ersten 30 Basen in 3'-Richtung nach dem Sequenzierprimer nicht lesbar sequenziert. Dies bedeutet, dass ein Amplikon von 80–90 Basen keine eindeutigen Sequenzinformationen liefern kann. Daher wurde eine PCR etabliert, die ein 604 bp großes Amplikon erzeugte (Abbildung 10) und, wie an der Positivkontrolle gezeigt, eine eindeutige Sequenz für Mimivirus beim Vergleich mit der Genbank zeigte.

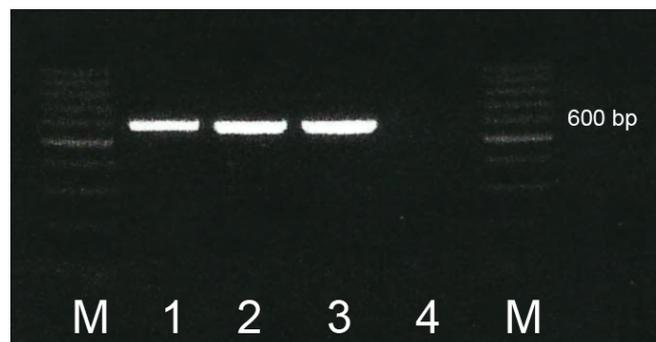


Abbildung 10: Agarose-Gelelektrophorese (1,5%) der Produkte der konventionellen Mimivirus-PCR. M: 100 bp Leiter; 1: DNA aus Mimivirus-Anzucht 1; 2: DNA aus Mimivirus-Anzucht 2; Mimivirus Kontroll-DNA (zu Beginn zur Verfügung gestellt von Didier Raoult), 4: Negativkontrolle. Eine distinkte Bande in der erwarteten Höhe von ~600 bp ist deutlich erkennbar.

Die erhaltenen PCR-Produkte können mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung sequenziert werden. Ein Vergleich mit der Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, NCBI-BLAST), zeigt, dass es sich eindeutig um Mimivirus handelt. Abbildung 11 zeigt ein Ergebnis der BLAST-Suche.

```

> gb|HQ336222.2| D Acanthamoeba polyphaga mimivirus, complete genome
Length=1181549

Features in this part of subject sequence:
  hypothetical_protein

Score = 1026 bits (555), Expect = 0.0
Identities = 555/555 (100%), Gaps = 0/555 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      TTTGATGGTTTTTAAGGAAATTAGTTTATCGGAATTATTGTGAGACAATCCAATATTGAA 60
            |||
Sbjct 511681  TTTGATGGTTTTTAAGGAAATTAGTTTATCGGAATTATTGTGAGACAATCCAATATTGAA 511740

Query 61     TAATTCGACATTAACGTATTGTAATTATTTTGATGCAaataaaaataaaaaataaaaaa 120
            |||
Sbjct 511741  TAATTCGACATTAACGTATTGTAATTATTTTGATGCAAAATAAAATAATAAAATAAAAA 511800

Query 121    cgaaaaaaaataatCTATTTCTATTATTTCAGTGGTATTGTTGTGTGTAATTTATTCAT 180
            |||
Sbjct 511801  CGAAAAAATAATCTATTTCTATTATTTCAGTGGTATTGTTGTGTGTAATTTATTCAT 511860

Query 181    CAACATAAAATCGTTTCTGAGATAGAAAATATTTTCGTAATTGTTGTAAATAGATAGTAG 240
            |||
Sbjct 511861  CAACATAAAATCGTTTCTGAGATAGAAAATATTTTCGTAATTGTTGTAAATAGATAGTAG 511920

Query 241    AAAATCTCCTTGATATAAATCTGAGAGATCCAAAATGTGTTTGTGGGTAAATTTATTCAG 300
            |||
Sbjct 511921  AAAATCTCCTTGATATAAATCTGAGAGATCCAAAATGTGTTTGTGGGTAAATTTATTCAG 511980

Query 301    GATtgTTTTaaaagatTTTgtattcaattTgtatacaccattatTTTtgatatgtattt 360
            |||
Sbjct 511981  GATTGTTTTAAAAGATTTGTATTCAATTTGTATACACCAATTATTTTGTATGTATTT 512040

Query 361    tgtttttgaaattctatttGTAGTTGTGATGGTTTGTCTAATTCGAAAGGATTAGATTC 420
            |||
Sbjct 512041  TGTTTTTGAAATTCATTTGTAGTTGTGATGGTTTGTCTAATTCGAAAGGATTAGATTC 512100

Query 421    AATATAATCAGTCAATGATTCATTTAAACTTTTTGAAGACATATCAGATAAATCATTTGA 480
            |||
Sbjct 512101  AATATAATCAGTCAATGATTCATTTAAACTTTTTGAAGACATATCAGATAAATCATTTGA 512160

Query 481    CGATGTTTTCCGGATGAATCATCAGATGTATTTATAGAGCTACTTGTGATGAAATATC 540
            |||
Sbjct 512161  CGATGTTTTCCGGATGAATCATCAGATGTATTTATAGAGCTACTTGTGATGAAATATC 512220

Query 541    AATACTGCTCGAATA 555
            |||
Sbjct 512221  AATACTGCTCGAATA 512235

```

Abbildung 11: Ergebnisse der BLAST-Suche mit der aus der Sequenzierung der durch konventionelle PCR erhaltenen Sequenz. Mit diesem Verfahren kann bei ausreichender Viruslast verlässlich die Verwendung bzw. Detektion von Mimivirus-DNA bestätigt werden.

Im Vergleich mit den beiden etablierten real-time PCR-Assays zeigt diese PCR aufgrund der größeren Länge des Amplifikats eine wesentlich geringere Nachweisgrenze. So konnten Verdünnungsreihen von Mimivirus-DNA nur bis zu einer DNA-Konzentration von ca. 1.000 Kopien pro Reaktion (C_T -Wert <30) nachgewiesen werden.

1.1.8 Nachweis von Amöben-DNA mittels real-time PCR

Um neben der Anwesenheit von Mimivirus-DNA auch das Genom der Amöben nachweisen zu können, welche vermutlich für eine Infektion des Menschen mit Mimivirus verantwortlich sind, denn Mimiviren wurden noch nie außerhalb von Acanthamöben entdeckt, wurde eine real-time PCR aus der Literatur verwendet [60].

1.1.9 Ablauf der PCR-Diagnostik für Mimivirus

Die Untersuchungen von respiratorischem Material mittels PCR erfolgten nach dem folgendem Schema (Abbildung 12). Zur Bewertung der erfolgreichen DNA-Extraktion wurde eine c-myc-PCR durchgeführt, die humane genomische DNA detektiert. Zur ersten

Untersuchung auf Mimivirus wurde die Duplex real-time eingesetzt, da mit dieser PCR zwei unabhängige Genregionen des Mimivirus-Genoms mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden konnten. In der Duplex-PCR negative Proben wurden als negativ bewertet. Positive Proben wurden einzeln in den Uniplex-PCRs up/do und F/R getrennt untersucht. Eine Probe, die in beiden Uniplex-PCRs positiv blieb, wurde als PCR-positiv bewertet. Unklare Ergebnisse wurden wiederholt. Die konventionelle PCR wurde für bestätigte positive Proben verwendet, um nach Möglichkeit Sequenzinformationen generieren zu können. Um neben der Anwesenheit von Mimivirus-DNA auch das Genom der Amöben nachweisen zu können, wurde eine real-time PCR aus der Literatur verwendet.

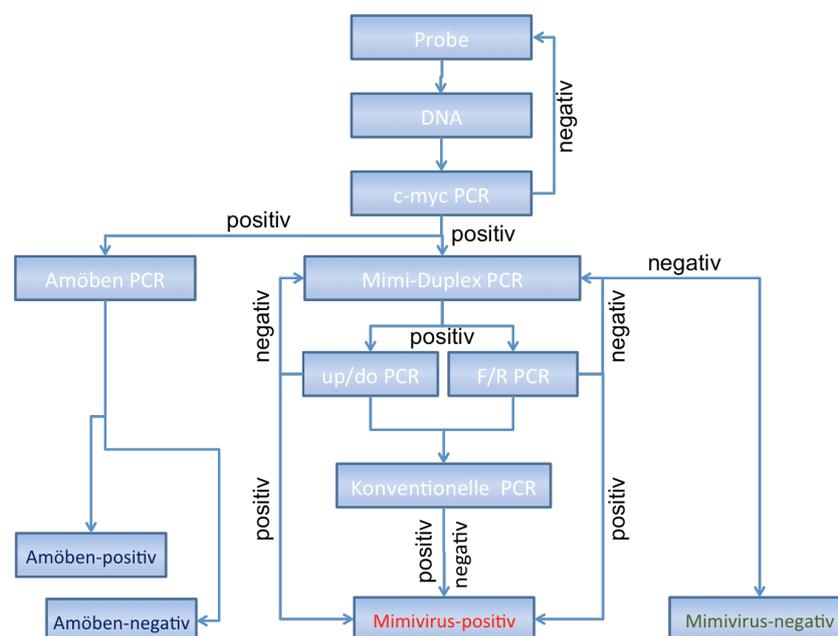


Abbildung 12: Etabliertes Ablaufschema für die PCR-Diagnostik von Mimivirus-Infektionen.

1.2 Etablierung eines Verfahrens für die Serodiagnostik von Mimivirus

1.2.1 Herstellung der Positivkontrolle für die Serodiagnostik

Um ein Serum zu erhalten, welches Antikörper gegen Mimivirus enthält, wurden in Amöben vermehrte, hoch gereinigte Mimivirus-Partikel für die Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Dieses Serum enthielt Antikörper gegen Mimivirus, wie mit elektronenmikroskopischen Verfahren gezeigt werden konnte, und wurde als Positivkontrolle verwendet (Abbildung 13).

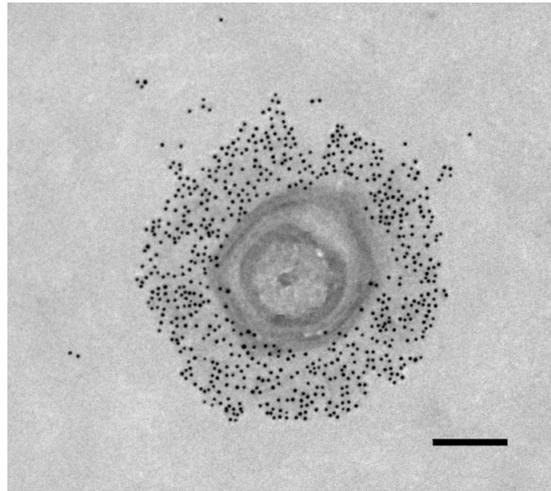


Abbildung 13: Nachweis der Bindung von Antikörpern des polyklonalen Kaninchenserums an Mimivirus-Partikel mittels Immun-EM. Die mit Gold markierten Sekundärantikörper sind Kaninchen-spezifisch. Die Kaninchen-Antikörper erkennen vorwiegend die fibrillären Strukturen auf den Mimivirus-Partikeln (Lars Möller, RKI).

Zum Nachweis von anti-Mimivirus-Antikörpern musste ein diagnostisches Verfahren entwickelt werden, welches eine eindeutige Erkennung von Seren ermöglicht, die Antikörper gegen Mimivirus enthalten. Während ein ELISA für den Hochdurchsatz gut geeignet ist, erlaubt der Immunfluoreszenztest die visuelle Beurteilung und damit eine genaue Interpretation von fraglich positiven Seren. Beim Immunfluoreszenztest werden in der Regel suszeptible Zellen mit dem relevanten Virus infiziert und fixiert. Durch aufeinanderfolgende Inkubation mit der zu untersuchenden Serumprobe und einem humanspezifischen Fluoreszein-markierten Sekundärantikörper werden infizierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Damit ist eine Beurteilung der einzelnen infizierten Zellen und der charakteristischen Signale möglich. Mit entsprechender Erfahrung können so falsch positive, d.h. unspezifisch reagierende Serumproben erkannt werden.

Da der Nachweis von anti-Mimivirus-Antikörpern bislang kein Routineverfahren ist und weltweit wenige Erfahrungen darin existieren, wurde aufbauend auf Standardverfahren ein Immunfluoreszenztest etabliert.

1.2.2 Auswahl der Zellen

Mimiviren vermehren sich in Acanthamoeben. Da es sich dabei um eine komplizierte schlecht reproduzierbare Prozedur handelt (infizierte Amöben werden zu nicht infizierten Amöben zugefüttert) und davon auszugehen ist, dass ein gewisser Anteil der untersuchten Patienten Antikörper gegen Amöben besitzt, wurden in der Arbeitsgruppe bereits zuvor humane Zelllinien gesucht, in denen Mimivirus vermehrt werden kann. Es wurden Standardzelllinien für die Anzucht von Viren verwendet, wie Vero-Zellen (Nierenzellen des African Green Monkey), HEp2-Zellen (humane Epithelzellen eines Larynx-Karzinoms), WI-38-Zellen

(humane Lungenfibroblasten), aber auch RAW264.7 (Makrophagen der Maus). Keine der untersuchten Zelllinien zeigte einen zytopathischen Effekt oder eine Zunahme mimiviraler DNA, wenn die Zellen mit gereinigten Viren inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Damit war die Etablierung eines klassischen Immunfluoreszenztests, der auf infizierten Zellen beruht, nicht möglich. Für Mimiviren ist in der Literatur das Beschichten von Glasobjektträgern mit gereinigten Mimivirus-Partikeln beschrieben, was jedoch zu schwer interpretierbaren Ergebnissen führte, da positive Signale nicht eindeutig vom Hintergrund zu unterscheiden sind.

Daher wurden andere Wege gesucht, einen reproduzierbaren und spezifischen Test für den Nachweis von anti-Mimivirus-Antikörpern aufzubauen.

Alternativ zur Infektion von humanen Zellen wurde versucht Zellen als Untergrund für Mimivirus-Partikel zu verwenden, an welche die Viruspartikel adhären können. Dazu wurden verschiedene humane Zelllinien mit gereinigten Mimivirus-Partikeln über Nacht inkubiert und am nächsten Tag mit Aceton fixiert. Es konnte gezeigt werden, dass auf humanen Lungenfibroblasten WI-38 die Mimivirus-Partikel gleichmäßig adhärten und bei einem standardisierten Verhältnis der Anzahl der Virus-Partikel zur Zellanzahl in einer reproduzierbaren Anzahl auf den WI-38-Zellen fixiert werden konnten. Mit Hilfe des Kontrollserums aus Kaninchen und eines anti-Kaninchen-Fluoreszein-markierten Sekundärantikörpers war es möglich, die einzelnen fixierten Viruspartikel zu detektieren. Abbildung 14 zeigt eine mit Hilfe dieser Technik entstandene mikroskopische Aufnahme.

Für diese Arbeit wurden zur Bestimmung der Seroprävalenz daher mit Mimivirus beschichtete WI-38-Zellen verwendet sowie als Kontrolle WI-38-Zellen, die nicht mit Mimivirus beschichtet waren.

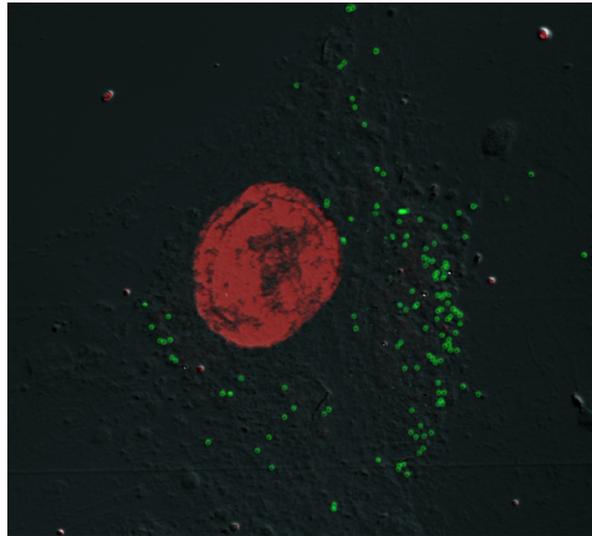


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung einer mit gereinigten Mimivirus-Partikeln „beschichteten“ WI-38-Zelle. Der verwendete Primärantikörper ist ein polyklonales Kaninchenserum, welches durch Immunisierung eines Kaninchens mit UV-inaktivierten Mimiviren hergestellt wurde (Dr. Kiderlen, RKI) und hier im Vergleich zur Kernfärbung mit DAPI ein grünes Signal liefert.

1.2.3 Bestätigung IFA-reaktiver Seren durch Western Blot

Die Verwendung infizierter und nicht infizierter Amöben zur Bestätigung reaktiver Seren war nicht möglich, da durch die erwartete hohe Seroprävalenz von Acanthamöben in der Bevölkerung nahezu jedes im Rahmen der Etablierung getestete Serum reaktiv gegen nicht infizierte Amöben und die Differenzierung von Mimivirus-infizierten Amöben nur schwer objektivierbar war (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde ein Western Blot-Verfahren etabliert, welches die Positivität von Seren bestätigen kann, die in der IFA auf WI-38-Zellen reaktiv waren. Dazu wurden nebeneinander auf einem Polyacrylamidgel Mimivirus-Lysate und nicht infizierte Acanthamöben-Lysate nebeneinander aufgetragen und nach dem Blotten mit dem Serum eines mit Mimivirus immunisierten Kaninchens inkubiert. Abbildung 15 zeigt exemplarisch einen Western Blot und die Interpretation der erhaltenen Bandenmuster für die Positivkontrolle (Kaninchenserum).

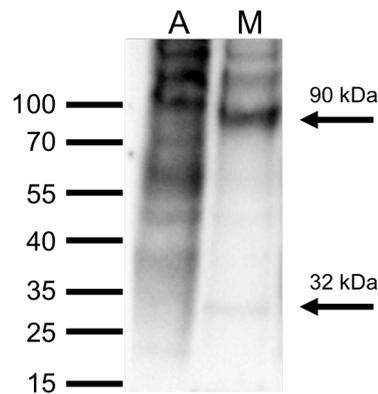


Abbildung 15: Etablierung einer Western Blot-Analyse zur Bestätigung der Sero-Reaktivität gegen Mimivirus. Da zu Beginn der Studie keine humanen Seren mit anti-Mimivirus-Antikörpern vorlagen, wurde ein Kaninchen mit aufgereinigten Mimivirus-Partikeln immunisiert und das Kaninchenserum zur Etablierung des Western Blots verwendet. A: Acanthamöben-Lysat, M: Mimivirus-Lysat. Für die Identifizierung von anti-Mimivirus-Antikörpern wurden zwei Banden bei ca. 32 kDa und 90 kDa als geeignet angesehen.

Nicht Mimivirus-infizierte Acanthamöben zeigten mit dem Kaninchenserum eine Reihe von Banden. Im Proteinlysat von aufgereinigten Mimivirus-Partikeln waren zwei offensichtlich spezifische Banden bei ca. 32 kDa und 90 kDa erkennbar, die in nicht infizierten Acanthamöben nicht erkennbar waren.

Nachdem im Rahmen der Untersuchung von Blutspendern IFA-positive Seren identifiziert werden konnten, wurde der Western Blot an humane Seren angepasst. Es zeigte sich, dass eine Serumverdünnung von 1:100 bis 1:250 mit anti-human HRP-markierten Sekundärantikörpern in Verdünnungen von 1:5.000 die besten Ergebnisse lieferte. Das Prinzip der parallelen Untersuchung von nicht infizierten Acanthamöben und aufgereinigten Mimivirus-Partikeln wurde beibehalten.

1.2.4 Ablauf der Serodiagnostik für Mimivirus

Da es für die Serodiagnostik von Mimivirus-Infektionen keine standardisierten Verfahren gibt, wurde zur Absicherung der Ergebnisse das folgende Schema etabliert (Abbildung 16). Dieses Schema erlaubt neben der Bestätigung einer IFA-reaktiven Serumprobe für Mimivirus darüber hinaus eine Aussage über die mögliche Reaktivität der Probe mit Acanthamöben, was auf einen Kontakt mit diesem Pathogen hinweisen würde.

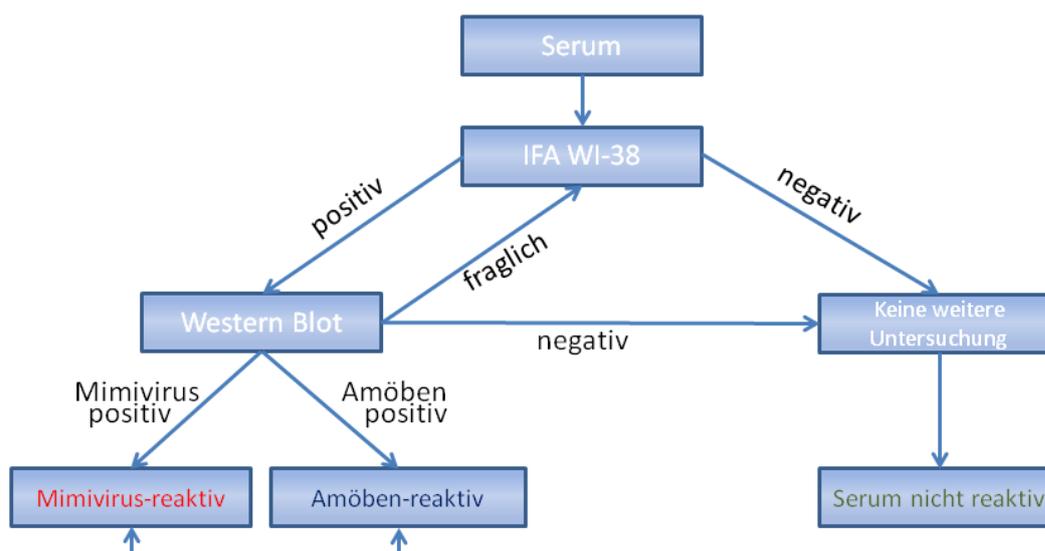


Abbildung 16: Etabliertes Ablaufschema für die Serodiagnostik von Mimivirus-Infektionen

2 Studien zur Prävalenz von Mimivirus

Das für die Serodiagnostik von Mimivirus etablierte Verfahren wurde nun eingesetzt um in verschiedenen Patientenkollektiven die Prävalenz von anti-Mimivirus-Antikörpern zu ermitteln. Zu diesen Patientenkollektiven zählten

1. Blutspender aus dem Raum Berlin
2. Patienten mit Verdacht auf Pneumonie oder anderer unerklärter respiratorischer Symptomatik
3. Immunsupprimierte Kinder im Verlauf einer Stammzelltransplantation

Als Kontrollgruppe dienten Blutspender, die als potentiell gesunde Gruppe betrachtet werden und die Seroprävalenz in der allgemeinen Bevölkerung widerspiegeln sollten. Die Mimivirus-Seroprävalenz in der gesunden Bevölkerung in Deutschland ist nicht bekannt. Dementsprechend sollte diese Untersuchungsgruppe die Bestimmung der Mimivirus-Seroprävalenz in der gesunden deutschen Bevölkerung ermöglichen.

In der Literatur ist beschrieben, dass Patienten mit Pneumonien eine erhöhte Wahrscheinlichkeit besitzen seropositiv für Mimivirus zu sein [10]. Die Patientengruppe mit der Diagnose Pneumonie bzw. respiratorischer Infektionen unklarer Ätiologie sollte daher zur Klärung der Frage dienen, ob in deutschen Risikopatienten Mimivirus-Infektionen nachweisbar sind.

Als dritte und nicht nur für Deutschland neue Untersuchungsgruppe wurden immunsupprimierte Kinder beprobt und gemessen.

Es ist bekannt, dass im Verlauf einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation Infektionskomplikationen bakterieller oder viraler Genese, Pilzinfektionen und darüber hinaus opportunistische Keime (*Toxoplasma*, *Legionella*) eine große Relevanz für den Heilungsverlauf der Betroffenen haben. Bei immunkompetenten Personen findet man diese Art von Komplikationen normalerweise eher selten. Daher wurden Kinder vor und im Verlauf der Therapie auf Mimivirus untersucht. Während die Serumproben von Patienten mit respiratorischen Symptomen und von Blutspendern bereits im Institut vorlagen, mussten die Proben der immunsupprimierten Kinder im Verlauf gesammelt werden. Dazu wurden Aufklärungsbögen erstellt und neben den Serumproben auch Nasenspülflüssigkeit für den Genomnachweis gesammelt. Die Sammlung der Proben erfolgte nach Möglichkeit an den Tagen 0 (vor Transplantation), 30, 90–100 und 200. Insgesamt konnten 109 Proben von 24 Patienten erhalten werden.

2.1 Untersuchung von Blutspendern

Insgesamt wurden 350 Serumproben von Blutspendern aus der Blutbank der Charité Berlin untersucht. Diese wurden jeweils in Verdünnungen von 1:80 und 1:320 nach dem oben beschriebenen Verfahren im IFA getestet. Unter Berücksichtigung der Spezifität des Fluoreszenzsignals im Vergleich zum Kontrollserum und zu nicht mit Mimiviren beschichteten WI-38-Zellen wurde ein Titer von $\geq 1:320$ als verlässlich reaktiv betrachtet. Da Blutspender grundsätzlich als gesunde Kontrollgruppe betrachtet werden und im Normalfall eine Spende nicht zugelassen ist, wenn der Spender klinische Symptome einer Infektion aufweist, ist hier auf den Nachweis von IgM-Antikörpern verzichtet worden. Die Wahrscheinlichkeit eine akute asymptomatische Infektion bei 350 Personen zu erfassen ist als sehr gering anzusehen und würde keinen wesentlichen Beitrag zur Aussage der Seroprävalenz bei Gesunden erlauben.

Von den insgesamt 350 getesteten Blutspendern waren 8 Personen (2,3%) IgG-reaktiv gegen Mimivirus mit Titern von $\geq 1:320$.

Abbildung 17 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der Negativkontrolle (A: nicht Mimivirus-beschichtete WI-38-Zellen), das Serum eines nicht reaktiven Patienten (B) sowie zwei reaktive Patienten bei Serumverdünnungen von 1:320 (C, D).

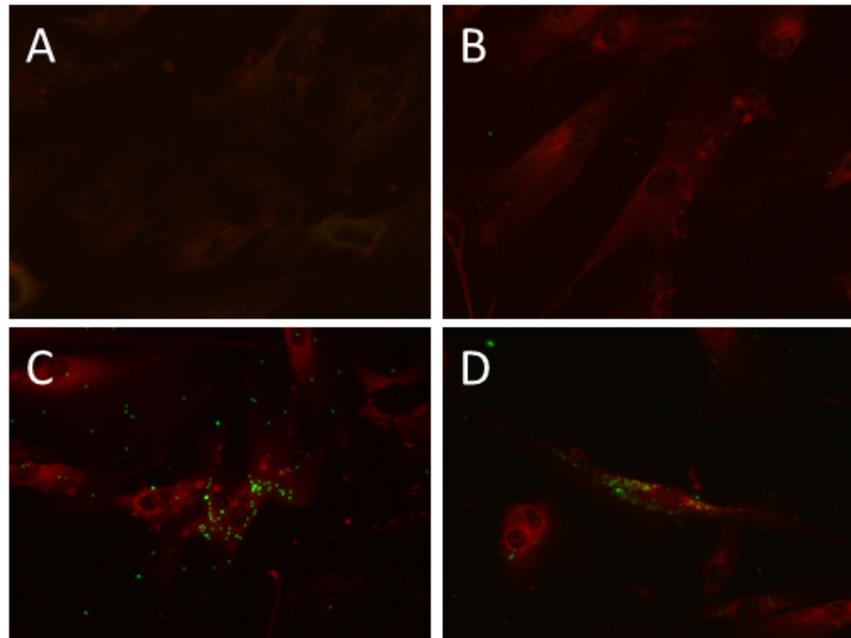


Abbildung 17: Immunfluoreszenzaufnahmen von A: nicht mit Mimivirus beschichteten WI-38-Zellen als Kontrolle, B: einem nicht-reaktiven Serum, C, D: reaktiven Seren bei Serumverdünnungen von 1:320

Diese 8 IFA-reaktiven Seren wurden auf eine mögliche Amöben- sowie Mimivirus-Reaktivität im Western Blot untersucht, wobei 5/8 (62,5%) als seropositiv bestätigt werden konnten. Abbildung 18 zeigt exemplarisch eine Auswahl von Western Blot-Ergebnissen für eine nicht reaktive und zwei reaktive Proben.

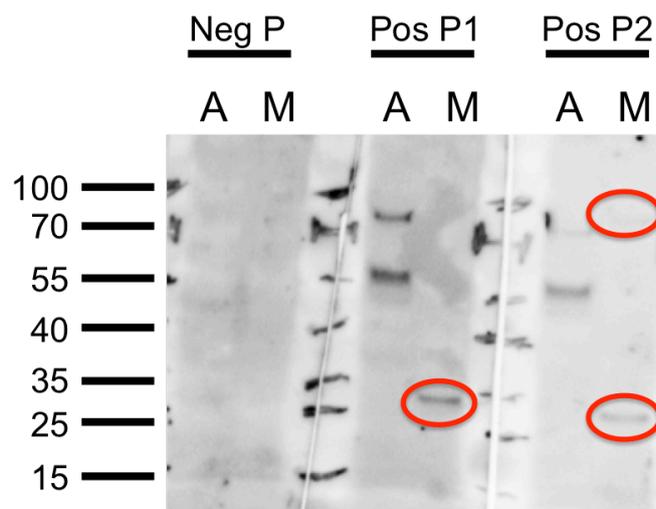


Abbildung 18: Serologischer Nachweis von anti-Mimivirus-Antikörpern mit dem Western Blot. Auswahl von Ergebnissen untersuchter Blutspender. A: Acanthamöben-Lysat, M: Mimivirus-Lysat. Neg P: im IFA nicht-reaktiver Patient, Pos P1: IFA-reaktiver Patient 7-20, Pos P2: IFA-reaktiver Patient 3-35.

Exemplarisch gezeigt ist eine der 342 Proben von Blutspendern, die nicht reaktiv im IFA waren. Weder mit dem Proteinlysate von nicht Mimivirus-infizierten Acanthamoeben noch mit aufgereinigten Mimiviren sind Banden sichtbar. Bei den zwei gezeigten IFA-reaktiven Proben ist zu erkennen, dass die Mimivirus-spezifische Bande im Bereich 32 kDa prominenter zu sein scheint als die Bande im Bereich 90 kDa, die mit dem Kaninchenserum sehr deutlich erkennbar war. Des Weiteren fällt auf, dass alle Seren, die im Western Blot reagierten, auch mit Acanthamoeben-Proteinen eine Reaktion zeigten.

Tabelle 22 fasst die Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Blutspender zusammen.

Tabelle 22: Ergebnisse der serologischen Untersuchung von Blutspendern auf Mimivirus-spezifische Antikörper

IFA		Western Blot		Bestätigt positiv
Mimivirus nicht-reaktiv	Mimivirus-reaktiv	Mimivirus reaktiv	Acanthamoeben reaktiv	
342 (97,7%)	8/350 (2,3%)			
	3-34	+++	++	Ja
	3-35	+	++	Ja
	7-20	+++	++	Ja
	7-40	+++	+	Ja
	8-5	+	+++	Ja
	19-22	+/-	-	Nein
	19-25	+/-	-	Nein
	20-40	-	-	Nein

+: reaktiv , ++: stark reaktiv , +++: sehr stark reaktiv , +/-: fraglich , -: nicht reaktiv

2.2 Untersuchung von Patienten mit Verdacht auf Pneumonie oder mit anderer unerklärter respiratorischer Symptomatik

In dieser Gruppe konnten insgesamt 46 Patienten untersucht werden. In der ersten Gruppe waren Seren von 25 Patienten mit Verdacht auf eine Pneumonie verfügbar. In der zweiten Gruppe war neben Serum auch jeweils ein korrespondierendes Trachealsekret vorhanden, so dass diese Proben in der PCR untersucht werden konnten. In der dritten Gruppe befanden sich 6 pädiatrische Patienten mit den klinischen Symptomen eines respiratorischen Infektes, von denen sowohl Serum als auch Nasenspülflüssigkeit bzw. Rachenspülwasser vorlagen. Die Serologie wurde analog zur Untersuchung der Blutspender jedoch mit Serumverdünnungen von 1:20, 1:80, 1:320, 1:640 und 1:1280 durchgeführt. Für das PCR-Screening wurde die

Mimivirus-Duplex-PCR eingesetzt und die erfolgreiche DNA-Extraktion mittels der c-myc-PCR nachgewiesen.

Keine der drei im IFA-IgG reaktiven Proben konnte im Western Blot bestätigt werden, wobei Proteine von Acanthamoeben detektiert werden konnten, was auf einen Kontakt mit Amöben hinweist. Da der Western Blot weniger sensitiv ist als der IFA, kann hier die Seropositivität nicht ausgeschlossen werden. Jedoch ließ sich in keiner der korrespondierenden respiratorischen Proben Mimivirus- oder Acanthamoeben-DNA nachweisen, was zumindest die Richtigkeit der IgM-Reaktivität in Frage stellt. Tabelle 23 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Tabelle 23: Ergebnisse für Patienten mit Pneumonie oder anderen respiratorischen Symptomen

	IgG	IgM	PCR
Gruppe 1	1/25 (4%)	3/25 (12%)	n.d.
Gruppe 2	2/15 (13%)	5/15 (33%)	0/15
Gruppe 3	0/6	0/6	0/6

n.d.: nicht durchgeführt. Alle Proben waren in der c-myc-PCR positiv mit C_T -Werten <32 .

Die als seropositiv bewerteten Patienten wiesen abgesehen von der Diagnose einer respiratorischen Erkrankung (2x Pneumonie, 1x nicht näher definierte Atemwegserkrankung) keinerlei bemerkenswerte Gemeinsamkeiten bezüglich der Differentialdiagnose, des Alters oder bekannter Grunderkrankungen auf.

2.3 Untersuchung von Patienten unter Immunsuppression

Insgesamt konnten 18 Kinder im Alter von 1 bis 18 Jahren in die Studie eingeschlossen werden. Die Nasopharyngealsekrete und Seren wurden im Verlauf der Transplantation an vorher festgelegten Tagen gewonnen. Idealerweise umfasste das Probenmaterial zu jedem Zeitpunkt Nasopharyngealsekrete für die PCR und vor und zu einem späten Zeitpunkt nach der Transplantation eine Serumprobe, um zu untersuchen, ob die Immunsuppression eine Serokonversion bezüglich einer Mimivirus-Infektion begünstigt. Bei zwölf der untersuchten Patienten ist jeweils ein Nasopharyngealsekret mit korrespondierendem Serum untersucht worden. Bei den verbleibenden sechs von insgesamt 18 immunsupprimierten Patienten konnte jeweils nur ein Nasopharyngealsekret ohne ein adäquates Blutserum vor der Transplantation getestet werden. Tabelle 24 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen zusammen.

Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung der immunsupprimierten Patienten (KMT)

Patient#	Material	Alter	w/m	Prä TX	d30	d60	d100	d200
KMT01	NSF	18	m	x	+			x
KMT01	Serum			x				x
KMT02	NSF	7	m	+	x	x	x	x
KMT02	Serum			+/(+*)				x
KMT03	NSF	10	m	(+)	x			x/x
KMT03	Serum			x				x
KMT04	NSF	5	w	x	x	x		x
KMT04	Serum			x				x
KMT05	NSF	3	m	x	x		x	
KMT05	Serum			x			x	
KMT06	NSF	12	w	x	x	x	x	x
KMT06	Serum			x				x
KMT07	NSF	4	m	x	x		x	x/x
KMT07	Serum			x				x
KMT08	NSF	12	m	x	x			x
KMT08	Serum			x				x
KMT09	NSF	7	w	x			+	
KMT09	Serum			x			x	
KMT10	NSF	15	m	x			x	x
KMT10	Serum			x				x
KMT11	NSF	17	m	x		x	x	x
KMT11	Serum			x			x	
KMT12	NSF	17	w	x		x		x
KMT12	Serum			x				+/+*
KMT13	NSF	1	m	x				x
KMT13	Serum							x
KMT14	NSF	12	w	x	x		x	x/x
KMT14	Serum							x
KMT15	NSF	14	m	x	x	x	x	x
KMT15	Serum							x
KMT16	NSF	15	m	(+)	x	x		x
KMT16	Serum							+
KMT17	NSF	8	m	(+)	x	x		x
KMT17	Serum							x
KMT18	NSF	12	w	x		x	x	x
KMT18	Serum							x

NSF: Nasenspülflüssigkeit, m: männlich, w: weiblich, x: Proben genommen, +: Probe positiv bewertet, (+) Probe fraglich positiv bewertet, +*: IgM positiv. Positive Proben sind zur besseren Erkennung grau hinterlegt.

Von den 68 untersuchten Proben aus 18 Patienten waren 3 Proben entsprechend dem in Abbildung 12 gezeigten Algorithmus PCR-positiv für Mimivirus-DNA. Diese Proben stammten von dem Patienten KMT01 zum Zeitpunkt Tag 30 nach der Transplantation sowie von Patient KMT02 zum Zeitpunkt vor der Transplantation und von Patientin KMT09 100 Tage nach Transplantation. Keine der Proben war in der konventionellen PCR positiv, was sich durch die erhaltenen C_T-Werte von >33 erklären lässt (und deshalb nicht in die

Bewertung einfließt). Ein Screening auf respiratorische Erreger mit dem RespiFinder der Firma PathoNostics gab Hinweise auf eine Infektion mit dem Respiratorischen Synzytialvirus B in der Probe KMT09. Drei weitere Proben der Patienten KMT03, KMT16 und KMT17 waren in mehreren Wiederholungen in der real-time PCR nicht reproduzierbar positiv, was ebenfalls durch die hohen C_T -Werte von >35 erklärbar ist. Diese Proben wurden daher als fraglich positiv (+) bezeichnet. Sie stammten alle vom Zeitpunkt vor der Transplantation. Zusammengefasst sind 16,6% der untersuchten Patienten PCR-positiv für Mimivirus in respiratorischen Proben diagnostiziert worden, wobei keiner der Patienten zu mehreren Zeitpunkten positiv war. Die Acanthamöben-PCR war für alle Proben negativ.

Von 31 Seren aus 18 Patienten wurden 3 Proben als seropositiv für Mimivirus bewertet, wobei der Western Blot bei einem Patienten nicht eindeutig ausfiel. Dabei handelt es sich um die Proben KMT02, KMT12 und KMT16 zu den Zeitpunkten vor Transplantation und an den Tagen 200.

Die Proben KMT02 und KMT12 sind bemerkenswerterweise sowohl IgG- als auch IgM-reaktiv, wobei Probe KMT02 zum Zeitpunkt vor Transplantation auch in der korrespondierenden Nasenspülflüssigkeit PCR-positiv war. Hier scheint es sich um eine akute Mimivirus-Infektion zu handeln. Ein Screening auf respiratorische Erreger mit dem RespiFinder der Firma PathoNostics ergab keinen weiteren Befund. Keiner der Patienten war im zeitlichen Verlauf der Untersuchung mehrfach positiv in der Serologie oder der PCR. Zusammengefasst waren 16,6% der untersuchten Patienten zu einem Zeitpunkt seropositiv für Mimivirus.

Die in der PCR oder Serologie Mimivirus-positiven Patienten hatten während ihrer klinisch-stationären Phase (mindestens 3 Monate nach Transplantation) keine nachweisbare Pneumonie. Auch in der poststationären Phase bis zum Tag 200 nach der Transplantation konnte keine Pneumonie nachgewiesen werden. Allerdings hatten 3 der 18 untersuchten Patienten im Verlauf der klinischen Phase eine Pneumonie, wobei 2 Patienten beatmungspflichtig waren. Alle 3 Patienten waren jedoch in der Mimivirus-Serologie und in der Mimivirus-PCR negativ.

D Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Prävalenz eines neuartigen Virus, des Mimivirus, in der gesunden Bevölkerung, repräsentiert durch Blutspender, und in verschiedenen Risikopatienten untersucht werden. Zu diesen Risikogruppen zählten Patienten mit Pneumonien oder anderer respiratorischer Symptomatik, da dies in der Literatur beschrieben ist [10,63], und immunsupprimierte Patienten im Verlauf einer Stammzell-Transplantation, bei denen häufig respiratorische Komplikationen auftreten [64]. Da ein großer Anteil der respiratorischen Infektionen nicht aufgeklärt werden kann, war die Frage, ob hier Mimiviren eine Rolle spielen können.

Mimiviren sind in vielerlei Hinsicht als besonders anzusehen [65]. Sie zählen zu den so genannten *giant viruses*, da sie mit einer Größe 400–600 nm wesentlich größer sind als alle bisher bekannten Viren [30]. Ihr Genom mit ca. 1,2 Mb zählt nicht nur zu den größten aller bisher bekannten Viren [34], sondern kodiert auch für Proteine, die man bisher aus nur zellulären Organismen kannte. Es wird diskutiert, ob Mimiviren im Zusammenhang mit Pneumonien stehen können [63]. Obwohl bislang nur aus einer Pneumonie-Patientin das Virus isoliert werden konnte [42], zeigen serologische Untersuchungen, dass im Vergleich zu gesunden Personen die Seroprävalenz in Patienten, die an einer Pneumonie erkrankt sind, signifikant erhöht ist [66]. Eine Mimivirus-positive Serologie scheint assoziiert zu sein mit der Dauer der Beatmung und dem Aufenthalt auf der Intensivstation [63].

Da der Nachweis von Mimivirus aufgrund der nicht bekannten Risiken keinen Routineparameter in der Labordiagnostik darstellt, wurde in dieser Arbeit zunächst ein diagnostisches System für Mimiviren etabliert und validiert. Dieses bestand sowohl aus dem Direktnachweis des Mimivirus-Genoms mittels PCR als auch aus serologischen Verfahren für den indirekten Nachweis einer Mimivirus-Infektion.

1 Etablierung eines diagnostischen Systems zum direkten Nachweis von Mimiviren

Der direkte Nachweis eines Virus in klinischen Proben erfolgt heutzutage häufig mittels der PCR, in den meisten Fällen mit einer PCR-Variante, der so genannten real-time PCR [24,67]. Die real-time PCR hat dabei zahlreiche Vorteile. Sie ist schnell, da nach der PCR-Reaktion keine weiteren praktischen Analyse-Schritte notwendig sind. Vor allem aber bietet die real-time PCR durch die Verwendung zusätzlicher Sonden eine erhöhte Spezifität und die Möglichkeit der Quantifizierung, mit Nachweisgrenzen unter 10 Kopien eines Virusgenoms pro Reaktion. Für den Nachweis von Mimiviren wurden zu Beginn der Arbeit in der Arbeitsgruppe zwei real-time PCR-Assays entworfen, die in unterschiedlichen Bereichen des

Genoms des Mimivirus liegen und damit zur gegenseitigen Bestätigung geeignet sind. Das Design erfolgte nach den bekannten Regeln, welche die Ausgewogenheit der Primer und Sonde bezüglich der Zusammensetzung und Schmelztemperatur berücksichtigen [62]. Da in öffentlichen Datenbanken lediglich ein einziger Eintrag für ein Mimivirus-Genom verfügbar war [34], wurden die Primer und Sonden für diese Sequenz entworfen. Mit Hilfe der BLAST search-Funktion der NCBI wurde getestet, ob es signifikante Homologien zu humanen DNA-Sequenzen oder Sequenzen von anderen Viren, vor allem respiratorischen Erregern, gibt (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dies war nicht der Fall und ließ erwarten, dass die entworfenen PCR-Systeme für Mimivirus spezifisch sind, was mit diversen respiratorischen Viren in PCR-Läufen bestätigt werden konnte. Ebenso wichtig, weder humane DNA noch DNA von Acanthamoeben führte zu einer Reaktion. Unter Berücksichtigung der Erwartung, dass nur wenige Proben Mimivirus-positiv sein würden, wurden die beiden einzelnen PCR-Systeme zu einer Duplex-PCR kombiniert, was den Vorteil hatte, zwei verschiedene Regionen des Mimivirus-Genoms erfassen zu können.

Die Ermittlung der Sensitivität der PCRs erfolgte mit Plasmiden, welche die Zielregionen der verwendeten PCR-Systeme enthielten und mittels Optischer Dichte (OD)-Messung quantifiziert wurden. Für die Duplex-PCR wurde eine Probit-Analyse durchgeführt und eine Nachweisgrenze von 14 Kopien pro Reaktion ermittelt, was für eine Duplex-PCR vergleichsweise gut ist.

Die Strategie, mit einer Duplex-PCR die Erstuntersuchung durchzuführen und gegebenenfalls bei positiven Ergebnissen mit beiden einzelnen PCR-Systemen zu bestätigen, sollte verhindern, dass in der Erstuntersuchung falsch negative Ergebnisse aufgrund der nur wenigen Sequenzinformationen für das Design der PCRs generiert werden. Die ursprünglich ebenfalls für die Bestätigung PCR-positiver Proben entworfene konventionelle PCR, die aufgrund der Amplifikatlänge von ca. 600 Basenpaaren auch Sequenzinformationen durch Sanger-Sequenzierung liefern sollte, war jedoch wesentlich weniger sensitiv als die real-time PCR-Assays und konnte in Verdünnungsversuchen nur Proben mit einem C_T -Wert <30 erkennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erreichten Nachweisgrenzen und die Spezifität der entwickelten PCR-Assays vergleichbar mit den aus der Literatur bekannten diagnostischen PCR-Systemen sind. Der einzige Mimivirus-positive PCR-Befund in der BAL eines Pneumonie-Patienten wurde allerdings mit einer nested PCR erstellt [10], die in der Regel sehr sensitiv ist.

Da nicht nur die PCR selbst die Nachweisgrenze des diagnostischen Verfahrens bestimmt, sondern ebenfalls die Vorbereitung der Proben und die Extraktion der Nukleinsäuren, wurden für die Arbeit verschiedene Ansätze der Probenaufarbeitung bezüglich der Ausbeute an viralen Nukleinsäuren verglichen. Es ist bekannt, dass die Ausbeute von der Art des Probenmaterials, des Pathogens und dem angewendeten Verfahren abhängig ist [68,69]. Dies war besonders wichtig, da Nasenspülflüssigkeiten häufig größere Volumina enthalten, welche idealerweise eingeeengt werden sollten. Zu diesem Zweck wurden virushaltige Nasenspülflüssigkeiten simuliert, indem sterile isotonische Kochsalzlösung oder PBS mit Partikeln eines RNA-Virus (Influenza A Virus) und eines DNA-Virus (Vaccinia-Virus) in Mengen von ca. 1000 Genomeäquivalenten pro anschließender PCR-Reaktion gespickt wurde (Mimiviruspartikel standen zu diesem Zeitpunkt nicht in ausreichender Menge zur Verfügung). Aus den simulierten Nasenspülflüssigkeiten wurde mit 7 verschiedenen Extraktionskits die Nukleinsäure extrahiert, wobei je nach Kit die DNA von der RNA getrennt oder beide zusammen im Eluat auftraten. Mit bereits etablierten und validierten quantitativen real-time PCR-Assays wurde die Ausbeute verglichen [58,59]. Es zeigten sich signifikante Unterschiede bis zum Faktor 100 zwischen den verglichenen Kits, wobei das PureLink Kit von Invitrogen die besten Ausbeuten zeigte und im Weiteren verwendet wurde. Als weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Nachweisgrenze sollten die Viren aus den Nasenspülflüssigkeiten durch Ultrazentrifugation sedimentiert werden. Hier wurden die Bedingungen verwendet, mit denen erfahrungsgemäß Orthopockenviren, ebenfalls sehr große Viren, sedimentiert werden können. Das Sediment wurde in kleinem Volumen PBS aufgenommen und mit dem PureLink Kit wurde die Nukleinsäure extrahiert. Während eine signifikante Anreicherung von Orthopockenvirus-Partikeln durch die Ultrazentrifugation erreicht werden konnte, war dies überraschenderweise bei Mimivirus-Partikeln nicht reproduzierbar der Fall. Die Ursache dafür ist unklar. Daher wurde entschieden die zeitaufwändige Ultrazentrifugation zur Anreicherung nicht einzusetzen. Des Weiteren wurden für die zukünftigen Etablierungsschritte immer Mimivirus-Partikel mitgeführt, da die Verwendung der ebenfalls sehr großen Pockenvirus-Partikel als Modell offensichtlich zu abweichenden Ergebnissen führen kann.

Dieser Unterschied konnte auch bei den Versuchen beobachtet werden, Viruspartikel mit Polymeren aus der Nasenspülflüssigkeit zu präzipitieren und dann in die PCR einzusetzen. Hierzu wurden nicht näher beschriebene Polymere der Firma AJ Innuscreen eingesetzt, welche noch in der Entwicklung waren. Das Verfahren war in der Arbeitsgruppe bereits für Flaviviren aus Urinproben etabliert und zeigte dort vielversprechende Ergebnisse bei der

PCR-Diagnostik (persönliche Mitteilung Dr. Cristina Domingo-Carrasco). Daher wurden Nasenspülflüssigkeiten simuliert und mit Mimivirus-Partikeln bzw. Orthopockenvirus-Partikeln gespikt. Interessanterweise konnte für Orthopockenvirus-Partikel eine PBS-abhängige Anreicherung um den Faktor 10 beobachtet werden, während dies in steriler isotoner Kochsalzlösung und damit für Nasenspülflüssigkeiten nicht möglich war. Eine Anreicherung von Mimivirus-Partikeln war weder in steriler isotoner Kochsalzlösung noch in PBS möglich. Worin der Unterschied im Verhalten zwischen den Viruspartikeln liegt, ist ebenfalls unklar. Hier könnte jedoch die Oberflächenbeschaffenheit der Viruspartikel eine Rolle spielen, da die Mimivirus-Partikel auf der Oberfläche ca. 100 nm lange Proteinfilamente tragen [70], welche die Wechselwirkung mit dem Polymer möglicherweise beeinflussen. Hier ist anzumerken, dass die verwendeten Polymere bislang nicht kommerziell verfügbar sind und offensichtlich nicht in jedem Fall zu den gewünschten Ergebnissen geführt haben.

Wesentlich erfolgreicher gestaltete sich die Anreicherung der Nukleinsäure aus Nasenspülflüssigkeiten auf der Extraktionssäule. Unter der Annahme, dass die Bindungskapazitäten der Säule mit den in 200 μ L Nasenspülflüssigkeit enthaltenen Nukleinsäuren nicht erreicht wird, wurden Aliquots à 200 μ L der simulierten Nasenspülflüssigkeit getrennt lysiert und dann nacheinander auf die Säule zentrifugiert. Nachdem mehrere lysierte Aliquots aufgetragen wurden, erfolgte das Waschen und die Elution nach Protokoll. Hier zeigte sich, dass die Ausbeute mit der Anzahl der aufgetragenen Lysate linear zunahm. Da mindestens 1 mL Nasenspülflüssigkeit zur Verfügung stand, wurde entschieden jeweils 5 Aliquots à 200 μ L zu lysieren und auf eine Säule aufzutragen.

Das geschilderte Verfahren erlaubt den verlässlichen Nachweis von Mimivirus-DNA aus Nasenspülflüssigkeiten mit Nachweisgrenzen von ca. 140 Genomäquivalenten Mimivirus-DNA pro 1 mL Nasenspülflüssigkeit.

2 Etablierung eines diagnostischen Systems zum indirekten Nachweis von Mimiviren

Der indirekte Nachweis einer Virusinfektion erfolgt in der Regel mit serologischen Standardverfahren wie dem ELISA oder dem Immunfluoreszenztest [1,4]. Da es sich bei Mimiviren um neue Viren mit unbekannter klinischer Pathogenität handelt, sind keine kommerziellen Testsysteme zum Nachweis von anti-Mimivirus-Antikörpern verfügbar gewesen. Daher wurde in dieser Arbeit ein Verfahren zur Serodiagnostik von Mimiviren etabliert.

Da zu Beginn der Arbeit kein positives humanes Serum mit anti-Mimivirus-Antikörpern zur Verfügung stand, wurde ein Kaninchen mit gereinigten Mimivirus-Partikeln immunisiert. Dessen Reaktivität mit Mimivirus-Partikeln konnte in Zusammenarbeit mit ZBS 4 im Robert Koch-Institut mit der Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Das erhaltene Serum wurde zur Etablierung der serologischen Tests verwendet.

In der Regel erlaubt der Immunfluoreszenztest mit virusinfizierten Zellen gut zu bewertende Ergebnisse. Mimiviren replizieren in Acanthamoeben, jedoch ist das Verfahren zur Anzucht nicht gut standardisierbar, da zyklisch nicht infizierte Amöben zu infizierten Amöben zugefüttert werden müssen [47]. Des Weiteren ist von einer deutlichen Seroprävalenz für Amöben in der Bevölkerung auszugehen [71], was die Bewertung in Bezug auf falsch positive Reaktionen erschweren könnte. Auch in der Literatur wurden daher infizierte Amöben für den Immunfluoreszenztest als ungeeignet angesehen.

Daher wurden verschiedene Zelllinien mit Mimiviren infiziert und die Zellen im Verlauf der Infektion mikroskopisch auf einen zytopathischen Effekt sowie mit der quantitativen real-time PCR auf die Replikation mimiviraler DNA untersucht. Keine der untersuchten Zelllinien (z.B. Vero, Hep2, WI-38, RAW 264.7) zeigte einen zytopathischen Effekt oder eine Zunahme der Mimivirus-DNA. Auch eine Färbung der infizierten Zellen mit dem anti-Mimivirus-Kaninchenserum gab keine Hinweise auf eine Replikation der Viren in diesen Zellen.

In der Literatur ist beschrieben, dass aufgereinigte Mimivirus-Partikel direkt auf Glasträger gegeben werden und mit Serumantikörpern untersucht werden können [10]. Dieser Ansatz führte jedoch zu schwer zu bewertenden Ergebnissen, da markierte Viruspartikel nur unsicher vom Hintergrund differenziert werden konnten.

Als neuer Ansatz wurde daher versucht, aufkonzentrierte Mimivirus-Partikel auf Zellen zu schichten, welche auf Glasträgern wachsen, damit die komplexen Viruspartikel an die Zelloberflächen adhären können. Dieser Ansatz hat sich mit WI-38-Zellen als gut geeignet erwiesen, und für weitere serologische Untersuchungen wurden die Glasträger nach diesem neuen Verfahren hergestellt.

Da keine definitiv Mimivirus-seropositiven Seren zur Verfügung standen, wurde der Immunfluoreszenztest auf eine willkürliche Auswahl von 80 Blutspenderseren angewendet. Die mikroskopische Bewertung von Serumverdünnungen zeigte neben den markierten Mimivirus-Partikeln auch unspezifische Signale der Zellen, welche bei einer Verdünnung der Seren von 1:320 nicht mehr erkennbar waren, während das Virussignal erhalten blieb. Daher wurde ein vorläufiger Grenzwert von 1:320 für eine seropositive Bewertung festgelegt. Der Nachweis von IgM-Antikörpern zeigte sich als wesentlich schwieriger in Bezug auf

zahlreiche Kreuzreaktionen und wurde daher nicht in die Bewertung der klinischen Proben mit einbezogen. In der Literatur beschriebene Serostudien für Mimivirus verwenden vergleichbare Grenzwerte von 1:160, wobei ein direkter Vergleich aufgrund der schwierigen Standardisierbarkeit sicherlich nur schwer möglich ist.

Um trotzdem einen Bestätigungstest für im Immunfluoreszenztest seropositive Proben zur Verfügung zu haben, wurde ein Western Blot mit dem anti-Mimivirus-Kaninchenserum und einer Auswahl von positiven Blutspenderseren etabliert. Der Vorteil des Western Blots war hier, dass durch parallele Untersuchung von Proteinlysaten von Acanthamoeben und Mimiviren über die Bandenhöhe eine klare Differenzierung möglich war. So zeigten sich neben einigen Banden für Acanthamoeben vor allem zwei offensichtliche Mimivirus-spezifische Banden des Molekulargewichts ca. 32 kDa und 90 kDa, die ausschließlich bei Mimivirus-Lysaten erkennbar waren. Um welche Proteine es sich handelt ist unbekannt. Es fiel auf, dass für einen positiven Western Blot geringere Verdünnungen der Seren eingesetzt werden mussten, was auf eine geringere Sensitivität des Western Blots im Vergleich zum Immunfluoreszenztests hindeutet.

Zusammenfassend wurde erfolgreich ein Verfahren zur serologischen Untersuchung von Mimivirus-Infektionen etabliert, welches eine Vereinfachung im Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Verfahren darstellt. Während auch dort der Nachweis von IgM-Antikörpern als schwer bewertbar betrachtet wird, erfolgt die Bestätigung durch das unabhängige Verfahren der zweidimensionalen Immunproteom-Analyse, was jedoch in der Routinediagnostik noch nicht einsetzbar ist [42].

3 Studien zur Prävalenz von Mimiviren

Die Daten in der Literatur im Hinblick auf die Pathogenität von Mimiviren als Auslöser respiratorischer Infektionen sind nicht eindeutig und stammten aus verschiedenen Ländern Europas, während für Deutschland keinerlei Daten vorlagen. Daher wurden die in dieser Arbeit etablierten diagnostischen Verfahren eingesetzt, um erste Daten zur Prävalenz von Mimiviren in deutschen Proben zu generieren.

Blutspender werden in derartigen Studien häufig als stellvertretend für die gesunde Bevölkerung betrachtet. Blutspender sind auf die bekannten durch Blut übertragbaren Erreger untersucht und werden nicht zur Blutspende zugelassen, wenn sie klinische Symptome einer Erkrankung zeigen. Es wurden 350 Blutspender mit dem Immunfluoreszenztest auf Mimivirus-spezifische IgG-Antikörper untersucht. Davon wurden 8/350 (2,3%) als seropositiv bewertet. Von diesen Proben konnten 5/8 (62,5%) im Western Blot als positiv bestätigt werden. Unter Berücksichtigung der möglicherweise geringeren Nachweisgrenze des

Western Blots und der Tatsache, dass andere Studien keinen Western Blot zur Bestätigung neben dem Immunfluoreszenztest durchgeführt haben [42], sondern technisch aufwändigere zweidimensionale Immunoblots, liegt damit die Seroprävalenz von Mimivirus in den untersuchten Blutspendern zwischen 1,6% und 2,3%. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten, bei denen beispielsweise in Kanada eine Prävalenz von 2,3% in 511 Blutspendern ermittelt wurde [10]. In einer Studie aus Frankreich wurde von 50 Blutspendern keiner als seropositiv für Mimiviren bewertet, was neben den Variationen im diagnostischen Test selbst durch die relativ geringe untersuchte Probenzahl begründet sein kann [38]. Dass die Untersuchung größerer Probenzahlen aus Deutschland zu anderen Ergebnisse führt, wird nicht erwartet, da die Daten nicht wesentlich von den wenigen bekannten Ergebnissen anderer Länder abweichen. An dieser Stelle muss bemerkt werden, dass die Blutspender alle aus dem Raum Berlin und Berlin-Brandenburg stammen und somit nur ein regional eingeschränktes Bild abgeben, was allerdings in den anderen publizierten Studien ebenfalls der Fall war. Hier dienten Blutspender jeweils als Vergleichsgruppe für Patienten mit respiratorischen Infektionen.

Für diese Patienten ist beschrieben, dass besonders das Vorliegen einer Pneumonie und die Länge eines Aufenthaltes auf der Intensivstation sowie eine Beatmungspflicht die Wahrscheinlichkeit erhöhen, seropositiv für Mimiviren zu sein [37]. Die Prävalenz schwankt hier je nach Studie zwischen 3,2 und 19,2 % bei beatmeten Patienten, wobei der Nachweis von Mimivirus-DNA aus einer korrespondierenden respiratorischen Probe bislang nur zweimal möglich war [10, 42]. Die einzige Studie, die eine erfolgreiche Isolierung von Mimivirus aus respiratorischen Proben beschreibt, gibt jedoch keine genauen Hinweise darauf, ob die in der Anzucht des Virus positive klinische Proben auch PCR-positiv für Mimivirus waren [42]. Mittlerweile wurde ein weiteres Isolat aus Stuhlproben gewonnen, jedoch auch ohne Informationen zur PCR-Diagnostik [43]. Auch größere Probenkollektive waren PCR-negativ für Mimiviren und bekräftigen die Diskrepanz zwischen Seropositivität und dem Virusnachweis in Patienten mit respiratorischen Erkrankungen [72]. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Patientengruppen untersucht, die einen Überblick über die Mimivirus-Prävalenz in Patienten mit respiratorischen Symptomen geben sollten.

Die erste Patientengruppe enthielt 25 erwachsene Patienten aus dem Raum Freiburg mit einer Pneumonie und es standen nur Seren zur Verfügung. Aus dieser Gruppe war 1 Patient seropositiv für anti-Mimivirus IgG-Antikörper (4%) und 3 andere Patienten für IgM-Antikörper. Eine zweite Gruppe beinhaltete Serumproben und korrespondierende BAL von 15 erwachsenen immunsupprimierten Patienten aus derselben Region mit einer respiratorischen

Infektion. Aus dieser Gruppe waren 2 Patienten seropositiv für anti-Mimivirus IgG-Antikörper (11%) und ebenfalls 5 andere Patienten für IgM-Antikörper. Da keine der 18 BAL PCR-positiv war, muss der IgM-Befund wie bereits beschrieben kritisch bewertet werden. Auch in der Literatur wird von IgM-positive Patienten berichtet, die zur gleichen Zeit in respiratorischen Proben PCR-negativ sind. Eine mögliche Erklärung ist die geringe Viruslast in den untersuchten Patienten oder der falsche Zeitpunkt. Allerdings ist es bemerkenswert, dass weltweit kein IgM-positiver Patient in einer korrespondierenden respiratorischen Probe Mimivirus-DNA-positiv ist. Dadurch lässt sich ein Problem bei der IgM-Diagnostik nicht ausschließen. Zusammengefasst sind von 40 untersuchten Patienten dieser beiden Gruppen 3 Patienten IgG-positiv für Mimiviren (7,5%). Dies ist im Bereich der publizierten Daten, welche Werte von 3,2 bis 19,2% beschreiben.

In der dritten Gruppe befanden sich Patienten der Rettungsstelle der Kinderklinik, die nach Aufklärung in die Studie eingeschlossen wurden und von denen Nasenspülflüssigkeit und Serum untersucht werden konnten. Keiner dieser Patienten war positiv für Mimivirus in der Serologie oder PCR. Da es sich hierbei um eine geringe Probenzahl handelt, sind signifikante Aussagen schwer zu treffen.

Weitere Studien z.B. an Patienten mit respiratorischem Infekt aus Österreich mit größeren Probenzahlen können ebenfalls keine positiven Ergebnisse bei PCR-Untersuchungen vorweisen. In 220 Proben aus 109 COPD-Patienten konnte ebenfalls keine Mimivirus-DNA im Sputum mit der real-time PCR nachgewiesen werden [49]. Die korrespondierenden serologischen Untersuchungen ergaben 3 IgG-positive Patienten, was einer Rate von 2,8% entspricht und damit in den bekannten Bereichen der Seroprävalenz gesunder Blutspender entspricht. Eine retrospektive Studie aus China zum Beispiel an Kindern mit akuten respiratorischen Infektionen der oberen und unteren Atemwege mit größeren Probenzahlen können ein positives real-time RT-PCR-Ergebnis für Mimivirus bei einem 6 Monate alten Säugling vorweisen. Der Junge wurde mit einem Atemnotsyndrom geboren, und es folgten in den ersten Lebensmonaten mehrere stationäre Aufenthalte aufgrund rezidivierender Atemwegsinfektionen. Eine durchgeführte nested PCR war jedoch negativ. In der Studie erfolgte keine serologische Untersuchung korrespondierender Seren (74).

Bedenkt man, dass selbst IgM-positive Patienten nicht PCR-positiv werden, handelt es sich möglicherweise nicht um eine direkte Korrelation von Mimivirus-Infektion und respiratorischem Infekt. Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die verschiedenen Studien unterschiedliche respiratorische Materialien untersuchen, wie BAL, Sputum und Nasenspülflüssigkeit, was zu nicht vergleichbaren Daten führen kann.

Als letzte Gruppe wurden Kinder im Verlauf der Stammzelltransplantation untersucht. Dazu wurden die Patienten und die Eltern mit Hilfe eines selbst entworfenen und mit den behandelnden Ärzten der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie abgestimmten Aufklärungsbogens über den Hintergrund der Studie aufgeklärt und Proben im Verlauf der Therapie zu definierten Zeitpunkten genommen. Die Patienten wurden im Idealfall bis >200 Tage nach der Transplantation untersucht. In den meisten Fällen konnten dazu Serum und eine korrespondierende Nasenspülflüssigkeit entnommen werden.

Es wurden 68 Proben von 18 Patienten mit der etablierten PCR-Diagnostik untersucht. Dabei erwiesen sich 3/68 der Proben als bestätigt PCR-positiv (4,4%), und da die Proben von unterschiedlichen Patienten stammten, waren 3/18 Patienten zu je einem Zeitpunkt PCR-positiv (16%). Alle drei Proben wurden durch 2 unabhängige real-time PCR-Assays bestätigt, jedoch mit C_T -Werten von >35, was auf sehr geringe Viruslasten schließen lässt. Bedenkt man die Anreicherung der Virus-DNA mit Hilfe der Mehrfachlyse, sind die DNA-Lasten in den Nasenspülflüssigkeiten dieser Patienten <100 Genomäquivalente pro mL. Die Proben stammten von Zeitpunkten vor der Transplantation, 30 Tage und 100 Tage nach der Transplantation, was nicht auf eine Korrelation mit der immunologischen Rekonstitution im Verlauf der Therapie hindeutet. Drei weitere Proben von 3 anderen Patienten waren vor der Transplantation fraglich positiv. Die mehrfache Wiederholung der Uniplex real-time PCR-Assays ergab für diese Proben wechselnde Ergebnisse und die konventionelle PCR blieb, wie erwartet, ebenfalls negativ. Eine erneute Präparation war aufgrund der begrenzten Menge der Nasenspülflüssigkeiten nicht möglich.

Der Nachweis von Mimivirus-DNA in klinischen Proben ist bislang ein sehr seltenes Ereignis. Daher ist es bemerkenswert, dass in den hier untersuchten Patienten 3 unabhängige Proben PCR-positiv für Mimiviren waren. Leider war eine weitere Charakterisierung der Mimiviren in diesen Proben nicht möglich, da die Viruslasten zu gering für eine Sequenzanalyse waren. Der Versuch einer nested-PCR basierend auf den Primern der real-time PCR ergab keine sequenzierbaren Produkte.

In der serologischen Untersuchung waren 3/31 Proben (9,5%) im Immunfluoreszenztest positiv für IgG-Antikörper gegen Mimivirus. Diese Proben stammten von 3 verschiedenen Patienten und 2 verschiedenen Zeitpunkten vor der Transplantation und nach 200 Tagen. Zwei der Proben waren ebenfalls IgM-reaktiv. Obwohl die IgM-Reaktivität aufgrund methodischer Unsicherheiten nicht überbewertet werden darf, war einer der beiden Patienten nicht nur IgG- und IgM-positiv, sondern ebenfalls in der Nasenspülflüssigkeit PCR-positiv für Mimivirus. Hier scheint es sich tatsächlich um eine Mimivirus-Infektion zu handeln. Dieser

Patient litt an einem myelodysplastischen Syndrom und wurde durch Transplantation von peripheren hämatopoietischen Blutstammzellen eines gematchten nicht verwandten Spenders therapiert. Es gab eine CMV-Reaktivierung im Verlauf der Therapie.

Natürlich kann im Zusammenhang mit den positiven PCR-Befunden eine Kontamination nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Aufgrund der Reproduzierbarkeit der PCR-Ergebnisse müsste diese bereits auf Ebene der Extraktion stattgefunden haben. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist nicht sehr hoch, da die Probenextraktion immer ohne vorherigen Kontakt zu Mimivirus-positivem Material und unter eigens für die Probenpräparation bereitgestellten Werkbänken unter Berücksichtigung aller Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt wurde. Außerdem wurden die PCR-positiven Proben nicht an denselben Tagen extrahiert und bearbeitet. Obwohl keine *suicide* PCR durchgeführt wurde, ist eine Kontamination daher unwahrscheinlich [10,73].

Da die Sammlung der Proben ein hohes Maß an Koordination mit den Kollegen der Kinderklinik erforderte und von der Anzahl der zu therapierenden Patienten abhängig war, konnten in über eineinhalb Jahren nur 68 Proben von 18 Patienten erhalten werden. Daher mag die statistische Aussagekraft der Ergebnisse begrenzt sein. Trotzdem konnten in dieser Patientengruppe neben seropositiven Proben auch PCR-positive Patienten identifiziert werden, was in der Literatur extrem selten beschrieben ist. Ob aufgrund der hämatologischen Grunderkrankung die Infektion mit Mimiviren begünstigt wird, kann nicht festgestellt werden.

3.1 Abschließende Risikobewertung

Nach der Publikation im Jahr 2003, dass es sich bei den 1992 entdeckten gram-positiven Bakterium *Bradfordcoccus* um ein Virus handelt, war es lange unklar, ob diese so genannten Mimiviren (von *microbe mimicking*) als Pathogene für den Menschen eine Rolle spielen. Eine Reihe von Studien konnte belegen, dass die Wahrscheinlichkeit der Mimivirus-Seropositivität bei Patienten mit Pneumonie erhöht ist, ebenfalls bei Patienten unter Intensivpflege und Beatmung. In einer französischen Studie konnte bei beatmeten Patienten einmalig in einer BAL Mimivirus-DNA mit einer hochsensitiven nested PCR nachgewiesen werden [10]. Im Jahr 2013 konnte erstmalig das Virus aus einer Patientin mit Pneumonie isoliert werden [42]. Der direkte Virusnachweis ist also ein sehr seltenes Ereignis. Interessant sind daher die hier erhobenen Daten, nach denen in der Gruppe der immunsupprimierten Kinder 3/18 Patienten PCR-positive Nasenspülflüssigkeiten aufwiesen. Nach den bekannten Daten hatte dies jedoch keinen Einfluss auf die Therapie und Prognose der Patienten.

Im Vergleich dazu liegt die durchschnittliche Seroprävalenz von Mimiviren in der gesunden Bevölkerung im Bereich von 2% und ist bei Patienten mit respiratorischer Symptomatik offensichtlich erhöht. Um diesen Widerspruch aufzulösen sind weitere Studien an größeren Probenkollektiven mit verschiedenen Diagnosen notwendig, wobei die Untersuchung von verschiedenen Proben des Respirationstraktes ebenso wichtig ist wie serologische Untersuchungen.

Nach heutigem Kenntnisstand ist das pathogene Potenzial von Mimiviren für den Menschen als nicht hoch einzuschätzen. Da Mimiviren und andere *giant viruses* jedoch ubiquitär vorkommen und vor allem in den Ozeanen gefunden werden konnten [74], ist weiterhin mit Infektionen des Menschen zu rechnen.

E Literaturverzeichnis

1. Marre, Reinhard; Mertens, Thomas ; Trautmann, Matthias; Zimmerli W. Klinische Infektiologie Infektionskrankheiten erkennen und behandeln. 2nd ed. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2007. 1254 p.
2. Dunn JJ, Miller MB. Emerging respiratory viruses other than influenza. Vol. 34, Clinics in Laboratory Medicine. 2014. p. 409–30.
3. MacNeil A, Nichol ST, Spiropoulou CF. Hantavirus pulmonary syndrome. Vol. 162, Virus Research. 2011. p. 138–47.
4. Doerr HW, Gerlich H. Medizinische Virologie : Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen. 2 Auflage. Stuttgart ; New York: Thieme; 2009. 760 p.
5. Zuckerman A. Principles and Practice of Clinical Virology. 6th ed. Jangu E. Banatvala (Editor), Paul Griffiths (Editor), Barry Schoub (Editor) PM (Editor), editor. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd; 2009. 1013 p.
6. Kuiken T, Fouchier R, Rimmelzwaan G, Osterhaus A. Emerging viral infections in a rapidly changing world. Vol. 14, Current Opinion in Biotechnology. 2003. p. 641–6.
7. Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva L V, Xu XY, Bridges CB, Uyeki TM. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. N Engl J Med. 2009;360(25):2605–15.
8. Marrie TJ, Durant H, Yates L. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization: 5-year prospective study. Rev Infect Dis. 1989;11(4):586–99.
9. La Scola B, Audic S, Robert C, Jungang L, De Lamballerie X, Drancourt M, Birtles R, Claverie JM, Raoult D. A giant virus in amoebae. Vol. 299, Science. 2003. p. 2033.
10. La Scola B, Marrie TJ, Auffray JP, Raoult D. Mimivirus in pneumonia patients. Emerg Infect Dis. 2005;11(3):449–52.
11. Leland DS, Ginocchio CC. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. Clin Microbiol Rev. 2007 Jan 1;20(1):49–78.
12. Lednicky JA, Wyatt DE. The Art of Animal Cell Culture for Virus Isolation. In: Biomedical Tissue Culture. InTech; 2012. p. 151–78.
13. Gentile M, Gelderblom HR. Electron microscopy in rapid viral diagnosis: An update. Vol. 37, New Microbiologica. 2014. p. 403–22.
14. Biel SS, Nitsche A, Kurth A, Siegert W, Özel M, Gelderblom HR. Detection of Human

- Polyomaviruses in Urine from Bone Marrow Transplant Patients: Comparison of Electron Microscopy with PCR. *Clin Chem*. 2004;50(2):306–12.
15. Biel SS, Gelderblom HR. Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. In: *Journal of Clinical Virology*. 1999. p. 105–19.
 16. Hazelton PR, Gelderblom HR. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. Vol. 9, *Emerging Infectious Diseases*. 2003. p. 294–303.
 17. Roingard P. Viral detection by electron microscopy: past, present and future. *Biol Cell*. 2008;100(8):491–501.
 18. Gelderblom HR, Bannert N, Muss W, Madeley CR. Routine, rapid, noninvasive diagnosis of viral skin exanthems. *Br J Dermatol*. 2006 Mar;154(3):558–60.
 19. Liddell E WL. *Antikörpertechniken*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1996.
 20. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*. 1990;262(4):56–61, 64–5.
 21. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich H a, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350–4.
 22. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. *Molecular virology*. 2nd ed. Vol. 9783642207, *Molecular Virology*. berlin Heidelberg: Springer; 2013. 1-1016 p.
 23. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7276–80.
 24. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time Fluorescent PCR Techniques to Study Microbial-Host Interactions. Vol. 34, *Methods in Microbiology*. 2004. p. 255–330.
 25. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(6):1292–305.
 26. Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. 7th ed. Vol. 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Berlin; 2009. 1119 p.
 27. Iyer LM, Balaji S, Koonin E V., Aravind L. Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. Vol. 117, *Virus Research*. 2006. p. 156–84.
 28. Colsonf P, Yutinf N, Shabalina SA, Robert C, Fournous G, La Scola B, Raoult D, Koonin E V. Viruses with more than 1,000 genes: Mamavirus, a new *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus strain, and reannotation of mimivirus genes. *Genome Biol Evol*. 2011;3(1):737–42.

29. Arslan D, Legendre M, Seltzer V, Abergel C, Claverie J-M. Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(42):17486–91.
30. Aherfi S, Colson P, La Scola B, Raoult D. Giant Viruses of Amoebas: An Update. *Front Microbiol*. 2016;7:349.
31. Birtles RJ, Rowbotham TJ, Storey C, Marrie TJ, Raoult D. Chlamydia-like obligate parasite of free-living amoebae [7]. Vol. 349, *Lancet*. 1997. p. 925–6.
32. Xiao C, Kuznetsov YG, Sun S, Hafenstein SL, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Suzan-Monti M, Raoult D, McPherson A, Rossmann MG. Structural studies of the giant Mimivirus. *PLoS Biol*. 2009;7(4):0958–66.
33. Klose T, Kuznetsov YG, Xiao C, Sun S, McPherson A, Rossmann MG. The three-dimensional structure of mimivirus. Vol. 53, *Intervirology*. 2010. p. 268–73.
34. Raoult D, Audic S, Robert C, Abergel C, Renesto P, Ogata H, La Scola B, Suzan M, Claverie J-M. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*. 2004;306(5700):1344–50.
35. Suzan-Monti M, La Scola B, Raoult D. Genomic and evolutionary aspects of Mimivirus. Vol. 117, *Virus Research*. 2006. p. 145–55.
36. Claverie JM, Abergel C. Mimivirus: The emerging paradox of quasi-autonomous viruses. Vol. 26, *Trends in Genetics*. 2010. p. 431–7.
37. Bousbia S, Papazian L, Saux P, Forel JM, Auffray JP, Martin C, Raoult D, La Scola B. Serologic Prevalence of Amoeba-Associated Microorganisms in Intensive Care Unit Pneumonia Patients. *PLoS One*. 2013;8(3).
38. Berger P, Papazian L, Drancourt M, La Scola B, Auffray JP, Raoult D. Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(2):248–55.
39. Raoult D, Renesto P, Brouqui P. Laboratory infection of a technician by mimivirus. *Ann Intern Med*. 2006 May 2;144(9):702–3.
40. Nair GB, Niederman MS. Nosocomial Pneumonia. Lessons Learned. Vol. 29, *Critical Care Clinics*. 2013. p. 521–46.
41. Dare RK, Chittaganpitch M, Erdman DD. Screening Pneumonia Patients for Mimivirus1. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(3):465–7.
42. Saadi H, Pagnier I, Colson P, Cherif JK, Beji M, Boughalmi M, Azza S, Armstrong N, Robert C, Fournous G, La Scola B, Raoult D. First isolation of Mimivirus in a patient with pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2013;57(4).

43. Saadi H, Reteno DGI, Colson P, Aherfi S, Minodier P, Pagnier I, Raoult D, La Scola B. Shan virus: A new mimivirus isolated from the stool of a tunisian patient with pneumonia. *Intervirology*. 2013;56(6):424–9.
44. Zhang X-A, Zhu T, Zhang P-H, Li H, Li Y, Liu E-M, Liu W, Cao W-C. Lack of Mimivirus Detection in Patients with Respiratory Disease, China. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(11):2011–2.
45. Khan M, La Scola B, Lepidi H, Raoult D. Pneumonia in mice inoculated experimentally with *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *Microb Pathog*. 2007;42(2–3):56–61.
46. Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol*. 2006;78(9):1232–40.
47. Larcher C, Jeller V, Fischer H, Huemer HP. Prevalence of respiratory viruses, including newly identified viruses, in hospitalised children in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25(11):681–6.
48. Costa C, Bergallo M, Astegiano S, Terlizzi ME, Sidoti F, Solidoro P, Cavallo R. Detection of mimivirus in bronchoalveolar lavage of ventilated and nonventilated patients. *Intervirology*. 2012;55(4):303–5.
49. Vanspauwen MJ, Franssen FME, Raoult D, Wouters EFM, Bruggeman CA, Linszen CFM. Infections with mimivirus in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2012;106(12):1690–4.
50. Martinez AJ, Janitschke K. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: A review. Vol. 13, *Infection*. 1985. p. 251–6.
51. Maycock NJR, Jayaswal R. Update on *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Cornea*. 2016 May;35(5):713–20.
52. Di Gregorio C, Rivasi F, Mongiardo N, De Rienzo B, Wallace S, Visvesvara GS. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 1992;116(12):1363–5.
53. da Rocha-Azevedo B, Tanowitz HB, Marciano-Cabral F. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2009;2009:251406.
54. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 2015;22(10):10.
55. Mayer PL, Larkin JA, Hennessy JM. Amebic encephalitis. *Surg Neurol Int*. 2011;2:50.

56. Chandra S, Adwani S, Mahadevan A. Acanthamoeba meningoencephalitis. *Ann Indian Acad Neurol.* 2014;17(1):108–12.
57. Kohl C, Brinkmann A, Dabrowski PW, Radonić A, Nitsche A, Kurth A. Protocol for metagenomic virus detection in clinical specimens. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jan;21(1):48–57.
58. Kurth A, Nitsche A. Detection of human-pathogenic poxviruses. *Methods Mol Biol.* 2011;665:257–78.
59. Schulze M, Nitsche A, Schweiger B, Biere B. Diagnostic approach for the differentiation of the pandemic influenza A(H1N1)v virus from recent human influenza viruses by real-time PCR. *PLoS One.* 2010;5(4).
60. Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, Da Silva AJ. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol.* 2006;44(10):3589–95.
61. Dabrowski PW, Radonić A, Kurth A, Nitsche A. Genome-wide comparison of cowpox viruses reveals a new clade related to Variola virus. *PLoS One.* 2013;8(12):e79953.
62. Nitsche A. Oligonucleotide design for in-house real-time PCR applications in microbiology. In: *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterisation: From Diagnosis to Characterization*. First. Caister Academic Press; 2007. p. 41–69.
63. Vincent A, La Scola B, Forel JM, Pauly V, Raoult D, Papazian L. Clinical significance of a positive serology for mimivirus in patients presenting a suspicion of ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med.* 2009;37(1):111–8.
64. Duncan MD, Wilkes DS. Transplant-related immunosuppression: a review of immunosuppression and pulmonary infections. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(5):449–55.
65. Van Etten JL, Lane LC, Dunigan DD. DNA viruses: the really big ones (giruses). *Annu Rev Microbiol.* 2010;64(64):83–99.
66. Vincent A, La Scola B, Papazian L. Advances in mimivirus pathogenicity. Vol. 53, *Intervirology.* 2010. p. 304–9.
67. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(3):190–212.
68. Kok T, Wati S, Bayly B, Devonshire-Gill D, Higgins G. Comparison of six nucleic acid extraction methods for detection of viral DNA or RNA sequences in four different non-serum specimen types. *J Clin Virol.* 2000;16(1):59–63.

69. Fanson BG, Osmack P, Di Bisceglie AM. A comparison between the phenol-chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C/hepatitis G viral RNA from serum. *J Virol Methods*. 2000 Sep;89(1-2):23-7.
70. Claverie J-MM, Abergel C, Ogata H. Mimivirus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;328:90-117.
71. Zeehaida M, Zairi NZ, Tan ZN, Wong WK, Lim BH. Seroprevalence of anti-amoebic antibody among blood donors by indirect hemeagglutination assay. *Trop Biomed*. 2009;26(3):366-8.
72. Vanspauwen MJ, Schnabel RM, Bruggeman CA, Drent M, Van Mook WNKA, Bergmans DCJJ, Linssen CFM. Mimivirus is not a frequent cause of ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *J Med Virol*. 2013;85(10):1836-41.
73. Raoult D, Aboudharam G, Crubézy E, Larrouy G, Ludes B, Drancourt M. Molecular identification by "suicide PCR" of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(23):12800-3.
74. Andrade KR, Boratto PPVM, Rodrigues FP, Silva LCF, Dornas FP, Pilotto MR, La Scola B, Almeida GMF, Kroon EG, Abrahão JS. Oysters as hot spots for mimivirus isolation. *Arch Virol*. 2014;160(2):477-82.

F Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Bettina Wedekind, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Untersuchungen zur Prävalenz von Mimiviren in Deutschland" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Bettina Wedekind hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Poster auf Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie 2012 in Essen

Seroprevalence of anti-*Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus* antibodies in German Blood Donors

Bettina Wedekind¹, Albrecht F. Kiderlen², Sebastian Voigt³, Lars Schaade⁴, Axel Pruss⁵, Andreas Nitsche¹
¹Centre for Biological Security 1, ²Division 12 Viral Infections, ³Division 16 Mycology/Parasitology, ⁴Centre for Biological Security, Robert Koch Institute, Nordufer 20, Berlin, Germany, ⁵University Tissue Bank, Institute of Transfusion Medicine, Charité, Charitéplatz 1, Berlin, Germany

Beitrag 70% Prozent: Frau Wedekind hat zusammen mit einer Technischen Angestellten Immunfluoreszenztests erlernt und mit dieser TA den speziellen Test für die Mimivirus-Diagnostik aufgebaut. Mit diesem Test hat Frau Wedekind 350 Seren von Blutspendern untersucht und mikroskopisch bewertet und die Daten ausgewertet. Sie hat den Abstract selbst verfasst und das Poster gestaltet.

Publikation 2:

Publikation in Arbeit

Prevalence of *Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus* in Germany

Bettina Wedekind¹, Albrecht F. Kiderlen², Sebastian Voigt³, Stephan Henning⁴, Lars Schaade⁵, Axel Pruss⁶, Andreas Nitsche¹

¹Centre for Biological Threats and Special Pathogens 1, ² Division 16 Mycology/Parasitology, ³Division 12 Viral Infections, ⁴Children's Hospital Charité CVK, ⁵Centre for Biological Threats and Special Pathogens, Robert Koch Institute, Nordufer 20, Berlin, Germany, ⁶University Tissue Bank, Institute of Transfusion Medicine, Charité, Charitéplatz 1, Berlin, Germany

80% Prozent: Frau Wedekind hat zusätzlich zur oben genannten Serostudie an Blutspendern weitere Patientengruppen untersucht, wobei sie in Kooperation mit der Kinderklinik Proben von Patienten im Verlauf einer Stammzelltransplantation gezielt gesammelt hat. Dazu hat Frau Wedekind Aufklärungsbögen und Einverständniserklärungen erstellt und Patienten und Eltern ggf. zusammen mit Kollegen der Kinderklinik aufgeklärt und in Zusammenarbeit mit dem Klinikpersonal die Proben genommen sowie die Metadaten zusammengestellt. Sie hat neben der serologischen Untersuchung weiterer Patientengruppen die molekulare Diagnostik zusammen mit einer Technischen Angestellten etabliert und die verfügbaren Proben

untersucht. Abschließend hat Frau Wedekind die Daten ausgewertet. Für die anstehende Publikation hat sie bereits eine Einleitung und den Material und Methodenteil vorgelegt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Datum

Unterschrift

G Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Berlin, im August 2018

H Danksagung

Herrn Prof. Dr. Andreas Nitsche möchte ich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes herzlich danken. Ich verdanke ihm darüber hinaus jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen. Sein kompetenter Rat und seine Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm intensiv, professionell und warmherzig begleitet.

Für die unermüdliche und professionelle Einführung in die Serodiagnostik und die Immunfluoreszenztests und ihre große Erfahrung bei der Bewertung der Ergebnisse danke ich Frau Jung-Won Sim-Brandenburg ganz herzlich. Für ihre konstruktiven Ideen, die zu hervorragenden Ergebnissen führten, gebührt ihr ganz besonderer Dank. Mit großen Engagement hat sie jederzeit tatkräftig geholfen.

Ich danke Jule Hinzmann für die Unterstützung beim Erlernen der PCR, der Etablierung der diagnostischen PCR Assays, sowie für Rat und Tat bei der Bewertung der Ergebnisse, gerade wenn Probleme auftraten.

Bei Frau Dr. Livia Schrick will ich mich ganz besonders für ihr jederzeit tatkräftiges und herzliches Entgegenkommen bedanken. In hervorragender Weise half sie mir sachkundig bei der Einführung des Western Blots.

Herrn Dr. Albrecht Kiderlen danke ich für die ausgezeichnete und akribische Hilfe und Bereitstellung des Mimivirus-Antigens. Vielen Dank auch für die zahlreichen konstruktiven Gespräche bei der Auswertung des untersuchten Materials.

Herrn Dr. Lars Möller und Herrn Dr. Michael Laue danke ich für die Bereitstellung der elektronischen Bilddokumentation.

Bei meinen ärztlichen Kollegen, Dr. med. Gabriele Strauss, Dr. med. Jörn Kühl, Dr. med. W. Ebell und Dr. med. Sebastian Voigt möchte ich mich ganz besonders für ihre kritischen und äußerst konstruktiven und wertvollen Anmerkungen bei der Planung und Auswertung der vorliegenden Arbeit bedanken.

In hervorragender Weise brachten sie mir die Therapien der hämatopoetischen Stammzelltransplantationen näher und halfen mir sachkundig bei der Auswertung wichtiger Befunde und der Bereitstellung des Probenmaterials.

Bedanken möchte ich mich auch bei Silvia Muschter, die mich bei der Arbeit im Zellkulturlabor mit außerordentlichen praktischen Neuerungen tatkräftig unterstützte.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Institutes für die außerordentliche gute Zusammenarbeit. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen, weshalb ich mich bei allen herzlich bedanken will.

Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben. Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mir während der Anfertigung der Doktorarbeit unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

Ein liebevolles Dankeschön an meine Großeltern, Otto und Gertrud Wedekind. Ganz besonderen Dank dafür, dass sie immer das Beste für mich tun und alles Erdenkliche bereit sind, dafür zu geben.

I Anhang

Patienteninformationsbogen



CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und Humangenetik

Charité | Campus Virchow-Klinikum | 13344 Berlin

**Otto-Heubner-Centrum für
Kinder- und Jugendmedizin**

Klinik für Pädiatrie
mit Schwerpunkt Endokrinologie,
Diabetologie, Gastroenterologie,
Intensivmedizin und
Stoffwechselerkrankungen

Komm. Ltg.: Prof. Dr. H. Krude

Sekretariat: birgit.schulz@charite.de
Tel. +49 30 / 450 566 292
Fax +49 30 / 450 566 916

**Information für Eltern / gesetzliche(r) Erziehungsberechtigte(r)
zur Studie:**

**“Molekulargenetischer Nachweis respiratorischer Viren und Bakterien in
Nasenspülwasser und Blut bei Kindern mit Atemwegsinfekt oder
Lungenentzündung”**

VERSION:	02, gültig ab 02.11.2011
STUDIENLEITER:	OA Dr. med. Stephan Henning Klinik für Pädiatrie, Charité-CVK, Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin Tel. (030) 450 566292 Email: stephan.henning@charite.de PD Dr. rer. nat. Andreas Nitsche Robert Koch-Institut Zentrum für Biologische Sicherheit 1 Nordufer 20, D-13353 Berlin Tel. (030) 18 754 2313 Email: NitscheA@rki.de PD Dr. med. Sebastian Voigt Robert Koch-Institut Fachgebiet Virale Infektionen Nordufer 20, D-13353 Berlin Tel. (030) 18 754 2271 Email: sebastian.voigt@charite.de

Auf den nächsten Seiten möchten wir Sie über Einzelheiten der geplanten Studie informieren:

Sehr geehrte Eltern,

diese Information soll dazu dienen, Sie über die bevorstehende Studie aufzuklären und Ihr Einverständnis sowie ggf. das Einverständnis Ihres Kindes¹ für eine Teilnahme zu erhalten. Wir bitten Sie, dieses Informationsblatt aufmerksam durchzulesen. Es beschreibt Einzelheiten der Studie und was von Ihnen bzw. Ihrem Kind bei einer Teilnahme erwartet wird.

Für Fragen stehen wir jederzeit zur Verfügung.

Einladung zur Teilnahme

Wir möchten Sie bitten, Ihr Kind an einer Studie teilnehmen zu lassen, die das Ziel hat, eine genauere Untersuchungsmethode zu entwickeln, die zu einer schnelleren Aufdeckung der Ursache der Infektion führen soll.

Die Studie wird in der Klinik für Pädiatrie, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin (auch Studienzentrum oder einfach nur „Zentrum“ genannt), durchgeführt. An dieser klinischen Studie sollen insgesamt 100 Patienten ab einem Alter von 4 Wochen teilnehmen.

Bei Ihrem Kind liegt eine Infektion der Atemwege vor. Diese Erkrankung wird von einem Erreger (einem Virus oder einem Bakterium) verursacht. Es gelingt jedoch nicht immer, den Erreger zu ermitteln. Dies ist aber wichtig, um die Therapie auszuwählen, die zur Beseitigung des Erregers führen soll. Wenn es sich beispielsweise um eine virale Infektion handelt, ist die Einnahme eines Antibiotikums nicht nötig, weil ein Antibiotikum nur gegen Bakterien wirksam ist. Wenn es durch eine neue Methode schneller und besser gelingt, den Erreger zu ermitteln, könnte man ggf. auf eine Antibiotika-Therapie verzichten. Außerdem wollen wir untersuchen, ob ein neues Virus an der Entstehung einer Atemwegsinfektion im Kindes- und Jugendalter beteiligt ist. Darüber ist bisher nichts bekannt.

Deshalb möchten wir Sie fragen, ob Ihr Kind an dieser Studie teilnehmen darf.

Muss mein Kind an der Studie teilnehmen?

Selbstverständlich muss Ihr Kind nicht an dieser Studie teilnehmen. Wenn Sie sich dagegen entscheiden, werden Ihrem Kind dadurch keine Nachteile entstehen, sondern es wird alle Maßnahmen erhalten, die heute als Standard gelten.

¹ Aus Gründen der Lesbarkeit sind mit ‚Kindern‘ immer auch ‚Jugendliche‘ gemeint

Warum diese Studie?

Die Idee dieser Studie ist, den Erreger der Infektion Ihres Kindes mit einer neuen Methode ausfindig zu machen und zugleich nach einem neuen Erreger zu schauen. Mit dieser neuen Methode ist es möglich 19 verschiedene Erreger, die eine Atemwegsinfektion verursachen können, gleichzeitig zu untersuchen. Außerdem möchten wir herausfinden, ob ein kürzlich entdecktes Virus, das „Mimivirus“, an der Entstehung einer Atemwegsinfektion bei Kindern und Jugendlichen beteiligt ist. Dies ist bislang nicht bekannt.

Wer kann an dieser Studie teilnehmen?

Um an dieser Studie teilnehmen zu können, muss Ihr Kind eine akute Atemwegserkrankung haben, die im Verdacht steht, durch ein Virus oder ein Bakterium ausgelöst worden zu sein. Außerdem müssen Sie und Ihr Kind unterschreiben, dass Sie mit der Teilnahme an dieser Studie einverstanden sind.

Wer kann nicht an dieser Studie teilnehmen?

Eine Teilnahme ist nicht möglich, wenn nicht eingewilligt wird.

Was wird gemacht?

Die Erreger einer Atemwegsinfektion sitzen häufig im Nasen- und Rachenraum. Deshalb wollen wir die Nasenhöhle Ihres Kindes mit einer wässrigen Lösung spülen, um damit den Erreger herauszuwaschen. Diese Spüllösung wird dann von uns untersucht. Außerdem möchten wir nachschauen, ob Ihr Kind mit einem bestimmten Virus, dem „Mimivirus“, Kontakt gehabt hat. Dies können wir dadurch feststellen, dass in dem Blut Ihres Kindes Abwehrstoffe (sogenannte Antikörper) enthalten sind, die genau dieses Virus erkennen. Es wird aber nur Blut abgenommen, wenn die Ärztin/der Arzt es im Rahmen der Erkrankung für notwendig hält. Es wird Ihrem Kind also kein Blut nur zum Zweck dieser Studie abgenommen.

Dauer der Teilnahme

Im Rahmen der Studie wird bei Ihrem Kind nur einmal eine Nasenspülung durchgeführt und, wenn es die Ärztin/der Arzt für nötig hält, Blut abgenommen.

Was sind die Risiken?

Die Risiken einer Blutabnahme liegen in der Bildung eines Blutergusses und einer Infektion. Um eine Infektion zu vermeiden, wird die Haut vor der Blutabnahme immer gesäubert, d.h. desinfiziert.

Was geschieht, falls Probleme während der Studie auftreten?

Da es sich bei der Nasenspülung und einer eventuellen Blutentnahme um Routinemaßnahmen handelt, erwarten wir nicht, dass zu Problemen kommen wird, die einen Abbruch der Studie erzwingen.

Gibt es mögliche Vorteile für mein Kind?

Die erhaltenen Informationen dieser Studie sind zunächst von wissenschaftlichem Interesse und dienen möglicherweise der Verbesserung der Therapie. Die Teilnahme Ihres Kindes wird deshalb vielleicht helfen, eine schnellere und sicherere Diagnosestellung zu ermöglichen. Eine Garantie hierfür gibt es jedoch nicht.

Muss ich etwas bezahlen?

Die Studienteilnahme ist für Sie und Ihr Kind kostenlos.

Was muss ich bedenken, wenn mein Kind an dieser Studie teilnimmt?

Ihrem Kind wird nur Blut abgenommen, wenn zur Diagnosestellung noch weitere Blutwerte erhoben werden müssen. Ansonsten wird nur eine Nasenspülung durchgeführt. Hierbei kann es in der Nase etwas kribbeln.

Ist die Information vertraulich?

Bei dieser Studie werden die Daten Ihres Kindes gespeichert und ausgewertet. Dieser Vorgang ist gesetzlich streng geregelt, und nur bestimmte Personen dürfen Umgang mit den Daten haben. Wenn Ihr Kind an der Studie teilnehmen darf, müssen Sie und Ihr Kind damit einverstanden sein, dass die Daten neben der Speicherung und Auswertung in - wenn nötig - verschlüsselter Form für folgende Personen oder Behörden zugänglich gemacht werden:

an die Charité, vertreten durch die Studienleiter Dr. Stephan Henning, Dr. Andreas Nitsche und Dr. Sebastian Voigt oder eine von diesen beauftragte Stelle zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung.

Durch Ihre Unterschrift und die Ihres Kindes erklären Sie sich außerdem damit einverstanden, dass die zuständigen inländischen und ausländischen Überwachungsbehörden in die Daten Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinden Sie die Prüfarzte/innen von der ärztlichen Schweigepflicht.

Die Daten Ihres Kindes werden nach Beendigung oder Abbruch der Prüfung mindestens zehn Jahre aufbewahrt. Danach werden sie gelöscht, soweit nicht

gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen. Falls die Ergebnisse der klinischen Prüfung veröffentlicht werden, bleibt die Identität Ihres Kindes vertraulich.

Gibt es für diese Studie eine Versicherung?

Für diese Studie wurde keine Studienversicherung abgeschlossen.

Aufklärung über den Datenschutz

Die Studie wird nach den geltenden datenschutzrechtlichen Bestimmungen durchgeführt. Sämtliche personenbezogene, während der Studie erhobene Daten Ihres Kindes werden vor ihrer Übermittlung unkenntlich gemacht. Damit sind die Daten Ihres Kindes für den Empfänger anonym, d.h. er kann keine Verbindung zwischen den Daten und Ihrem Kind herstellen. Diese sog. Pseudonymisierungscodenummer besteht aus den Buchstaben „RKI“ sowie einer fortlaufenden dreistelligen Zahl (Beispiel: RKI001).

Durch Ihre Unterschrift auf der Einwilligungserklärung erklären Sie sich damit einverstanden, dass die Studienleiter Dr. Henning, Dr. Nitsche und Dr. Voigt und deren Mitarbeiter die personenbezogenen Daten Ihres Kindes zum Zweck der o.g. Arzneimittelprüfung erheben und verarbeiten dürfen. Personenbezogene Daten sind z.B. das Alter, das Geschlecht, Daten zur physischen und psychischen Gesundheit oder andere persönliche Daten, die während der Teilnahme Ihres Kindes an der Studie oder bei Folgeuntersuchungen erhoben wurden.

Der Studienleiter wird die personenbezogenen Daten Ihres Kindes für Zwecke der Verwaltung und Durchführung der Studie sowie für Zwecke der Forschung und statistischen Auswertung verwenden.

Für jegliche Weitergabe von Daten an Beteiligte der Studie werden die Daten Ihres Kindes mit einer Codenummer versehen (Pseudonymisierung der Daten). Auf den Codeschlüssel, der es erlaubt, die studienbezogenen Daten mit Ihrem Kind in Verbindung zu bringen, haben nur der Prüfarzt und seine Mitarbeiter Zugriff. Sämtliche Aufzeichnungen, anhand derer Ihr Kind identifiziert werden kann, werden streng vertraulich behandelt.

Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert weitergegeben werden:

a) an die Charité, Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, vertreten durch die Studienleiter Dr. Stephan Henning, Dr. Andreas Nitsche und Dr. Sebastian Voigt, oder eine von diesen beauftragte Stelle zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung.

b) an das Robert Koch-Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin.

Zum Zweck der Qualitätssicherung der Studie können die persönlichen Daten Ihres Kindes, die beim Prüfarzt verbleiben, von den Leitern der Studie und/oder seinen Vertretern eingesehen werden.

Ihr Einverständnis zur Verarbeitung der studienbezogenen Daten Ihres Kindes ist zeitlich unbefristet und nicht widerrufbar.

Die erhobenen personenbezogenen Daten werden nach dem Ende der Studie nach 10 Jahren gelöscht, sofern nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

Sie haben das Recht auf Auskunft über alle beim Prüfarzt oder den Leitern der Studie vorhandenen personenbezogenen Daten über Ihr Kind. Sie haben auch Anrecht auf Korrektur eventueller Ungenauigkeiten in den personenbezogenen Daten. Wenn Sie eine Anfrage stellen möchten, wenden Sie sich bitte an Ihren Prüfarzt. Dieser wird Kontakt mit den Leitern der Studie aufnehmen und Ihnen die Information über Ihre gespeicherten Daten zur Verfügung stellen.

Bitte beachten Sie, dass die Ergebnisse der Studie in der medizinischen Fachliteratur veröffentlicht werden können, wobei die Identität Ihres Kindes anonym bleibt. Die Verantwortlichkeit für die Verarbeitung der studienbezogenen Daten Ihres Kindes liegt bei den Studienleitern.

Die Ihrem Kind im Rahmen der o.g. Studie entnommenen Blutproben werden ebenfalls unkenntlich gemacht und in dieser Form an das Robert Koch-Institut zur dortigen Untersuchung zum Zweck der o.g. Studie übermittelt.

Die Proben werden gemäß der geltenden, gesetzlichen Aufbewahrungsfrist im Labor gelagert und danach vernichtet.

Was ist, wenn ich weitere Fragen habe?

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an Ihre(n) betreuende/n Arzt/Ärztin oder an die Studienleiter: Dr. Stephan Henning, Dr. Andreas Nitsche oder Dr. Sebastian Voigt. Sie werden rechtzeitig informiert, falls Informationen bekannt werden, die für die weitere Teilnahme an der Studie relevant sein könnten.

Ansprechpartner:

OA Dr. med. Stephan Henning
Klinik für Pädiatrie, Charité-CVK,
Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin
Tel. (030) 450 566292
Email: stephan.henning@charite.de

PD Dr. rer. nat. Andreas Nitsche
Robert Koch-Institut
Zentrum für Biologische Sicherheit 1
Nordufer 20, D-13353 Berlin
Tel. (030) 18 754 2313
Email: NitscheA@rki.de

PD Dr. med. Sebastian Voigt
Robert Koch-Institut
Fachgebiet Virale Infektionen
Nordufer 20, D-13353 Berlin
Tel.: 030-18 754 2271
Email: sebastian.voigt@charite.de

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Einwilligungserklärung



CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und Humangenetik

Charité | Campus Virchow-Klinikum | 13344 Berlin

**Otto-Heubner-Centrum für
Kinder- und Jugendmedizin**

Klinik für Pädiatrie
mit Schwerpunkt Endokrinologie,
Diabetologie, Gastroenterologie,
Intensivmedizin und
Stoffwechselerkrankungen

Komm. Ltg.: Prof. Dr. H. Krude

Sekretariat: birgit.schulz@charite.de
Tel. +49 30 / 450 566 292
Fax +49 30 / 450 566 916

Einwilligungserklärung

Titel der Studie: "Molekulargenetischer Nachweis respiratorischer Viren und Bakterien in Nasenspülwasser und Blut bei Kindern mit Atemwegsinfekt oder Lungenentzündung"

Hiermit erkläre ich,

(Vorname, Name, Adresse, Geburtsdatum des/der Teilnehmers/in)

Code-Nr,

dass ich durch Herrn/Frau Dr.....
(Name des/der Studienarzt/Studienärztin, Adresse)

mündlich und schriftlich über das Wesen, die Bedeutung, Tragweite und Risiken der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen der o.g. Studie informiert wurde und ausreichend Gelegenheit hatte, meine Fragen hierzu in einem Gespräch mit dem/der Studienarzt/Studienärztin zu klären.

Ich habe insbesondere die mir vorgelegte Teilnehmerinformation
(Versions-Nr. . und/oder Datum .) verstanden und eine Ausfertigung derselben und dieser Einwilligungserklärung erhalten.

Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für mich zurückziehen und einer Weiterverarbeitung meiner Daten und Proben jederzeit widersprechen und ihre Löschung bzw. Vernichtung verlangen kann.

Ich bin bereit, an der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen der o.g. Studie teilzunehmen.

Einwilligungserklärung zur Datenerhebung- und Datenverarbeitung

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie mich betreffende personenbezogene Daten/Angaben durch den Studienarzt erhoben pseudonymisiert auf elektronischen Datenträgern aufgezeichnet und verarbeitet werden dürfen. Ich bin auch damit einverstanden, dass die Studienergebnisse in anonymer Form, die keinen Rückschluss auf meine Person zulassen, veröffentlicht werden.

(Ggf.: Auch erkläre ich mich einverstanden, dass meine vorgenannten Daten in pseudonymisierter Form an das Robert Koch-Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin zum Zweck der o.g. Studie übermittelt werden dürfen.

Ggf.: Darüber hinaus bin ich mit der Entnahme, Herauslösung, Verschlüsselung, Untersuchung sowie Lagerung meines im Rahmen dieser klinischen Studie entnommenen Blutes, Gewebes und der hieraus ggf. entnommenen genetischen Materialien in pseudonymisierter Form für den Zweck der Studie durch den/die Studienarzt/-Studienärztin . einverstanden.

Berlin, den

Unterschrift des/der Teilnehmers/in

ggf.: Berlin, den

Unterschrift des gesetzlichen Vertreters(bei Kindern für jedes Elternteil eine Unterschriftenzeile) /Betreuers/Zeugen

Hiermit erkläre ich, den/die o.g. Teilnehmer/in am über Wesen, Bedeutung, Tragweite und Risiken der o.g. Studie mündlich und schriftlich aufgeklärt und ihm/ihr eine Ausfertigung der Information sowie dieser Einwilligungserklärung übergeben zu haben.

Berlin, den

Unterschrift des/der aufklärenden Prüfarztes/-ärztin

Seroprevalence of anti-Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus antibodies in German Blood Donors

Bettina Wedekind¹, Albrecht F. Kiderlen², Sebastian Voigt³, Lars Schaade⁴, Axel Pruss⁵, Andreas Nitsche¹

¹Centre for Biological Security 1, ²Division 12 Viral Infections, ³Division 16 Mycology/Parasitology, ⁴Centre for Biological Security, Robert Koch Institute, Nordufer 20, Berlin, Germany, ⁵University Tissue Bank, Institute of Transfusion Medicine, Charité, Charitéplatz 1, Berlin, Germany

Introduction

Acanthamoeba polyphaga mimivirus (APMV) is the first member assigned to a new family of nucleocytoplasmatic large DNA viruses called *Mimiviridae*. As an intra-amoebal pathogen, APMV could be isolated from water samples of cooling towers only a few years ago. Due to its huge size the virus was first mistaken for a bacterium, leading to the name Mimivirus which is derived from "microbe-mimicking virus". With a diameter of 750 nm and a dsDNA genome of 1.18 megabases, Mimivirus represents the largest virus known to date.

Like other amoeba-associated microorganisms, Mimivirus was discussed to be associated with community- or hospital-acquired pneumonia. While virus detection in respiratory specimens seems to be an extremely rare occurrence, serological findings of two studies from France and Canada indicate that patients suffering from pneumonia display a significantly increased seroprevalence for anti-APMV antibodies compared to controls. Comparable data from Germany are not available so far.

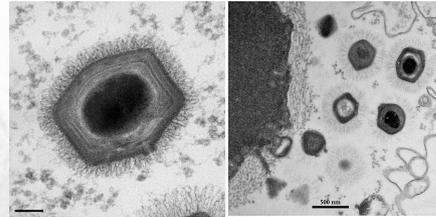


Figure 1: Electron microscopic image of APMV (kindly provided by Lars Möller, RKI)

Aim

The aim of this study was to establish a reliable serological screening test for the detection of anti-APMV antibodies and to determine the seroprevalence of APMV in blood donors

Methods

Because APMV does not grow on various cell lines tested, slides for serological immunofluorescence staining (IFA) were prepared by coating purified APMV on growing WI-38 lung cells overnight. Staining was performed according to standard procedures.

As confirmation Western Blot analysis of purified APMV-lysates and non-infected *Acanthamoeba* cells were performed.

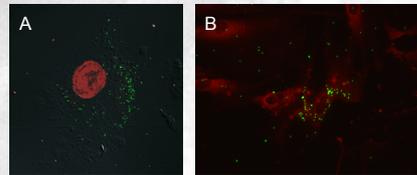


Figure 2: IFA of WI-38 cells spotted with purified APMV particles. A: Control serum from APMV immunized rabbits. B: Study serum from a patient.

Results

Our data show that among 350 healthy blood donors 8 persons (2.3%) donors are seropositive for anti-APMV antibodies.

Conclusions

Although the overall seroprevalence of anti-APMV antibodies in blood donors from the Berlin area is low, 2.3% of the donors must have been in contact to APMV. A risk assessment and the impact on the outcome of patients suffering from pneumonia needs further investigation.

Take-Home Message

German blood donors display antibodies against acanthamoeba polyphaga mimivirus at a low prevalence. These data will enable interpretation of seroprevalence data for patients at risk.