

**Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und  
Jugendmedizin Tübingen**

**Abteilung Kinderheilkunde IV mit Poliklinik**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. C. F. Poets**

**Rotavirusinfektionen bei Früh- und Neugeborenen  
Untersuchungen zur Prävalenz  
auf Neugeborenen-Intensivstationen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Jutta Elisabeth Hilberath  
aus  
Mainz**

**2005**

**Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen**

- 1. Berichtstatter: Professor Dr. C. F. Poets**
- 2. Berichtstatter: Professor Dr. G. Jahn**

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>                                | <b>5</b>  |
| 1.1 Klinische Bedeutung der Rotaviren               | 5         |
| 1.2 Forschungsstand                                 | 6         |
| 1.2.1 Klassifikation                                | 6         |
| 1.2.2 Struktur, Serotypen, Genotypen                | 7         |
| 1.2.3 Klinische Symptome                            | 7         |
| 1.2.4 Transmission                                  | 8         |
| 1.2.5 Diagnose und Nachweismethoden                 | 8         |
| 1.3 Forschungshypothese                             | 9         |
| <b>2. Material und Methoden</b>                     | <b>13</b> |
| 2.1 Studienpopulation                               | 13        |
| 2.2 Studiendesign                                   | 13        |
| 2.3 Studienablauf und Untersuchungsplan             | 13        |
| 2.4 Rotavirusidentifikation                         | 15        |
| 2.4.1 Stuhlproben                                   | 15        |
| 2.4.2 Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA, EIA) | 15        |
| 2.4.3 RT- PCR                                       | 16        |
| 2.5 Statistische Auswertung                         | 23        |
| 2.6 Ethische Aspekte                                | 23        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. Ergebnisse</b>   | <b>24</b> |
| 3.1 Prävalenz von Rotavirus in der prospektiven Longitudinalstudie | 24        |
| 3.2 Korrelation mit klinischen Symptomen                           | 25        |
| 3.3 Klinische Symptome bei Früh- vs. Reifgeborenen                 | 27        |
| 3.4 Beginn/Nachweis und Dauer der Virusausscheidung                | 27        |
| 3.5 Vergleich ELISA-Antigen-Test mit RT-PCR                        | 28        |
| <br>   |           |
| <b>4. Diskussion</b>   | <b>31</b> |
| 4.1 Nachweisverfahren für Rotaviren: ELISA und RT-PCR              | 31        |
| 4.2 Prävalenz  | 35        |
| 4.3 Klinische Symptome   | 37        |
| 4.4 Rotavirusinfektionen bei Frühgeborenen                         | 40        |
| 4.5 Nekrotisierende Enterokolitis                                  | 41        |
| 4.6 Beginn/Nachweis und Dauer der Virusausscheidung                | 41        |
| 4.7 Schutz durch Muttermilch?                                      | 42        |
| 4.8 Immunität/Resistenz  | 43        |
| <br>   |           |
| <b>5. Zusammenfassung</b>  | <b>45</b> |
| <br>   |           |
| <b>6. Literatur</b>  | <b>48</b> |

### 1. Einleitung

#### 1.1 Klinische Bedeutung der Rotaviren

Jährlich sterben ca. 3,3 Millionen Kinder unter 5 Jahren an einer Gastroenteritis (Bern 1992). Rotavirusinfektionen stellen weltweit die Hauptursache schwerer Durchfallerkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern dar (Steinhoff 1980, Kapikian 1990, Johnston 1993, Berner 1997, Bishop 1997). In Entwicklungsländern sind Rotavirus-induzierte Durchfallerkrankungen mit verantwortlich für die hohe Säuglingssterblichkeit. Auch in "entwickelten" Ländern gewinnen sie, unter anderem mit dem Auftreten neuer Rotavirus-Stämme, wieder stärker an Bedeutung. Insgesamt stellen Rotavirus-induzierte Durchfallerkrankungen also weltweit ein signifikantes Gesundheitsproblem dar.

Infektionen mit Rotaviren treten vor allem in den Wintermonaten auf (Rodriguez 1977, Steinhoff 1980, Kapikian 1990, Matson 1990, Johansen 1999, Koopmans 1999, Frühwirth 2001, Rodriguez-Baez 2002). Da das Virus hoch kontagiös ist und bereits die Ingestion von 10 Viruspartikeln eine Infektion verursachen kann (Ward 1986), sind nosokomiale Infektionen häufig (Rodriguez 1982, Grillner 1985, Bennet 1995, Frühwirth 2001, Rodriguez-Baez 2002, Gelber 2002).

Das Auftreten einer Rotavirusinfektion im Krankenhaus erfordert strenge Hygienemaßnahmen wie konsequente Händedesinfektion, Handschuh- und Kittelpflege, Isolierung bzw. Kohortierung infizierter Patienten und gesondertes Entsorgen potentiell kontaminierter Ausscheidungen. Zur Kontrolle des Ausbruchs nosokomialer Infektionen und zur Eradikation des Erregers wird die Schließung der Station empfohlen, was erhebliche Mehrbelastungen für die übrigen Stationen bedeutet.

Am häufigsten sind Kleinkinder im Alter von sechs Monaten bis zu zwei Jahren von nosokomialen Rotavirusinfektionen betroffen. Allerdings wurden zahlreiche Epidemien auch auf Neonatalstationen beschrieben (Totterdell 1976, Murphy

## 1. Einleitung

---

1977, Rocchi 1981, Rodriguez 1982), wobei sogar im Stuhl asymptomatischer Neugeborener Rotaviren nachgewiesen wurden (Chrystie 1975, Murphy 1975, Albrey 1976, Totterdell 1976). Die Infektion verläuft bei vielen Neugeborenen und einem Teil der Frühgeborenen klinisch weitgehend inapparent (Chrystie 1975, Totterdell 1976, Murphy 1977, Chrystie 1978, Crewe 1980, Rodriguez 1982, Santosham 1982, Vial 1988). Bei einem kleinen Teil v.a. der Frühgeborenen gilt sie jedoch als ursächlich für schwere Gastroenteritiden (Rocchi 1981, Dearlove 1983).

Rotavirusinfektionen werden zudem mit dem Auftreten einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) in Verbindung gebracht, einer vor allem bei sehr unreifen Frühgeborenen auftretenden extrem schweren Darmerkrankung mit sekundär septischem Krankheitsbild und einer Letalität von 10-40% (Stoll 1994; Thomson 1981, Mogilner 1983, Harris 1983, Rotbart 1983, Rotbart 1988, Boccia 2001).

### 1.2 Forschungsstand

#### 1.2.1 Klassifikation

Rotaviren gehören zur Familie der Reoviren. 1959 schlug Sabin diesen Namen vor für Viren, die typischerweise aus dem Respirations- oder Gastrointestinaltrakt isoliert werden konnten und die zu dieser Zeit noch nicht mit einem bekannten Krankheitsbild zu assoziieren waren (Reoviren: respiratory, enteric, orphan viruses [Tyler 1990]). 1973 entdeckten Bishop et al. erstmals Rotaviren beim Menschen und stellten sie in Zusammenhang mit schweren Durchfallerkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern.

Es werden 7 Gruppen von Rotaviren unterschieden, die mit den Buchstaben A bis G gekennzeichnet sind. Sie unterscheiden sich jeweils durch ihre Antigene. Für schwere Durchfallerkrankungen ist hauptsächlich die Gruppe A verantwortlich.

## 1. Einleitung

---

### 1.2.2 Struktur, Serotypen, Genotypen

Unter dem Elektronenmikroskop zeigen Rotaviren ein charakteristisches morphologisches Bild: Komplette Partikel haben einen Durchmesser von ca. 70nm und besitzen ein Proteinkapsid, das aus einer äußeren und einer inneren Schicht besteht. Durch die scharfe, kreisrunde Struktur ihres äußeren Kapsids ähneln sie Rädern, daher auch der Name Rotaviren (rota lat. Rad). Innerhalb des inneren Kapsids befindet sich der Kern, der 11 Segmente doppelsträngiger RNA enthält. 80% des Kerns werden durch das Protein VP6, der Rest fast ausschließlich durch VP2 gebildet. Der größte Anteil des äußeren Kapsids besteht ebenfalls aus 2 Proteinen, VP4 und VP7 (Tyler 1990, Schiff 1990).

Diese beiden Proteine führen bei infizierten Patienten zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern und sind verantwortlich für die Serotypenspezifität der Rotaviren. Die VP7-spezifischen Serotypen werden als G-Serotypen bezeichnet, die VP4-spezifischen als P-Serotypen oder P-Genotypen.

Die Gruppe A Rotaviren wurde in 14 G-Serotypen und mindestens 20 P-Genotypen klassifiziert. Die Serotypen G1 bis G4 und die Genotypen P(4), P(6) und P(8) werden am häufigsten bei schweren Durchfallerkrankungen isoliert (Lee 2001).

### 1.2.3 Klinische Symptome

Symptome einer Rotavirusinfektion reichen von subklinischen Infektionen über milde Diarrhöen bis hin zu schweren Durchfallerkrankungen mit Dehydratation. Meist beginnt die Erkrankung plötzlich mit wässriger Diarrhö, die fünf bis acht Tage anhält. Möglich ist vorausgehendes Erbrechen an ein bis drei Tagen. Andere Symptome sind isotone Dehydratation, kompensierte metabolische Azidose sowie leichtes Fieber (Kapikian 1976, Ryder 1977, Johnston 1993).

Rodriguez et al. (1977) untersuchten 150 Kinder mit akuter Gastroenteritis. 72 Kinder, bei denen eine Rotavirusinfektion nachgewiesen wurde, zeigten im Ver-

## 1. Einleitung

---

gleich zu nicht infizierten Kindern häufiger Erbrechen (das in den meisten Fällen der Diarrhö vorausging) und Diarrhö mit Dehydratation.

Bei Kindern mit Immundefizienz können Rotaviren zu einer chronischen Symptomatik führen. So wurden bei Kindern mit primärer Immundefizienz oder einem T-Zell-Immundefekt chronische Diarrhöen in Zusammenhang mit über mehrere Wochen andauerndem Ausscheiden von Rotaviren beschrieben (Saulsbury 1980, Wood 1988). Für immunsupprimierte Patienten vor einer Knochenmarktransplantation stellen Rotaviren eine spezielle Gefahr dar: Eine Gastroenteritis-Studie auf einer KMT-Station fand 8 von 78 Patienten, die als einziges Pathogen Rotaviren ausschieden; von diesen starben fünf. Insgesamt war die Mortalität unter den infizierten Patienten signifikant höher als unter den nicht infizierten (Yolken 1982).

Bis vor einigen Jahren nahm man an, dass Rotavirusinfektionen auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt seien. Jedoch wurde Rotavirus-RNA sowohl in Liquor (hier wird allerdings eine mögliche Kontamination während der Lumbalpunktion diskutiert) als auch in Serum infizierter Kinder nachgewiesen (Ushijima 1994, Pang 1996, Iturriza-Gomara 2002). Blutt et al. (2003), die Rotavirus-Antigen und -RNA im Serum infizierter Kinder dokumentierten, beschreiben damit ein Ausbreiten der Viren über den Gastrointestinaltrakt hinaus, das zu Antigenämie und Virämie führen kann. So ließen sich extraintestinale Symptome einer Rotavirusinfektion erklären.

### 1.2.4 Transmission

Rotaviren sind sehr stabil, ihr Vorkommen im Stuhl erhöht die Umweltstabilität und die Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln. Auf Händen ist das Virus über mehrere Stunden infektiös (Ansari 1988).



## 1. Einleitung

---

Die Übertragung erfolgt fäkal-oral von Mensch zu Mensch und über kontaminierte Gegenstände. Letzteres kann ein Grund sein für das häufige Vorkommen von nosokomialen Rotavirusinfektionen und für das Persistieren dieser Infektionen auf bestimmten Neugeborenenstationen. Ferner gibt es Spekulationen über die Möglichkeit einer respiratorischen Übertragung, die sich auf folgende Beobachtungen gründen (Gurwith 1981, Kapikian 1990):

- (1) Nachweis von Rotavirus-Antikörpern schon in den ersten Lebensjahren, unabhängig von hygienischen Verhältnissen;
- (2) große Rotavirus-Epidemien, in denen eine fäkal-orale Transmission nicht dokumentiert werden konnte;
- (3) Auftreten respiratorischer Symptome bei manchen Patienten mit einer Rotavirus-Gastroenteritis.

Zunächst war man der Überzeugung, dass unter natürlichen Bedingungen eine Übertragung von tierischen Rotaviren auf Menschen (oder umgekehrt) nicht vorkommt (Kapikian 1990). 1994 zeigten jedoch Shif et al., dass Säuglinge mit tierischen Rotaviren infiziert werden können. Ob in Serumproben gefundene Viren infektiös sind, wurde bis jetzt nicht bewiesen. Im Hinblick auf die Infektion bei Neugeborenen haben Zhong et al. (1997) die Möglichkeit einer perinatalen Infektion postuliert.

### 1.2.5 Diagnose und Nachweismethoden

Da die klinische Manifestation einer Rotavirusinfektion allein nicht ausreichend charakteristisch ist, erfordert die Diagnose den Nachweis des Virus bzw. des Antigens oder der serologischen Immunantwort.

Für den Nachweis von Rotaviren in Stuhlproben wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Anfangs wurde die Elektronenmikroskopie zur Detektion von Rotaviren eingesetzt. Sie hat aufgrund des charakteristischen morphologischen

## 1. Einleitung

---

Erscheinungsbildes der Viren den Vorteil hoher Spezifität und stellte lange Zeit den Goldstandard des Virusnachweises dar (Kapikian 1990). Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch ihre geringe Sensitivität, die Detektionsgrenze liegt bei  $10^6$  bis  $10^7$  Viruspartikeln pro Gramm Stuhl.

Die derzeit am weitesten verbreiteten diagnostischen Techniken zur Virusdetektion sind Latexagglutinationstests oder Enzym-linked immuno sorbent assays (ELISA). Bei letzteren liegt die untere Nachweisgrenze mit 100.000 Viruspartikeln pro Gramm Stuhl eine Zehnerpotenz niedriger als die der Elektronenmikroskopie.

Mittels der Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist theoretisch der Nachweis von Rotavirus in noch erheblich niedrigeren Konzentrationen möglich. Es wird eine im Vergleich zum ELISA 100-1000 mal höhere Sensitivität für die RT-PCR beschrieben (Wilde 1990, Husain 1995). Durch die RT-PCR ist auch der Nachweis von Rotaviren in Blut, Rachenabstrichen und Liquor möglich. Hauptsächlich angewendet wird die RT-PCR zur Bestimmung von G- und P-Serotypen der Rotaviren (Gouvea 1990, Gentsch 1992, Ushijima 1992).

Die Anzucht von Rotavirus in bestimmten Zellkulturen wie AGMK (African green monkey kidney), Vero, MA104 u.a. ist möglich, allerdings klinisch nicht sehr effizient (Johnston 1993).

### 1.3 Forschungshypothese

Viele Fragen zu nosokomialen Rotavirusinfektionen, speziell bei Früh- und Neugeborenen, sind ungeklärt. Dazu gehört die Inzidenz, vor allem im Hinblick auf asymptomatische Infektionsverläufe, sowie die Frage, ob die Inapparenz von Symptomen auf passiver Immunität durch mütterliche Antikörper, unter-

## 1. Einleitung

---

schiedlicher Virulenz verschiedener Rotavirus-Stämme oder auf bestimmten Eigenschaften des Wirts, also des Neugeborenen, beruht.

Ungeklärt sind weiterhin Fragen nach einer Korrelation der Virusausscheidung mit klinischen Symptomen oder dem Gestationsalter sowie nach der Häufigkeit komplizierter Verläufe (NEC). Schließlich ist bislang auch die Frage nach dem optimalen Test zum Infektionsnachweis bei Neugeborenen und Säuglingen noch offen. Die Anforderungen an einen solchen Test sind hier besonders hoch, weil die Diagnostik häufig im Rahmen von Umgebungsuntersuchungen bei Ausbruch nosokomialer Infektionen erfolgt, also bei asymptomatischen Patienten.

Im November 2002 wurde bei mehreren mit blutigen oder übelriechenden Stühlen symptomatischen Früh- und Neugeborenen, die in der Abteilung für Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen stationär behandelt wurden, Rotavirus-Antigen im Stuhl nachgewiesen. Im Rahmen anschließender Umgebungsuntersuchungen wurde entdeckt, dass auch asymptomatische Früh- und Neugeborene mit Rotavirus infiziert waren. Aufgrund dieser Beobachtung vermuteten wir eine höhere Prävalenz von Rotavirusinfektionen auf den Neonatalstationen als bisher angenommen.

Zudem wurde beobachtet, dass sich bei einigen Kindern in Wiederholungsuntersuchungen abwechselnd positive und negative Testergebnisse ergaben. Dies wurde auf eine zu geringe Sensitivität des Antigentests zurückgeführt.

Ausgehend von der Annahme, dass eine Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) eine höhere Sensitivität als der bislang übliche Enzymimmunoassay aufweist und damit zum Infektionsnachweis bzw. zum Ausschluss einer Infektiosität bei Neugeborenen besser geeignet ist, wurde diese Methode im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Universitätsklinikum Tübingen etabliert.

## 1. Einleitung

---

Darüber hinaus sollten folgende Fragen beantwortet werden: Gibt es charakteristische Symptome bei Neugeborenen mit einer Rotavirusinfektion? Wie lange scheiden Neugeborene das Virus aus? Besteht ein Zusammenhang mit der Entstehung einer nekrotisierenden Enterokolitis?

Um diese Hypothesen zu überprüfen und Antworten auf die oben genannten Fragen zu bekommen, wurden im Rahmen einer Maßnahme zur Qualitätssicherung prospektiv über 4 Monate regelmäßig Stuhluntersuchungen auf Rotavirus bei allen auf der neonatologischen Intensivbehandlungs- und Intensivüberwachungsstation des Universitätsklinikums Tübingen behandelten Patienten durchgeführt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Studienpopulation**

Im Untersuchungszeitraum wurden Stuhlproben von allen auf den Stationen Neo2 und Neo3 der Abteilung Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen behandelten Neu- und Frühgeborenen untersucht. Auf der Intensivbehandlungsstation (Station Neo3, 12 Betten) liegen vorwiegend extrem unreife Frühgeborene in Inkubatoren sowie beatmungs- oder sonst intensivtherapiepflichtige Neugeborene. Auf der Intensivüberwachungsstation (Station Neo2, 17 Betten) werden nicht mehr intensivtherapiepflichtige und/oder weniger unreife Frühgeborene sowie intensivüberwachungspflichtige Neugeborene betreut.

### **2.2 Studiendesign**

Die Studie wurde als prospektive Longitudinalstudie über einen Zeitraum von vier Monaten (01.01.2003 bis 30.04.2003) durchgeführt. Der Beginn ergab sich aus dem gehäuften Nachweis von Rotaviren im Rahmen der klinischen Überwachung (s.o.), das Ende aus epidemiologischen Daten, die einen Gipfel für das Auftreten von Rotavirusinfektionen in den Wintermonaten mit deutlichem Abfall der Inzidenz im April nachweisen (Sharma 2002, Johansen 1999, Koopmans 1999).

### **2.3 Studienablauf und Untersuchungsplan**

In zwei-wöchentlichem Abstand wurden Stuhlproben aller auf den genannten Stationen des Universitätsklinikums Tübingen behandelten reif- und frühgeborenen Patienten auf Rotaviren untersucht. Außerhalb der festgelegten Abnahmetermine wurden zusätzlich Stuhlproben von Patienten, bei denen der klinische Verdacht einer Rotavirusinfektion bestand, untersucht.

## 2. Material und Methoden

---

Neugeborene mit nachgewiesener Rotavirusinfektion wurden im Abstand von jeweils zwei Tagen wiederholt untersucht, bis in drei konsekutiven Stuhlproben keine Virusausscheidung mehr nachweisbar war.

Die Proben wurden jeweils mittels Enzymimmunoassay und RT-PCR getestet. Ein Patient galt als infiziert, wenn das Enzymimmunoassay und/oder die RT-PCR ein positives Ergebnis zeigten. Diese Entscheidung gründete auf Daten, die für beide Testverfahren - jedoch ohne diese miteinander zu vergleichen - eine ähnlich hohe Spezifität zeigten (Brandt 1981, Herrmann 1985, Gouvea 1990, Buesa 1996). Es konnte daher nicht a priori ein Goldstandard definiert werden.

Bei Nachweis von Rotaviren wurde die Station informiert und die von der Krankenhaushygiene vorgeschriebenen Maßnahmen wie Isolierung bzw. Kohortierung der infizierten Patienten, Handschuh- und Kittelpflege und gesondertes Entsorgen kontaminierter Ausscheidungen eingeleitet.

Zur Korrelation des Virusnachweises mit klinischen Symptomen wurden alle Patienten am Abnahmetag der Stuhlproben auf folgende Symptome hin untersucht:

### A. Gastrointestinale Symptome am Abnahmetag:

- Stuhlmenge (viel/wenig)
- Stuhlfrequenz in den letzten 24 Stunden(1-5 bzw.>5)
- Stuhlbeschaffenheit (geformt, breiig, schleimig, wässrig, zerhackt)
- Stuhl makroskopisch blutig (ja/nein)
- Stuhl mit auffälligem Geruch (ja/nein)
- Änderung des Körpergewichts in den letzten 24 Stunden (g)
- Serum-Elektrolyte in den letzten 24 Stunden (Na, Cl; mmol/l)

## 2. Material und Methoden

---

### B. Extra-gastrointestinale Symptome in den letzten 24 Stunden:

- Anzahl Bradykardien (<80/min; 0-6, 7-10, 11-15, >15)
- Anzahl Hypoxämien (<80%; 0-6, 7-10, 11-15, >15)
- Hautkolorit (rosig/marmoriert/blass/grau)
- Kapilläres Refill (<3s/≥3s)
- Nahrung (Muttermilch/Formula)
- Erbrechen (ja/nein)

### C. Komplikationen (z.B. NEC)

Diese Befunde wurden von den die Patienten betreuenden Pflegekräften und der Doktorandin in Unkenntnis des virologischen Ergebnisses dokumentiert.

## 2.4 Rotavirusidentifikation

### 2.4.1 Stuhlproben

Es wurden insgesamt 260 Stuhlproben von 123 Früh- und Neugeborenen, die in dem angegebenen Zeitraum auf den genannten Stationen (Neo2 und Neo3) behandelt wurden, mittels ELISA-Antigen-Test und RT-PCR untersucht. Die Proben wurden zunächst wenige Stunden auf der Station bei Raumtemperatur bis zum Transport ins Labor gelagert, wo sie bis zum Antigen-Test bei 4-8°C lagerten bzw. bis zur Virusisolierung und RT-PCR bei -80°C tiefgefroren wurden.

### 2.4.2 Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA, EIA)

Ein qualitativer Antigen-Nachweis von Rotavirus erfolgte mit dem Ridascreen Rotavirus Testpack, einem auf monoklonalen Antikörpern basierenden „Sandwich“-Enzymimmunoassay der Firma R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland). Dieser Test stellt zur Zeit in der Abteilung für Medizinische Virologie und Epi-

## 2. Material und Methoden

---

demioogie der Viruskrankheiten des Universitätsklinikums Tübingen das Routinerverfahren zum Nachweis von Rotavirus in humanen Stuhlproben bzw. zum Ausschluß einer Infektiosität dar.

### *Testprinzip:*

Auf eine Mikrotiterplatte, an deren Oberfläche ein monoklonaler Antikörper gegen ein gruppenspezifisches Antigen aller humanpathogenen Rotaviren (VP6) fixiert ist, wird zusammen mit der Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe ein weiterer monoklonaler Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, zur Inkubation pipettiert. Bei Anwesenheit von Rotaviren bildet sich ein Sandwich-Komplex aus dem immobilisierten Antikörper, dem Rotavirus-Antigen und dem konjugierten Antikörper. Nicht gebundene Enzym-markierte Antikörper werden in einem Waschschrift entfernt. Mittels eines Chromogens wird dann die kolorimetrische Indikatorreaktion durchgeführt. Die Extinktion (gemessen bei 450nm) ist proportional zur Menge des in der Probe vorhandenen Rotavirus-Antigens.

Es wird immer eine Positiv- und Negativkontrolle aus dem Testpack mitgeführt.

### 2.4.3 RT- PCR

#### *2.4.3.1 Probenaufbereitung*

In ein Eppendorffgefäß wird zu 1ml RNase-freiem Wasser eine kleine Menge der Stuhlprobe gegeben. Auf einem Vortex wird die Probe gründlich gemischt und anschließend für 3 Minuten bei 6000g zentrifugiert (Temperatur: 24 °C).

Der Überstand wird für die Virusisolierung genutzt.

#### *2.4.3.2 Virusextraktion/RNA-Isolierung*

Die Virusextraktion erfolgt mittels QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland).



## 2. Material und Methoden

---

Vorbereitung und Aufbereitung der Reagenzien wurden wie im Test-Handbuch beschrieben durchgeführt. Bei jedem Durchgang wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen mitgeführt.

### *Protokoll:*

1. In ein 1,5ml Reaktionsgefäß werden 600µl AVL-Buffer/Carrier-RNA-Lösung gegeben. Dazu werden 200µl des Probenüberstandes pipettiert. Die Probe wird 15 Sekunden auf einem Vortex gemischt, um eine effiziente Lyse zu erreichen.
2. Anschließend wird die Probe 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; danach sind die Viruspartikel vollständig lysiert. Längere Inkubationszeiten zeigen keinen Effekt auf die Menge oder Qualität der isolierten RNA.
3. Um Kreuzkontaminationen beim Öffnen der Gefäße zu vermeiden, wird kurz anzentrifugiert.
4. Zum Reaktionsansatz werden 600µl Ethanol (96-100%) pipettiert, es wird 15 Sekunden auf einem Vortex gemischt und wieder kurz anzentrifugiert.
5. 700µl dieser Lösung werden auf eine QIAamp Spinsäule gegeben und für 1 Minute bei 6000g zentrifugiert. Die QIAamp Spinsäule wird in ein sauberes 2ml Collection Tube überführt, das Filtrat wird verworfen.
6. Die QIAamp Spinsäule wird vorsichtig geöffnet und Schritt 5 wiederholt.
7. Nach vorsichtigem Öffnen wird 500µl Buffer AW1 auf die Spinsäule gegeben und für 1 Minute bei 6000g zentrifugiert. Die QIAamp Spinsäule wird in ein sauberes 2ml Collection Tube überführt, das Filtrat verworfen.

## 2. Material und Methoden

---

8. Nach Zugabe von 500ml Buffer AW2 wird ebenfalls für 1 Minute bei 6000g zentrifugiert, die Spinsäule in ein sauberes Collection Tube überführt und das Filtrat verworfen.
9. Die QIAamp Spinsäule (im sauberen Collection Tube) wird 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit trocken zentrifugiert und anschließend in ein sauberes 1,5ml Eppendorfgefäß gesetzt.
10. Nach Zugabe von 50µl Buffer AVE und Inkubation von 1 Minute wird 3 Minuten bei 6000g zentrifugiert, um die virale RNA von der Spinsäule zu eluieren.

Dem QIAamp Viral RNA Mini Kit Handbuch zufolge ist die virale RNA bei –20 bis –70 °C bis zu einem Jahr stabil.

### *2.4.3.3 RT-PCR*

Die RT-PCR wird mit Hilfe eines QIAgen OneStep RT-PCR Kits durchgeführt.

#### *Protokoll:*

1. Auftauen von 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, Q-Solution, dNTP-Mix, Primern, RNase-freiem Wasser und eventuell eingefrorener viraler RNA.  
Die Lösungen vor Gebrauch gründlich mischen, um lokale Konzentrationsunterschiede der Salze, die den Lösungen beigefügt sind, zu vermeiden.
2. Herstellen des Master-Mixes:  
Die Herstellung des Master-Mixes erfolgt nach dem von QIAGEN beigefügten Protokoll. Die variablen Parameter wurden ausgetestet und optimiert.

## 2. Material und Methoden

---

### *Pipettierschema für die OneStep RT-PCR mit Q-Solution\**

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| RNase- freies Wasser:            | 15µl  |
| 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer: | 10µl  |
| Q-Solution:                      | 10µl  |
| dNTP-Mix (je 10mM/dNTP):         | 2µl   |
| Primer 1:                        | 0,5µl |
| Primer 2:                        | 0,5µl |
| OneStep RT-PCR Enzyme Mix        | 2µl** |
| Virale RNA:                      | 10µl  |

\*Q-Solution ist ein Zusatz, der die Amplifikation durch Modifizieren des Schmelzverhaltens der RNA erleichtert.

\*\*Der QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix wurde erst nach Erhitzen des Ansatzes (95°C für 10 Minuten) hinzupipettiert.

Das Gesamtvolumen eines Master-Mix-Ansatzes, inkl. hinzugefügter viraler RNA, beträgt nach Originalprotokoll 50µl.

Zu den Primern:

Jedes der 11 Gensegmente besitzt sowohl am 3' als auch am 5' Ende dieselben Sequenzen; diese kommen bei allen Rotavirusstämmen vor.

Gouvea et al. (1990) synthetisierten, komplementär zu den 3' Enden beider viralen RNA-Stränge, spezifische Oligonukleotidprimer für das Gensegment 9, welches für das Oberflächenprotein VP7 kodiert. Diese Primer, Beg9 und End9, die 28 bzw. 27 Nukleotide lang sind, produzieren Kopien der gesamten Länge des Gensegments 9 von jedem Rotavirusstamm der Gruppe A.

## 2. Material und Methoden

---

Die Sequenzen der Primer sind:

Beg9, 5'> GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG <3';

End9, 5'> GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG <3'.

Ein zweites Primerpaar, das Kopien des Gens 4, welches für das Protein VP4 kodiert, produziert, wurde von Gentsch (1992) und Lee (2001) beschrieben. Diese Primer, Con2 und Con3m, weisen folgende Nukleotidpositionen und Sequenzen auf:

Con2, 5'> ATTCGGACCATTATAACC <3';

Con3m, 5'>TGGCTTCGCTCATTATAGACA <3'.

Alle Probenbestimmungen durch die RT-PCR wurden mit beiden Primerpaaren durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

---

### *Thermocycler- Programm:*

|                                     |       |            |
|-------------------------------------|-------|------------|
| Reverse Transkription:              | 50 °C | 30 Minuten |
| Initialer PCR- Aktivierungsschritt: | 95 °C | 15 Minuten |

### 3-Schritt-Zyklus:

|                |       |             |
|----------------|-------|-------------|
| Denaturierung: | 94 °C | 1 Minute    |
| Annealing:     | 42 °C | 30 Sekunden |
| Extension:     | 72 °C | 1 Minute    |

Zyklenzahl: 40

|                          |       |            |
|--------------------------|-------|------------|
| Abschließende Extension: | 72 °C | 10 Minuten |
|--------------------------|-------|------------|

4 °C forever

Dem Handbuch des Herstellers zufolge können die Proben nach der Amplifikation bei 2-8 °C über Nacht oder bei -20 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

### *2.4.3.4 Analyse auf Agarosegel*

Die Amplifikate werden mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Als günstig hat sich ein 0,75%iges Agarosegel erwiesen. Die Laufzeit des Gels beträgt 60 Minuten bei 90V. Dann wird unter UV-Licht fotografiert.

Als Marker werden DNA Molekulargewichtsmarker VI (154-2176 Basenpaare) und VIII (19-1114 Basenpaare) benutzt. Die Markerkonzentration liegt laut Hersteller bei 0,25µg/µl, die Marker wurden 1:3 verdünnt.

## 2. Material und Methoden

---

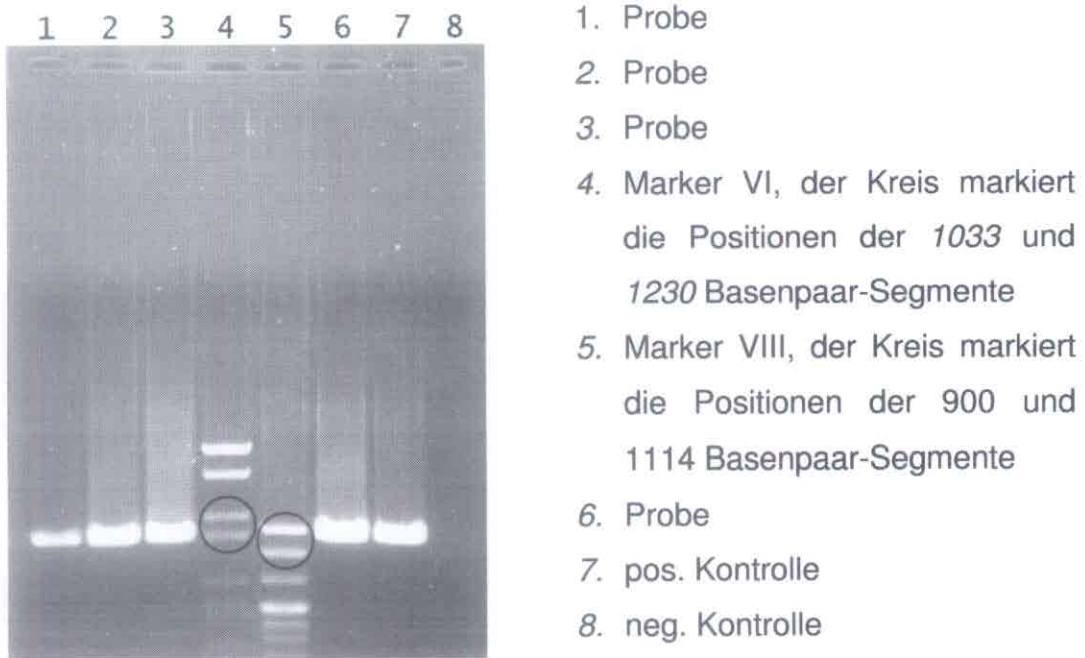


Abb. 1: RT-PCR. Amplifikationsprodukte analysiert durch Gelelektrophorese. Verwendet wurde das Primerpaar Beg9|End9, welches Segmente von 1062 Basenpaaren produziert.

### **2.5 Statistische Auswertung**

Die bei den infizierten und nicht infizierten Kindern erhobenen Daten wurden mittels Fisher Exakt- bzw. Chi<sup>2</sup>-Test auf Unterschiede hin überprüft.

P < 0,05 wurde als signifikant betrachtet.

### **2.6 Ethische Aspekte**

In der vorliegenden Studie wurden Stuhlproben von Früh- und Neugeborenen untersucht. Ziel war es, die Prävalenz von Rotavirusinfektionen nachzuweisen und die damit einhergehenden Symptome der Patienten zu dokumentieren. Diese Untersuchung diente der Qualitätssicherung. Nach Auskunft der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen erfordert eine derartige Untersuchung weder ein Ethikvotum noch eine elterliche Einwilligung.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Prävalenz von Rotavirus in der prospektiven Longitudinalstudie

Im Zeitraum vom 01.01.2003 bis zum 30.04.2003 wurden Stuhlproben von 123 Patienten der neonatologischen Intensivbehandlungs- bzw. Intensivüberwachungsstation des Universitätsklinikums Tübingen untersucht. 90 Patienten waren Frühgeborene mit einem mittleren Gestationsalter von 31,2 Schwangerschaftswochen (24 1/7 bis 36 5/7) und einem Alter zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung von 15,5 Tagen (1 bis 91 Tage); die übrigen 33 Kinder waren reifgeborene Säuglinge. Ausgeschlossen wurden Patienten, die nur einen oder wenige Tage auf den Stationen lagen und so nicht durch das 2-wöchentliche Screening erfasst wurden; keines dieser Kinder zeigte Symptome einer möglichen Virusinfektion.

Bei 28 Kindern konnte mit einem der beiden eingesetzten Nachweisverfahren Rotavirus im Stuhl nachgewiesen werden; dies entspricht einer Prävalenz von 22,8%. 23 Patienten (82%) waren Frühgeborene mit einem durchschnittlichen Gestationsalter von 28,9 (24 1/7 bis 36 4/7) Schwangerschaftswochen. Die 5 reifen Neugeborenen hatten ein durchschnittliches Gestationsalter von 38,5 (37 bis 41 2/7) Schwangerschaftswochen.

Eine Auswertung der Daten getrennt nach den beiden Stationen, auf denen die Patienten behandelt wurden, ergab folgende Ergebnisse:

- Auf der Intensiv-Überwachungsstation (Neo2) wurde bei 9 von 69 Patienten (davon 4 Reifgeborene) Rotavirus im Stuhl nachgewiesen. Das entspricht 13% der untersuchten Patienten auf dieser Station bzw. einer Infektionsrate von 0,52 pro 100 Behandlungstage.



### 3. Ergebnisse

---

- Auf der Intensiv-Behandlungsstation (Neo3) konnte im gleichen Zeitraum bei 19 von 54 Patienten eine Rotavirusinfektion nachgewiesen werden. Dies entspricht 35% der untersuchten Patienten bzw. einer Infektionsrate von 1,41 pro 100 Behandlungstage.

Der Unterschied in der Prävalenz zwischen diesen beiden Stationen war statistisch signifikant ( $p < 0,035$ ; Chi<sup>2</sup>-Test).

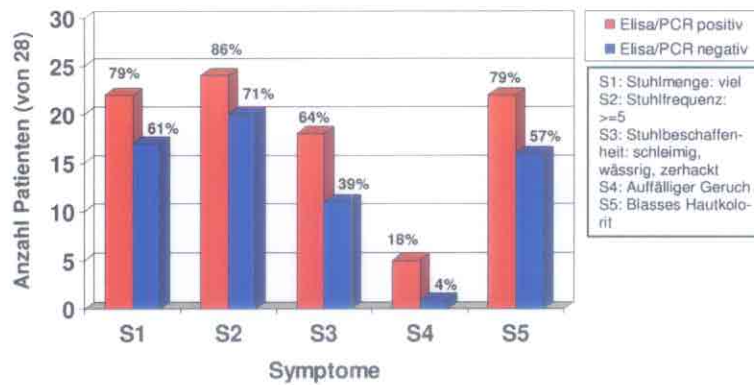
Die Infektionsrate pro 100 Behandlungstage war bei den Frühgeborenen mit 1,04 höher als bei den reifen Neugeborenen (0,6).

#### **3.2 Korrelation mit klinischen Symptomen**

Die am häufigsten beobachteten Symptome bei Rotavirusnachweis waren eine als „groß“ bezeichnete Stuhlmenge (bei 79% der Patienten mit Rotavirusnachweis an diesem Tag) und eine hohe Stuhlfrequenz, d.h.  $\geq 5$  Stühle pro Tag (bei 86%), sowie schleimige, wässrig-zerhackte Stühle (bei 64%). Allerdings unterschieden sich die Häufigkeitsangaben für diese Parameter bei den infizierten Kindern nicht signifikant von denen ohne Infektion. Bei diesen lagen die entsprechenden Häufigkeitsangaben bei 61, 71 bzw. 39%.

18% der infizierten und 4% der nicht infizierten Kinder setzten Stühle mit auffälligem Geruch ab. Ein blasses Hautkolorit wiesen 79% der infizierten und 57% der nicht infizierten Kinder auf. Auch diese Unterschiede waren nicht signifikant.

### 3. Ergebnisse



(Patientenmatching nach Gestationsalter)

Abb. 2: Klinische Symptome bei infizierten und nicht infizierten Kindern

| Symptome                            | Infizierte Kinder (n=28) | Nicht infizierte Kinder (n=28) | P (< 0,05: signifikant) |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| „große“ Stuhlmenge                  | 22 (79%)                 | 17 (61%)                       | 0,12                    |
| ≥ 5 Stühle/Tag                      | 24 (86%)                 | 20 (71%)                       | 0,16                    |
| Schleimig, wässrig-zerhackte Stühle | 18 (64%)                 | 11 (39%)                       | 0,05                    |
| Stuhl mit auffälligem Geruch        | 5 (18%)                  | 1 (4%)                         | 0,09                    |
| Blasses Hautkolorit                 | 22 (79%)                 | 16 (57%)                       | 0,06                    |

Tab. 1: Klinische Symptome bei infizierten und nicht infizierten Kindern

### 3. Ergebnisse

---

Hinsichtlich der Daten für Serum-Elektrolyte, Zeichen einer schweren Dehydratation oder des Gewichtsverlaufs unterschieden sich die mit Rotavirus infizierten Neugeborenen gleichfalls nicht von denen ohne Infektion.

Wurden nur die Symptome der mittels des ELISA als infiziert erkannten Patienten mit den Symptomen der nicht infizierten verglichen, fand man bei ersteren signifikant häufiger schleimig, wässrig-zerhackte Stühle ( $p < 0,003$ ) und ein blaßes Hautkolorit ( $p < 0,003$ ).

Der Anteil Muttermilch-ernährter Kinder unter den 28 infizierten Neugeborenen war mit 36% niedriger als der unter den nicht infizierten Kindern (68%,  $p < 0,02$ ).

#### **3.3 Klinische Symptome bei Früh- vs. Reifgeborenen**

Ein Vergleich der infizierten Frühgeborenen mit den infizierten reifen Neugeborenen ergab folgende Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild:

Wässrig-zerhackte Stühle waren häufiger bei Reifgeborenen zu beobachten (40% vs. 30%), während blutige Stühle (4%) und Erbrechen (13%) nur bei Frühgeborenen gefunden wurde. Auch diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Im Studienzeitraum entwickelte ein Frühgeborenes eine NEC, an deren Diagnosetag Rotavirus im Stuhl des Patienten nachgewiesen werden konnte.

#### **3.4 Beginn/Nachweis und Dauer der Virusausscheidung**

Bei einem Kind wurde bereits am zweiten Lebenstag Rotavirus im Stuhl nachgewiesen. Bei fünf Kindern konnte in Stuhlproben, die am dritten und vierten Lebenstag gesammelt worden waren, eine Rotavirusinfektion nachgewiesen werden.

### 3. Ergebnisse

---

Bei drei Kindern wurde Rotavirus (mittels Enzymimmunoassay) im Mekonium nachgewiesen, wobei ein Neugeborenes dieses erst am sechsten Tag abgesetzt hatte.

Bei 9 der 28 infizierten Patienten konnte Rotavirus nach bekannt gewordener Infektion erneut nachgewiesen werden, bei 5 Kindern sogar über einen Zeitraum von 1-5 Wochen. Ein Frühgeborenes der 27. Schwangerschaftswoche, das einen Monat lang Rotavirus ausschied, zeigte nach einem Intervall von 5 Wochen ohne Virusnachweis erneut eine Ausscheidung der Viren im Stuhl. 8 der 9 Patienten, die Rotaviren über einen längeren Zeitraum ausschieden, waren Frühgeborene. Hinsichtlich ihrer Symptome unterschieden sich die 9 Kinder nicht von den Patienten, bei denen nur eine einmalige Virusausscheidung nachgewiesen wurde.

#### **3.5 Vergleich ELISA-Antigen-Test mit RT-PCR**

In 42 Stuhlproben von 28 Neugeborenen wurde mit mindestens einem der beiden eingesetzten Testverfahren Rotavirus nachgewiesen. 25 dieser Proben waren im ELISA-Antigen-Test positiv (59,5%), 21 (50%) in der RT-PCR; d.h. nur 4 von 42 Proben (9,5%) zeigten in beiden Nachweisverfahren ein positives Testergebnis.

Die Ergebnisse der beiden Testverfahren sind in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt. Auf der Intensiv-Behandlungsstation (Neo3) waren 35 der 54 Neugeborenen sowohl im Antigen-Test als auch in der RT-PCR negativ, 3 waren in beiden Nachweisverfahren positiv, 5 nur in der RT-PCR und 11 nur im Antigen-Test. Auf der Intensiv-Überwachungsstation (Neo2) waren 60 von 69 Neugeborenen in beiden Testverfahren negativ, 4 waren nur in der RT-PCR und 5 nur im Antigen-Test positiv.

### 3. Ergebnisse

---

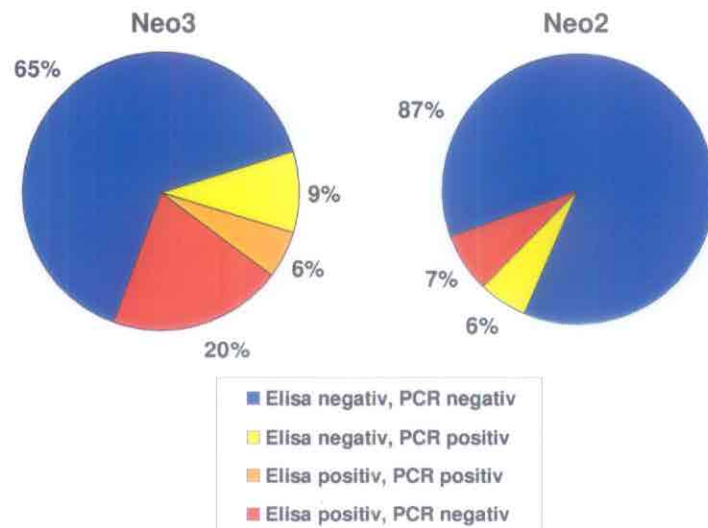


Abb. 3 und Abb. 4: Ergebnisse der Testverfahren auf der Intensivbehandlungsstation (Neo3) und der Intensivüberwachungsstation (Neo2)

Einen Überblick zu den jeweiligen Testergebnissen der einzelnen Proben, mit Angabe der Optischen Dichte (OD) der ELISA-Ergebnisse sowie getrennter Auflistung der PCR-Ergebnisse (bezüglich der verwendeten Primer) gibt Tabelle 2. Es fällt auf, dass - abgesehen von den 4 Proben, die in beiden Verfahren positiv getestet wurden und den 7 Proben, bei denen kein Material für die Durchführung einer RT-PCR zur Verfügung stand - alle Proben mit hoher OD im Antigen-Test ein negatives Testergebnis in der RT-PCR zeigten. Alle Proben mit niedriger OD wurden in der RT-PCR positiv getestet.

### 3. Ergebnisse

| 1-28<br>a, b, c, d<br>OD |            | Patienten<br>unterschiedliche Proben / Patient<br>optische Dichte |          | B<br>C    | Primer Beg9/End9<br>Primer Con2/Con3m |               |
|--------------------------|------------|---|----------|-----------|---------------------------------------|---------------|
| Geb.datum                | Entnahme   | ELISA   | OD/ELISA | RT-PCR, B |                                       | RT-PCR, C     |
| 1                        | 16.12.2002 | 02.01.2003  | positiv  | 0,633     | negativ                               | negativ       |
| 2a                       | 02.10.2002 | 01.01.2003  | positiv  | out       | negativ                               | negativ       |
| 3                        | 06.11.2002 | 01.01.2003  | negativ  | -0,002    | positiv                               | negativ       |
| 4                        | 31.12.2002 | 02.01.2003  | negativ  | 0         | positiv                               | negativ       |
| 5                        | 13.01.2003 | 20.01.2003  | negativ  | 0,001     | positiv                               | negativ       |
| 2b                       | 02.10.2002 | 20.01.2003  | positiv  | 0,287     | negativ                               | negativ       |
| 6                        | 14.01.2003 | 20.01.2003  | negativ  | 0,014     | positiv                               | positiv       |
| 2c                       | 02.10.2002 | 27.01.2003  | negativ  | -0,001    | positiv                               | negativ       |
| 7                        | 21.01.2003 | 22.01.2003  | positiv  | 0,234     | kein Material                         | kein Material |
| 8                        | 02.01.2003 | 03.02.2003  | negativ  | 0         | positiv                               | negativ       |
| 9a                       | 23.12.2002 | 04.02.2003  | negativ  | -0,002    | positiv                               | positiv       |
| 10                       | 24.01.2003 | 04.02.2003  | negativ  | -0,001    | positiv                               | positiv       |
| 9b                       | 23.12.2002 | 15.02.2003  | negativ  | -0,001    | positiv                               | negativ       |
| 11a                      | 21.10.2002 | 18.02.2003  | positiv  | 0,205     | kein Material                         | kein Material |
| 11b                      | 21.10.2002 | 20.02.2003  | negativ  | 0,007     | positiv                               | negativ       |
| 12                       | 14.02.2003 | 03.03.2003  | negativ  | -0,002    | negativ                               | positiv       |
| 2d                       | 02.10.2002 | 03.03.2003  | negativ  | 0,029     | negativ                               | positiv       |
| 13a                      | 22.02.2003 | 03.03.2003  | positiv  | 0,317     | negativ                               | negativ       |
| 14a                      | 20.01.2003 | 03.03.2003  | positiv  | 0,466     | negativ                               | negativ       |
| 15                       | 26.02.2003 | 04.03.2003  | positiv  | 0,174     | negativ                               | negativ       |
| 13b                      | 22.02.2002 | 04.03.2003  | positiv  | 0,655     | negativ                               | negativ       |
| 14b                      | 20.01.2003 | 09.03.2003  | positiv  | 0,818     | negativ                               | negativ       |
| 16                       | 04.03.2003 | 07.03.2003  | positiv  | 0,731     | kein Material                         | kein Material |
| 17                       | 11.03.2003 | 14.03.2003  | positiv  | 0,188     | kein Material                         | kein Material |
| 18a                      | 10.02.2003 | 17.03.2003  | negativ  | 0,004     | positiv                               | negativ       |
| 19a                      | 04.03.2003 | 17.03.2003  | positiv  | 0,489     | negativ                               | negativ       |
| 19b                      | 04.03.2003 | 18.03.2003  | negativ  | 0         | positiv                               | positiv       |
| 20a                      | 03.03.2003 | 18.03.2003  | positiv  | 0,205     | negativ                               | negativ       |
| 20b                      | 03.03.2003 | 31.03.2003  | positiv  | 0,478     | positiv                               | positiv       |
| 21                       | 28.03.2003 | 01.04.2003  | positiv  | 0,34      | negativ                               | negativ       |
| 22                       | 11.02.2003 | 01.04.2003  | positiv  | 0,629     | negativ                               | negativ       |
| 23                       | 25.03.2003 | 12.04.2003  | positiv  | 0,568     | positiv                               | positiv       |
| 18b                      | 10.02.2003 | 14.04.2003  | positiv  | 0,186     | positiv                               | positiv       |
| 18c                      | 10.02.2003 | 22.04.2003  | negativ  | -0,001    | positiv                               | positiv       |
| 24                       | 11.01.2003 | 14.04.2003  | positiv  | 0,569     | kein Material                         | kein Material |
| 20c                      | 03.03.2003 | 15.04.2003  | positiv  | 0,658     | positiv                               | positiv       |
| 20d                      | 03.03.2003 | 19.04.2003  | negativ  | 0,037     | positiv                               | negativ       |
| 25                       | 22.04.2003 | 25.04.2003  | positiv  | 0,34      | negativ                               | negativ       |
| 26                       | 20.04.2003 | 28.04.2003  | negativ  | -0,002    | positiv                               | negativ       |
| 27a                      | 25.04.2003 | 29.04.2003  | positiv  | 0,828     | kein Material                         | kein Material |
| 27b                      | 25.04.2003 | 02.05.2003  | positiv  | 0,531     | kein Material                         | kein Material |
| 28                       | 02.05.2003 | 05.05.2003  | positiv  | 0,7       | negativ                               | negativ       |

Tab. 2: Primärdaten

### 4. Diskussion

#### 4.1 Nachweisverfahren für Rotaviren: ELISA und RT-PCR

Auffälligstes Ergebnis der hier vorgelegten Untersuchung ist die geringe Übereinstimmung zwischen den mittels ELISA-Antigen-Test und den mit der RT-PCR gewonnenen Ergebnissen. Wie ist dies zu erklären?

Zur Detektion von Rotaviren wurde in der Vergangenheit zunächst die Elektronenmikroskopie (EM) eingesetzt. Aufgrund des charakteristischen morphologischen Erscheinungsbildes der Viren bietet diese den Vorteil einer hohen Spezifität. Sie galt deshalb lange als Goldstandard in der Diagnose von Rotavirusinfektionen (Kapikian 1990). Allerdings sind vergleichsweise große Virusmengen erforderlich (Detektionsgrenze:  $10^6$  bis  $10^7$  Viruspartikel), um mittels dieser Methode einen Virusnachweis führen zu können (Steinhoff 1980). Da aber andererseits schon 10 Viruspartikel als Infektionsdosis genügen (Ward 1986) und asymptomatische wie milde Infektionen bei Neugeborenen mit einer geringen Virusausscheidung korrelieren (im Gegensatz zu ernststen Durchfallerkrankungen bei älteren Kindern, die Rotaviren dann in höheren Konzentrationen ausscheiden; Bryden 1982), erscheint diese Methode zumindest für Screening-Untersuchungen bei Neugeborenen nicht geeignet.

Als Methode der Wahl zum Nachweis einer Infektion bzw. zum Ausschluss einer Infektiosität gilt derzeit ein Enzymimmunoassay, das auf monoklonalen Antikörpern basiert (Hoshino 1994). Herrmann et al. (1985), die Stuhlproben von Neugeborenen, Säuglingen und Erwachsenen testeten und die Ergebnisse des ELISA mit denen der Elektronenmikroskopie als Goldstandard verglichen, fanden eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 97% für den ELISA-Antigen-Test. Auch Brandt et al. (1981) und Dennehy et al. (1990) beurteilten den ELISA gegenüber der EM als deutlich sensitiver und damit für Screening-Untersuchungen als ideal geeignet. Für den von uns in dieser Studie verwen-



#### 4. Diskussion

---

deten ELISA der Firma R-Biopharm dokumentierten Eing et al. (2001) eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 99,7%.

Mit der Einführung der RT-PCR zeigte sich jedoch, dass die Sensitivität des ELISA möglicherweise nicht so hoch ist, wie dies im Vergleich zur Elektronenmikroskopie zunächst schien. Nach mündlicher Auskunft des nationalen Referenzlabors für Rotavirus in Frankfurt (PD Dr. Stürmer, November 2002) liegt die untere Nachweisgrenze des EIA bei 100.000 Viruspartikeln pro Gramm Stuhl und ist damit nur eine Zehner-Potenz niedriger als die der Elektronenmikroskopie. Zudem wurden für den ELISA-Test auch wiederholt falsch positive Ergebnisse beschrieben (Frühwirth 2000, Linhares 2002). Brandt et al. (1981) fanden in ihrer Untersuchung sogar 73% falsch positive ELISA-Ergebnisse, v.a. in Proben von Patienten einer neonatologischen Intensivstation. Sie vermuteten ein unspezifisches Binden der Rotavirus-Antikörper an Bakterien oder Bakterien-Produkte (Protein A von *Staphylococcus aureus*).

Die RT-PCR ist, verglichen mit Enzymimmunoassays, einigen Arbeiten zufolge eine sehr sensitive Nachweismethode (Masendycz 1997, Coulson 1999, Gunson 2003). In Verdünnungsreihen lässt sich mittels RT-PCR Rotavirus bereits in um 2 und 3 Zehnerpotenzen niedrigeren Konzentrationen nachweisen als mit dem ELISA-Antigen-Test oder der Elektronenmikroskopie (Wilde 1991, Buesa 1996). Doch wird in der Praxis häufig *keine* wesentlich höhere Sensitivität für die RT-PCR im Vergleich zum EIA beschrieben (Gouvea 1990, Ushijima 1992, Buesa 1996). Manche Autoren empfehlen daher die Durchführung einer nested oder semi-nested PCR zur Verbesserung der Sensitivität des Rotavirusnachweises (Gouvea 1990, Gentsch 1992).

Bishop et al. (1996) schlagen den Nachweis von IgA Anti-Rotavirus-Antikörpern im Stuhl als ein sensibles Verfahren zum Infektionsnachweis vor.

Ein großer Vorteil der PCR ist in jedem Fall der mögliche Nachweis von Rotavirus-RNA in Blut, Rachenabstrichen und Liquor. Somit besteht die Möglichkeit, wei-



## 4. Diskussion

---

tere Mechanismen zur Transmission dieser Viren und ihrer Pathogenese zu erforschen.

Die vorliegende Studie ging von einer hohen Sensitivität der RT-PCR aus und wollte diese Methode als Goldstandard einführen und mit dem ELISA vergleichen. Die Ergebnisse waren überraschend. Nur 9,5% der Proben waren in beiden Nachweisverfahren positiv. Allerdings war von 7 Proben, die im ELISA einen positiven Befund gezeigt hatten, kein Material mehr zur Durchführung einer RT-PCR vorhanden. Möglicherweise sind die Ergebnisse bezüglich der Übereinstimmung der beiden Testverfahren insofern falsch schlecht. Die stets mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen zeigten jeweils durchgehend adäquate Ergebnisse, so dass methodische Probleme im Zusammenhang mit der Testdurchführung ausgeschlossen werden können.

Für falsch negative RT-PCR- Ergebnisse kommen verschiedenen Ursachen in Frage. Zum einen ist RNA weniger stabil als DNA. Zum anderen gibt es viele Faktoren, die Nukleinsäuren abbauen oder enzymatische Reaktionen, die in Amplifikationsverfahren genutzt werden, hemmen. Z.B. können Reverse Transcriptase(RT)-Enzyme, die RNA vor der DNA-Amplifikation in DNA „umschreiben“ müssen, durch interferierende Substanzen gehemmt werden. Auch kann die doppelsträngige Struktur der Rotavirus-RNA zur Reduktion der Effizienz der RT-Reaktion beitragen (Wilde 1990). Schließlich wurden wiederholt durch zersetzende Agentien im Stuhl verursachte hemmende Prozesse beschrieben (Wilde 1990, Buesa 1996).

Des Weiteren könnten falsch negative RT-PCR- Ergebnisse Folge eines Einfrierens der Proben oder eines zu langen Lagerns bei Raumtemperatur sein. Wie lange die Proben nach Abnahme bis zu Testbeginn bei Raumtemperatur lagerten, ließ sich aus logistischen Gründen in dieser Erhebung nicht exakt festlegen bzw. im Nachhinein feststellen. Weiterhin war aufgrund der sich durch die klinische Situation sehr kurzfristig ergebenden Notwendigkeit einer Etablierung der RT-PCR ein vorübergehendes Einfrieren von Proben unvermeidbar.

## 4. Diskussion

---

Studien zu einem möglichen Effekt des Einfrierens auf die Rotavirus-RNA-Isolierung aus Stuhlproben liegen nicht vor. Sebire et al. (1998) untersuchten die Stabilität von Human Immunodeficiency Virus (HIV)-RNA in Blutproben und fanden eine statistisch signifikant geringere Anzahl an RNA-Kopien nach einem Einfrieren der Proben bei  $-70^{\circ}\text{C}$  über 5 Monate. Die Anzahl an HIV-RNA-Kopien bei Lagerung der Proben bei Raumtemperatur sowie bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zu 72 Stunden nach Probenabnahme blieb unverändert. Die Autoren untersuchten jedoch Blut bzw. Blutplasma, so dass ein Vergleich zur vorliegenden Untersuchung nur bedingt möglich ist.

Es wäre zu untersuchen, welche Auswirkungen auf den Nachweis von Rotavirus-RNA das Lagern von Stuhlproben bei Raumtemperatur bzw. das Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  hat.

Bei unseren Ergebnissen ist auffällig, dass (1) Proben mit hoher Optischer Dichte (d.h. „stark positiv“) im ELISA negativ in der RT-PCR getestet wurden und (2) Proben mit niedriger OD ein positives RT-PCR-Ergebnis zeigten. Geht man davon aus, dass die Optische Dichte mit der Menge an Virus korreliert (d.h. eine hohe OD entspricht einer großen Virusmenge), könnte man im 2. Fall der RT-PCR eine hohe Sensitivität zuschreiben. Eine geringe Spezifität des ELISA könnte den 1. Fall erklären: Der Antigen-Test erkennt möglicherweise nicht nur Rotavirus-Antigen, sondern auch andere Proteine.

Daraus folgt jedoch nicht zwingend, dass die Ergebnisse des Antigen-Tests oder der RT-PCR als falsch positiv/falsch negativ ausgelegt werden können.

Auch wenn die genaue Ursache der hier erhobenen diskrepanten Ergebnisse für RT-PCR und ELISA unklar bleibt, kann aufgrund dieser Daten und des vorstehenden skizzierten Wissensstandes die RT-PCR derzeit nicht als Goldstandard angesehen werden.

Deshalb werden in der weiteren Diskussion die mittels beider Testverfahren erhaltenen Daten mit jenen verglichen, die allein durch den bislang als Routinemethode geltenden ELISA erzielt wurden.

## 4. Diskussion

### 4.2 Prävalenz

Die Prävalenz von Rotavirusinfektionen (22,8%) auf den beiden untersuchten Neonatalstationen des Universitätsklinikums Tübingen bewegt sich im Rahmen anderer auf Neugeborenenintensivbehandlungs- und -überwachungsstationen nachgewiesener Prävalenzen (Rocchi 1981, Rodriguez 1982, Sharma 2002). Es wurden sowohl niedrigere (Van Renterghem 1980, Santosham 1982, Trudd 1984) als auch höhere (Cameron 1978, Harris 1983, Dearlove 1983, Rotbart 1988) Infektionsraten beschrieben. Bei der Interpretation dieser Daten müssen immer die Studienbedingungen wie Länge des Untersuchungszeitraums, Intervall der Probenabnahme, Einschluss asymptomatischer Patienten und die zum Virusnachweis eingesetzte Methode berücksichtigt werden.

| EM: Elektronenmikroskopie                |                       | NICU: Neonatal Intensive Care Unit |         |                    |           |           |
|--|-----------------------|------------------------------------|---------|--------------------|-----------|-----------|
| IEM: Immun-Elektronenmikroskopie         |                       | SPN: Special-care Nursery          |         |                    |           |           |
| ELISA: Enzym-linked immuno sorbent assay |                       |                                    |         |                    |           |           |
| * bei symptomatischen Patienten          |                       |                                    |         | k.A.: keine Angabe |           |           |
| Studie                                   | Zeitraum              | Methode                            | Setting | Intervall          | Patienten | Prävalenz |
| Rocchi                                   | Jan-Mai               | EM                                 | SPN     | 1-2/Woche          | 77        | 23,4%     |
| Rodriguez                                | Nov-Mai               | ELISA, EM                          | SPN     | 2x/Woche           | 102       | 22%       |
| Sharma                                   | Nov                   | IEM                                | NICU    | 1x/Woche           | 65        | 18,4%     |
| Van Renterghem                           | Jan-Dez               | EM, Kultur                         | SPN     | 14 tgl.            | 199       | 6,6%      |
| Santosham                                | Aug-Juli              | ELISA                              | SPN     | 1x/Woche           | 1025      | 1,3%      |
| Trudd                                    | Aug '81 –<br>Dez '82  | ELISA                              | NICU    | 1x/Woche           | 170       | 2,9%      |
| Cameron                                  | Apr '75 –<br>Juni '76 | EM                                 | SPN     | Wenn<br>sympt.     | 238       | *53%      |
| Harris                                   | 2 Wochen              | ELISA                              | SPN     | k.A.               | k.A.      | 38-60%    |
| Dearlove                                 | Jan-Dez               | ELISA                              | SPN     | 1x/Woche           | 196       | 38,8%     |
| Rotbart                                  | 18 Wochen             | ELISA                              | NICU    | 1x/Woche           | 162       | *73%      |

Tabelle 3: Studiendaten

## 4. Diskussion

---

Aufgrund der Diskrepanz zwischen ELISA- und RT-PCR- Ergebnissen in unserer Studie und der fehlenden Möglichkeit, diese Nachweisverfahren mit einer Referenzmethode zu vergleichen, können die in dieser Studie erhobenen Daten bezüglich der Prävalenz nur mit großer Zurückhaltung interpretiert werden.

Bislang galt der ELISA-Antigen-Test als Routineverfahren für den Nachweis einer Rotavirusinfektion. Betrachtet man nur die mittels dieses Tests erhaltenen Ergebnisse, ergibt sich eine Prävalenz von 15,4%. Diese Zahl stellt den Minimalwert für die in dieser Untersuchung beobachtete Prävalenz dar.

Da die Ergebnisse des sofort nach Probeneingang durchgeführten ELISA- Antigen-Tests dem behandelnden Personal mitgeteilt und bei positivem Befund entsprechende Hygienemaßnahmen eingeleitet wurden, konnte eine weitere Ausbreitung des Virus in einigen Fällen vermutlich verhindert werden. Andererseits konnte sich das Virus möglicherweise über die Patienten ausbreiten, die erst im Nachhinein in der RT-PCR als infiziert erkannt wurden, innerhalb des Studienzeitraums also nicht als infektiös galten. Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Studie keine Proben von entlassenen Kindern untersucht. Möglicherweise sind hier weitere nosokomiale Infektionen nicht erkannt worden. Gianino et al., die in einer Studie auch Proben von Kindern 72 Stunden nach deren Entlassung untersuchten, fanden dabei eine Inzidenz von 15,9 %. Auch durch das Screening-Intervall von zwei Wochen können kurze Episoden einer Virusausscheidung in unserer Studie nicht erkannt worden sein.

Zur Häufigkeit nosokomialer Rotavirusinfektionen im Jahresmittel können in dieser Studie keine Angaben gemacht werden, da sie auf die Monate Januar bis April beschränkt war. In der Literatur ist ein häufigeres Auftreten von Rotavirusinfektionen in den Wintermonaten beschrieben, was zu der von uns beobachteten, vergleichsweise hohen Prävalenz passen würde.

Es wurden unterschiedliche Prävalenzen von Rotavirusinfektionen auf der Intensivbehandlungsstation (35%) im Vergleich zur Intensivüberwachungsstation (13%) gefunden. Geht man nur von den Ergebnissen des Antigen-Tests oder der RT-PCR aus, ist dieselbe Tendenz abzusehen: Die Prävalenz auf der Intensivbehandlungsstation (26% bzw. 15%) war wesentlich höher als auf der Intensivüberwachungsstation (7% bzw. 6%), d.h. unabhängig von der Nachweismethode war die Infektionsrate auf der Intensivbehandlungsstation höher als auf der Intensivüberwachungsstation. Da auf beiden Stationen die gleichen Hygienemaßnahmen bei positivem Infektionsbefund ergriffen werden, kommen folgende Erklärungen für diese Beobachtung in Frage:

- eine höhere Empfindlichkeit der unreiferen bzw. kränkeren Früh- und Neugeborenen gegenüber dem Virus
- eine längere Persistenz des Virus im Darm unreifer bzw. kranker Patienten - mit der Folge einer erhöhten Nachweiswahrscheinlichkeit im Rahmen der zweiwöchentlichen Untersuchungen.

Um zu klären, welche dieser beiden Hypothesen zutrifft, bedarf es weiterer Untersuchungen.

### **4.3 Klinische Symptome**

Die im Rahmen dieser Erhebung am häufigsten beobachteten Symptome bei Rotavirus-positiven Kindern waren eine hohe Stuhlfrequenz, die bei 86% der infizierten Neugeborenen dokumentiert wurde, sowie eine große Stuhlmenge (79%) und schleimige, wässrig-zerhackte Stühle bei 64%. Diese Symptome traten jedoch nicht häufiger als in der Gruppe der Rotavirus-negativen Kinder auf. Insofern können sie nicht als Hinweis auf eine Infektion betrachtet werden. Obwohl relativ häufig schleimige, wässrig-zerhackte Stühle bei den Neugeborenen beobachtet wurden, entwickelte keines der Kinder eine Dehydratation.

#### 4. Diskussion

---

Betrachtet man nur die Ergebnisse des Antigen-Tests, der bisher als Routineverfahren in der Rotavirusdiagnostik gilt, und vergleicht hier die Symptome der Rotavirus-infizierten Gruppe mit denen der nicht-infizierten, zeigt erstere signifikant häufiger schleimige, wässrig-zerhackte Stühle ( $p=0,003$ ) und weist ein blasses Hautkolorit auf ( $p=0,003$ ). Ob ein Neugeborenes blass aussieht, ist letztlich eine subjektive Einschätzung. Außerdem ist dieses Symptom nicht spezifisch für eine Infektion. Desgleichen kann zerhackter Stuhl z.B. auf eingenommene Medikamente zurückgeführt werden. Interessant ist, dass bei den wenigen Frühgeborenen, bei denen aufgrund von Symptomen wie wässrig-zerhacktem, makroskopisch blutigem Stuhl und Erbrechen der klinische Verdacht einer Rotavirusinfektion bestand ( $n=4$ ), weder durch den Antigen-Test noch durch die RT-PCR Rotavirus im Stuhl nachgewiesen werden konnte.

Diese Symptome sind also sicher nicht spezifisch für eine Infektion mit Rotaviren. Doch genauso wenig wie nicht-wässrige Stühle bei Neugeborenen eine Rotavirusinfektion ausschließen können, sind oben genannte Symptome, die von uns häufig auch bei nicht infizierten Kindern gefundenen wurden, charakteristisch für eine Infektion mit Rotaviren in dieser Altersgruppe.

Große Aufmerksamkeit wurde der Tatsache geschenkt, dass viele mit Rotaviren infizierte Neugeborene asymptomatisch sind bzw. nur geringe Symptome zeigen, obwohl sie sehr anfällig für diese Infektionen sind (Bryden 1982, Cameron 1978, Chrystie 1978, Rodriguez 1982, Totterdell 1976). In der Literatur finden sich bisher nur Vermutungen hinsichtlich der Ursache für die vergleichsweise geringen Symptome dieser Infektionen bei Neugeborenen.

Diskutiert werden vor allem mütterliche Antikörper, transplazentar oder über Kolostrum und Muttermilch erworben, die möglicherweise einen Schutz für das Neugeborene bieten (Kapikian 1976).

Ein weiterer Gesichtspunkt, der im Zusammenhang mit dem Vorkommen von asymptomatischen Infektionen bei Neugeborenen diskutiert wird, ist die eventuell geringere Virulenz der Rotavirus-Stämme bei Neugeborenen (Thouless

#### 4. Diskussion

---

1977, Chrystie 1978, Bryden 1982, Perez-Schael 1984, Flores 1986). Allerdings wurden kürzlich auf Neugeborenenstationen weltweit Epidemien mit dem Rotavirus-Stamm P(6)G9 beschrieben, der schwere Symptome bei den meisten infizierten Neugeborenen hervorruft (Widdowson 2000, Cubitt 2000), für die aufgrund der Beobachtung, dass ältere Kinder nicht in dem Maß infiziert wurden, ein höheres Risiko für eine Infektion mit P(6)G9 vermutet wird. Da die meisten Mütter diesem neuen Virustyp noch nicht ausgesetzt waren, könnte ein fehlender Schutz durch protektive Antikörper die hohe Infektionsrate und die Schwere der Symptome bei den Neugeborenen erklären.

Da eine physiologische Unreife des Darms von Neugeborenen bekannt ist und gezeigt wurde, dass proteolytische Enzyme die Replikation von Rotaviren erhöhen (in vitro), wurde ferner spekuliert, dass die geringere Konzentration von proteolytischen Enzymen gekoppelt mit unspezifischen antiviralen Faktoren wie Trypsin-Inhibitoren in Kolostrum und Muttermilch als natürlicher Abwehrmechanismus gegen Rotavirus-Erkrankungen dient. Andererseits könnte dies zu einer Selektion avirulenter Rotaviren führen, die im Darm von Neugeborenen überleben. Das würde sowohl Epidemien und ein Persistieren von Rotavirusinfektionen auf Neugeborenenstationen erklären als auch die Tatsache, dass wechselnde Rotavirus-Populationen aus der Umgebung häufig *nicht* auf Neugeborenenstationen gefunden werden (Flewett 1983, Perez-Schael 1984, Hoshino 1985).

Riedel et al. (1996) beschreiben eine signifikant höhere Inzidenz von Bradykardie-Apnoe-Episoden bei Neugeborenen mit einer Rotavirusinfektion. In der hier vorliegenden Studie wurde dies nicht beobachtet.

### **4.4 Rotavirusinfektionen bei Frühgeborenen**

Frühgeborenen und Neugeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht sowie solchen, die lange Zeit in der Klinik liegen, wird ein größeres Risiko, an einer Rotavirusinfektion zu erkranken, zugeschrieben (Van Renterghem 1980, Dearlove 1983, Dennehy 1985). Auch in der vorliegenden Studie ist die Infektionsrate pro 100 Behandlungstage bei Frühgeborenen höher als bei reifen Neugeborenen (1,04 vs. 0,6).

Wir fanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des klinischen Erscheinungsbildes bei Früh- und Reifgeborenen. Das könnte mit einer zu geringen Fallzahl zusammenhängen.

### **4.5 Nekrotisierende Enterokolitis**

Es wird angenommen, dass Infektionen das Entstehen einer NEC verursachen können oder zumindest dazu beitragen; ein Clustern von NEC-Fällen sowie eine Senkung der Inzidenz durch Hygienemaßnahmen wurde beschrieben (Book 1977), ebenso ein möglicherweise schützender Effekt durch das Füttern von Muttermilch.

Im Zeitraum unserer Studie erkrankte ein Frühgeborenes an NEC, am Diagnostag wurden Rotaviren im Stuhl nachgewiesen. Einen ähnlichen Fall beschreiben Hällström et al. (2001). Bislang ist es nicht möglich, ein einziges infektiöses Agens oder einen anderen Risikofaktor für das Entstehen einer NEC verantwortlich zu machen. Da aber ein enger Zusammenhang mit Rotaviren vermutet wird (Mogilner 1983, Boccia 2001, Rotbart 1983), sollten alle Patienten mit einer NEC auf eine mögliche Infektion mit diesem Virus hin untersucht werden. Obwohl Rotavirusinfektionen bei Neugeborenen meist asymptomatisch verlaufen, sollte ein positiver Infektionsnachweis bei Patienten mit NEC zur Ein-



leitung von Hygienemaßnahmen und zum Screening anderer Patienten auf der Station führen.

### **4.6 Beginn/Nachweis und Dauer der Virusausscheidung**

Eine Ausscheidung von Rotaviren bei Neugeborenen in den ersten Lebenstagen wurde wiederholt dokumentiert (Murphy 1977, Chrystie 1978, Crewe 1980, Santosham 1982, Perez-Schael 1984, Grillner 1985, Kilgore 1996). Auch in unserer Studie wurde in einer von 13 während der ersten 2 Lebenstage und in 5 von 13 am 3. und 4. Lebenstag gewonnenen Stuhlproben, dabei auch in Mekonium, Rotavirus nachgewiesen. Dieser Nachweis einer Virusinfektion während der ersten Lebenstage wäre mit einer vertikalen Transmission des Virus zu erklären (Zhong 1997).

Bei 5 Frühgeborenen konnte eine Virusausscheidung über einen Zeitraum von 1-5 Wochen nachgewiesen werden. Dazwischen fanden sich jedoch auch negativ getestete Proben. Ob in diesen Proben eine zu geringe Virusmenge vorhanden war und Rotavirus somit nicht nachgewiesen werden konnte, oder ob es sich um Reinfektionen handelt, lässt sich nicht klären. Letzteres könnte man v.a. bei dem Patient, der Rotaviren nach einem „negativen“ Intervall von 5 Wochen erneut im Stuhl ausschied, vermuten. Eiden et al. (1988) untersuchten in einer prospektiven Studie 16 Patienten, von denen 9 nach asymptomatischen und 7 nach symptomatischen Rotavirusinfektionen eine oder mehrere Episoden einer Rotavirusausscheidung ohne gastrointestinale Symptome zeigten, die sich mit Episoden, in denen kein Virus nachgewiesen werden konnte, abwechselten. Durch Vergleich der Elektropherotypen vermuteten sie Reinfektionen mit anderen, ähnlichen oder denselben Rotavirus-Stämmen, betonten aber auch die Möglichkeit einer Virusausscheidung unter der Nachweisgrenze: Gerade asymptomatische Ausscheidungen von Rotaviren können nur kurz oder intermittierend erkannt werden. Im Rahmen unserer Studie können wir keine

Aussage bezüglich möglicherweise verschiedener Rotavirus-Stämme machen, aber die Tatsache, dass die längeren Virusausscheidungen, ob sie nun durch wirklich virusfreie Intervalle unterbrochen waren oder nicht, nur bei Frühgeborenen beobachtet wurden, spricht für eine längere Persistenz des Virus bei unreiferen Neugeborenen sowie für deren erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Virus.

### **4.7 Schutz durch Muttermilch?**

Es ist nicht vollständig geklärt, welche Effekte das Füttern von Muttermilch auf die Entwicklung des kindlichen Immunsystems hat bzw. wie Muttermilch schützt (Totterdell 1980, Anonymus 1981). Die milchabsondernde weibliche Brustdrüse ist Teil des mukosalen Immunsystems mit einer lokalen Produktion von Antikörpern, v.a. sekretorischem IgA. Diese Antikörper sind gegen infektiöse Agentien in der mütterlichen Umgebung gerichtet, mit denen sich das kindliche Immunsystem nach der Geburt auseinandersetzen muss. Das Füttern von Muttermilch stellt also eine wirksame immunologische Integration von Mutter und Kind dar (Brandtzaeg 2003). IgA schützt vor allem vor gastrointestinalen Infektionen, indem diese Antikörper die Schleimhautoberflächen „überziehen“. Im Stuhl muttermilch-ernährter Neugeborener konnte im Gegensatz zu nicht-muttermilch-ernährten Anti-Rotavirus-IgA gefunden werden (Van de Perre 2003).

Außerdem wurden sowohl in Kolostrum als auch in Muttermilch Anti-Rotavirus-Antikörper und nicht spezifische antivirale Faktoren wie z.B. Lactadherin, das die Replikation des Virus verhindern soll, oder Trypsin-Inhibitoren nachgewiesen (Thouless 1977, Simhon 1978, Yolken 1978, Cukor 1979, McLean 1980, Pickering 1993, Newburg 1998). Es gibt aber keine Übereinstimmung darüber, ob der vermutete Schutz vor (Rotavirus)Gastroenteritiden wirklich existiert. Gurwith et al. (1981), die Neugeborene in einer Studie über 16 Monate beo-

bachteten, fanden bei Muttermilch-ernährten die gleichen Infektionsraten wie bei nicht mit Muttermilch ernährten Säuglingen; auch Cushing und Anderson (1982) fanden hier keine Unterschiede. Andere Studien beschreiben sehr wohl einen Schutz gegenüber gastrointestinalen Infektionen (Larsen 1978, Cunningham 1979, Hanson 1985, Howie 1990), speziell eine signifikant niedrigere Inzidenz von Rotavirusinfektionen bei muttermilch-ernährten Kindern (Totterdell 1980) bzw. weniger schwere oder gar keine Symptome bei einer Infektion mit Rotaviren (Weinberg 1984, Duffy 1986, Cunningham 1991, Gianino 2002).

In diesem Kontext ist interessant, dass sich in der vorliegenden Studie ein größerer Anteil von Muttermilch-ernährten Neugeborenen in der nicht mit Rotaviren infizierten Gruppe fand. Dies bestätigt die protektive Rolle einer Ernährung mit Muttermilch gegenüber Infektionen des Gastro-Intestinaltrakts.

### **4.8 Immunität/Resistenz**

Der wichtigen Frage, ob (asymptomatische) Rotavirusinfektionen in der Neonatalperiode vor Reinfektionen schützen, gingen Bishop et al. (1983) in einer prospektiven Longitudinalstudie nach, in der sie rotavirusinfizierte Neugeborene über die ersten drei Lebensjahre auf nochmalige Infektionen mit Rotaviren hin untersuchten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass neonatale Rotavirusinfektionen zwar keine Immunität gegenüber Reinfektionen verleihen, aber vor klinisch ernstesten Symptomen während einer folgenden Infektion schützen. Bhan et al. (1993) kamen in ihrer Studie zu ähnlichen Ergebnissen und betonten dabei, dass sich ein Schutz vor symptomatischen Reinfektionen vor allem bei Kindern während des ersten Lebensjahres zeigte. Der für die Resistenz gegenüber Rotavirusinfektionen und der damit verbundenen Erkrankung verantwortliche Mechanismus ist bis heute nicht endgültig geklärt. Wichtige Rollen scheinen Rotavirusantikörper, aber auch andere Immunmechanismen wie z.B. zytotoxische T-Lymphozyten zu spielen.

#### 4. Diskussion

---

Sobald Rotaviren auf einer neonatologischen Intensivstation "auftauchen", kann es schwierig sein, ein Ausbreiten des Virus zu verhindern. Jeder, der mit den Neugeborenen in Kontakt kommt (Schwestern, Ärzte, sonstiges Krankenhauspersonal, Familienmitglieder), kann zu einer Verbreitung des Virus beitragen (Nakata 1996, Gelber 2002). Vor allem scheinen dabei mit Rotaviren kontaminierte Hände eine wichtige Rolle zu spielen (Samadi 1983, Pickering 1986, Pacini 1987). Ansari et al. (1988) zeigen in ihrer Studie, dass Rotaviren auf der Haut ihre Infektiosität über mehrere Stunden behalten und dass Infektionen über lebende wie auch zwischen künstlichen und lebenden Oberflächen leicht stattfinden.

Da zudem sowohl asymptomatisches als auch über einen längeren Zeitraum andauerndes Ausscheiden von Rotaviren vorkommt, was die nosokomialen Infektionsraten extrem erhöht, ist es sinnvoll, nicht nur ab dem ersten Nachweis einer Rotavirusinfektion entsprechende Hygienemaßnahmen einzuleiten, sondern immer auf konsequente Händedesinfektion und Desinfektion von Oberflächen und potentiell kontaminierten Gegenständen (z.B. Stethoskop) zu achten.

Unsere Arbeit zeigt, dass Rotavirusinfektionen bei Früh- und Neugeborenen häufig vorkommen. Dabei scheinen unreifere Neugeborene ein höheres Infektionsrisiko zu haben. Obwohl wir keine charakteristischen Symptome bei den Rotavirus-infizierten Kindern fanden und die meisten nicht ernsthaft erkrankten, wird eine Infektion mit Rotaviren als möglicher (Mit-)Auslöser einer NEC betrachtet. Die Frage nach dem optimalen Test zum Infektionsnachweis bleibt weiterhin offen.

### 5. Zusammenfassung

Im November 2002 wurde im Rahmen von Umgebungsuntersuchungen eines Rotavirusausbruchs in der Neonatologie des UK Tübingen auch in Stuhlproben asymptomatischer Früh- und Neugeborener Rotavirus nachgewiesen. Dies sprach für eine höhere Prävalenz von Rotavirusinfektionen auf den Neonatalstationen als bisher angenommen; diese sollte bestimmt werden. Weiterhin sollte die Hypothese überprüft werden, dass durch die Etablierung einer Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ein sensitiverer Nachweis bzw. Ausschluss einer Infektion erreicht werden kann. Außerdem interessierte, ob es charakteristische Infektionssymptome bei Früh- und Neugeborenen gibt, wie lange Neugeborene das Virus ausscheiden und ob zwischen Rotavirusinfektionen und der Entstehung einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) ein Zusammenhang besteht.

Dazu erfolgte im Rahmen einer prospektiven Erhebung vom 01.01.03 bis zum 30.04.03 die Untersuchung von Stuhlproben aller auf den neonatologischen Intensivbehandlungs- und Intensivüberwachungsstationen des Universitätsklinikums Tübingen aufgenommenen 123 Patienten auf Rotavirus. Bei 28 Kindern (23%) konnte eine Virusausscheidung im Stuhl mittels Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) und/oder RT-PCR nachgewiesen werden.

6 Kinder schieden das Virus bereits in den ersten Lebenstagen aus; auch in Mekonium wurde das Virus nachgewiesen. Beide Befunde sprechen für die Möglichkeit einer perinatalen Transmission dieser Viren.

Die Übereinstimmung zwischen ELISA und RT-PCR war minimal: in nur 4 von 42 Stuhlproben gelang mit beiden Nachweisverfahren ein Virusnachweis. Charakteristische Infektionssymptome bei Früh- und Neugeborenen konnten nicht identifiziert werden. Weder traten eine hohe Stuhlfrequenz noch eine große Stuhlmenge, wässrig-zerhackte Stühle oder Dehydratationen häufiger bei infizierten als bei nicht-infizierten Kindern auf.

## 5. Zusammenfassung

---

Frühgeborene unterschieden sich nicht signifikant von Reifgeborenen. Allerdings schienen unreifere Neugeborene generell eine höhere Anfälligkeit für eine Infektion mit Rotaviren zu haben und das Virus auch über einen längeren Zeitraum auszuscheiden. Beides kann die hohen Infektionsraten auf der neonatologischen Intensivstation erklären und macht deutlich, wie wichtig die Beachtung strenger Maßnahmen zur Prävention und Infektionskontrolle ist.

Von den untersuchten Neugeborenen entwickelte ein mit Rotaviren infiziertes Frühgeborenes eine NEC. Aus diesem Einzelfall können keine Rückschlüsse gezogen werden, doch an einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Rotavirusinfektion und der Entstehung einer NEC sollte gedacht werden.

Das Füttern von Muttermilch kann mit einem geringeren Infektionsrisiko assoziiert werden: Der Anteil der mit Muttermilch ernährten Neugeborenen in der nicht-infizierten Kontrollgruppe war signifikant höher als der unter den infizierten Neugeborenen.

Die Ursache(n) für die geringe Übereinstimmung zwischen ELISA und RT-PCR bleibt (bleiben) unklar. Zu diskutieren, aber aufgrund der hier erhobenen Daten nicht zu beweisen, sind falsch positive Ergebnisse aufgrund von Kreuzreaktionen des ELISA mit bakteriellen Antigenen und/oder Veränderungen viraler RNA durch das in dieser Studie unvermeidliche Einfrieren und Auftauen der Stuhlproben. Aufgrund der Ergebnisse zum Methodenvergleich kann zur Zeit weder der ELISA-Antigen-Test noch die RT-PCR als optimaler Test für den Nachweis einer Rotavirusinfektion bzw. für den Ausschluss einer Infektiosität bei Neugeborenen betrachtet werden.

## 5. Zusammenfassung

---

Rotavirusinfektionen treten bei Neugeborenen häufig auf, und trotz der diskreten Symptomatik kann ein Zusammenhang mit anderen schwerwiegenderen Erkrankungen nicht ausgeschlossen werden. Letzteres wie auch die hohe Kontagiosität sprechen für ein Screening bei Neugeborenen auf Rotavirusinfektionen. Die diskrete Symptomatik der meisten Infizierten lässt dagegen ein Screening nicht als erforderlich erscheinen. Bevor hier eine Entscheidung getroffen werden kann, sollten weitere Untersuchungen zum optimalen Nachweisverfahren für Rotavirusinfektionen bei Neugeborenen durchgeführt werden.

### 6. Literatur

Albrey MB, Murphy AM. Rotaviruses and acute gastroenteritis of infants and children. *Med J Aust* 1976, 1:82-85

The How of Breast Milk and Infection. *Lancet* 1981, 1:1192-1193

Ansari SA, Sattar SA, Springthorpe VS, Wells GA, Tostowaryk W. Rotavirus Survival on Human Hands and Transfer of Infectious Virus to Animate and Nonporous Inanimate Surfaces. *J Clin Microbiol* 1988, 26:1513-1518

Bennet R, Hedlund KO, Ehrnst A, Eriksson M. Nosocomial gastroenteritis in two infant wards over 26 months. *Acta Paediatr* 1995, 84:667-671

Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten year update. *Bull World Health Organ* 1992, 70:705-714

Berner R, Schumacher RF, Forster J. Survey on Rotavirus Infections in a German Pediatric Hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997, 16:479-481

Bhan MK, Lew JF, Sazawal S, Das BK, Gentsch JR, Glass RI. Protection Conferred by Neonatal Rotavirus Infection against Subsequent Rotavirus Diarrhea. *J Infect Dis* 1993, 168:282-287

Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical Immunity After Neonatal Rotavirus Infection. *N Engl J Med* 1983, 309:72-76

Bishop RF, Bugg HC, Masendycz PJ, Lund JS, Gorrell RJ, Barnes GL. Serum, Fecal, and Breast Milk Rotavirus Antibodies as Indices of Infection in Mother-Infant Pairs. *J Infect Dis* 1996, 174(Suppl1):S22-S29

Bishop RF, Barnes GL. Neonatal Rotavirus Infection: Possible Effect On Prevalence Of Severe Diarrhoea In A Community. *J Pediatr Child Health* 1997, 33:80-81

Blutt SE, Kirkwood CD, Parreno V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, Bok K, Bishop RF, Conner ME. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet* 2003, 362:1445-1449

Boccia D, Stolfi I, Lana S, Moro ML. Nosocomial necrotising enterocolitis outbreaks: epidemiology and control measures. *Eur J Paediatr* 2001, 160:385-391



## 6. Literatur

---

Book LS, Overall JC Jr, Herbst JJ, Britt MR, Epstein B, Jung AL. Clustering Of Necrotizing Enterocolitis. Interruption by Infection-Control Measures. *N Engl J Med* 1977, 297:984-986

Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Thomas L, Yolken RH, Arrobio JO, Kapikian AZ, Parrott RH, Chanock RM. Comparison of Direct Electron Microscopy, Immune Electron Microscopy, and Rotavirus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Gastroenteritis Viruses in Children. *J Clin Microbiol* 1981, 13:976-981

Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* 2003, 21:3382-3394

Bryden AS, Thouless ME, Hall CJ, Flewett TH, Wharton BA, Mathew PM, Craig I. Rotavirus infections in a special-care baby unit. *J Infect* 1982, 4:43-48

Buesa J, Colomina J, Raga J, Villanueva A, Prat J. Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. *Res Virol* 1996, 147:353-361

Cameron DJS, Bishop RF, Veenstra AA, Barnes GL. Noncultivable Viruses and Neonatal Diarrhea: Fifteen-Month Survey in a Newborn Special Care Nursery. *J Clin Microbiol* 1978, 8:93-98

Chrystie IL, Totterdell B, Baker MJ, Scopes JW, Banatvala JE. Rotavirus Infections In A Maternity Unit. *Lancet* 1975, 2:79

Chrystie IL, Totterdell BM, Banatvala JE. Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn. *Lancet* 1978, 1:1176-1178

Coulson BS, Gentsch JR, Das BK, Bhan MK, Glass RI. Comparison of Enzyme Immunoassay and Reverse Transcriptase PCR for Identification of Serotype G9 Rotaviruses. *J Clin Microbiol* 1999, 37:3187-3193

Crewe E, Murphy AM. Further studies on neonatal rotavirus infections. *Med J Aust* 1980, 1:61-63

Cubitt WD, Steele AD, Iturriza M. Characterisation of rotaviruses from children treated at a London hospital during 1996: emergence of strains G9P2A[6] and G3P2A[6]. *J Med Virol* 2000, 61:150-154

Cukor G, Blacklow NR, Capozza FE, Panjvani ZFK, Bednarek F. Persistence of Antibodies to Rotavirus in Human Milk. *J Clin Microbiol* 1979, 9:93-96

Cunningham AS. Morbidity in breast-fed and artificially fed infants. *J Pediatr* 1979, 95:685-689

## 6. Literatur

---

Cunningham AS, Jelliffe DB, Jelliffe EFP. Breast-feeding and health in the 1980s: A global epidemiologic review. *J Pediatr* 1991, 118:659-666

Cushing AH, Anderson L. Diarrhea in Breast-Fed and Non-Breast-Fed Infants. *Pediatrics* 1982, 70:921-925

Dearlove J, Latham P, Dearlove B, Pearl K, Thomson A, Lewis IG. Clinical range of neonatal rotavirus gastroenteritis. *Br Med J* 1983, 286:1473-1475

Dennehy PH, Peter G. Risk Factors Associated With Nosocomial Rotavirus Infection. *Am J Dis Child* 1985, 139:935-939

Dennehy PH, Gauntlett DR, Spangenberg SE. Choice of reference assay for the detection of rotavirus in fecal specimens: electron microscopy versus enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1990, 28:1280-1283

Duffy LC, Riepenhoff-Talty M, Byers TE, La Scolea LJ, Zielezny MA, Dryja DM, Ogra PL. Modulation of Rotavirus Enteritis During Breast-feeding. *Am J Dis Child* 1986, 140:1164-1168

Eiden JJ, Verleur DG, Vonderfecht SL, Yolken RH. Duration and pattern of symptomatic rotavirus shedding by hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 1988, 7:564-569

Eing BR, May G, Baumeister HG, Kühn JE. Evaluation of Two Immunoassays for Detection of Human Rotaviruses in Fecal Specimens. *J Clin Microbiol* 2001, 39:4532-4543

Flewett TH. Rotavirus in the home and hospital nursery. *Br Med J* 1983, 287:568

Flores J, Midthun K, Hoshino Y, Green K, Gorziglia M, Kapikian AZ, Chanock RM. Conservation of the Fourth Gene among Rotaviruses Recovered from Asymptomatic Newborn Infants and Its Possible Role in Attenuation. *J Virol* 1986, 60:972-979

Frühwirth M, Brösl S, Ellemunter H, Moll-Schüler I, Rohwedder A, Mutz I. Distribution of Rotavirus VP4 Genotypes and VP7 Serotypes among Nonhospitalized and Hospitalized Patients with Gastroenteritis and Patients with Nosocomially Acquired Gastroenteritis in Austria. *J Clin Microbiol* 2000, 38:1804-1806

Frühwirth M, Heining U, Ehlken B, Petersen G, Laubereau B, Moll-Schüler I, Mutz I, Forster J. International variation in disease burden of rotavirus gastroenteritis in children with community- and nosocomial acquired infection. *Pediatr Infect Dis J* 2001, 20:784-791

## 6. Literatur

---

- Gelber SE, Ratner AJ. Hospital-acquired viral Pathogens in the Neonatal Intensive Care Unit. *Semin Perinatol* 2002, 26:346-356
- Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of Group A Rotavirus Gene 4 Types by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1992, 30:1365-1373
- Gianino P, Mastretta E, Longo P, Laccisaglia A, Sartore M, Russo R, Mazzaccara A. Incidence of nosocomial rotavirus infections, symptomatic and asymptomatic, in breast-fed and non-breast-fed infants. *J Hosp Infect* 2002, 50:13-17
- Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic Acid from Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 1990, 28:276-282
- Grillner L, Broberger U, Chrystie I, Ransjö U. Rotavirus infections in newborns: An epidemiological and clinical study. *Scand J Infect Dis* 1985, 17:349-355
- Gunson RN, Miller J, Leonard A, Carman WF. Importance of PCR in the diagnosis and understanding of rotavirus illness in the community. *Commun Dis Public Health* 2003, 6:63-65
- Gurwith M, Wenman W, Hinde D, Feltham S, Greenberg H. A Prospective Study of Rotavirus Infection in Infants and Young Children. *J Infect Dis* 1981, 144:218-224
- Hanson LA, Ahlstedt S, Andersson B, Carlsson B, Fällström SP, Mellander L, Porras O, Söderström T, Svanborg Eden C. Protective Factors in Milk and the Development of the Immune System. *Pediatrics* 1985, 75:172-176
- Hällström M, Vesikari T, Janas M, Ikonen S, Tammela O. Screening of rotavirus and adenovirus infections during prolonged hospitalisation in a neonatal unit. *Acta Paediatr* 2001, 90:1196-1198
- Harris L, Tudehope D. Necrotizing enterocolitis and human rotavirus. *Med J Aust* 1983, 1:104-105
- Herrmann JE, Blacklow NR, Perron DM, Cukor G, Krause PJ, Hyams JS, Barrett HJ, Ogra PL. Enzyme Immunoassay With Monoclonal Antibodies for the Detection of Rotavirus in Stool Specimens. *J Infect Dis* 1985, 152:830-832
- Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus Antigens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994, 185:179-227

## 6. Literatur

---

Howie PW, Forsyth JS, Ogston SA, Clark A, du V Florey C. Protective effect of breast feeding against infection. *Br Med J* 1990, 300:11-16

Husain M, Seth P, Broor S. Detection of Group A Rotavirus by Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction in Feces from Children with Acute Gastroenteritis. *Arch Virol* 1995, 140:1225-1233

Iturriza-Gomara M, Auchterlonie IA, Zaw W, Molyneaux P, Desselberger U, Gray J. Rotavirus gastroenteritis and central nervous system (CNS) infection: characterization of the VP7 and VP4 genes of rotavirus strains isolated from paired fecal and cerebrospinal fluid samples from a child with CNS disease. *J Clin Microbiol* 2002, 40:4797-4799

Johansen K, Bennet R, Bondesson K, Eriksson M, Hedlund KO, De Verdier Klingenberg K, Uhnöo I, Svensson L. Incidence and estimates of the disease burden of rotavirus in Sweden. *Acta Paediatr* 1999, Suppl 426 :20-23

Johnston SLG, Wiedbrauk DL. Rotavirus. *Manual of Clinical Virology* 1993, 214-221

Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Cline WL, Arrobio JO, Brandt CD, Rodriguez WJ, Sack DA, Chanock RM, Parrott RH. Human Reovirus-Like Agent As The Major Pathogen Associated With "Winter" Gastroenteritis In Hospitalized Infants And Young Children. *N Engl J Med* 1976, 294:965-972

Kapikian AZ, Chanock RM. Rotaviruses. *Fields Virology* 1990, Second Edition:1353-1387

Kilgore PE, Unicomb LE, Gentsch JR, Albert MJ, McElroy CA, Glass RI. Neonatal rotavirus infection in Bangladesh: strain characterization and risk factors for nosocomial infection. *Pediatr Infect Dis J* 1996, 15:672-677

Koopmans M, Brown D. Seasonality and diversity of Group A rotaviruses in Europe. *Acta Paediatr* 1999, Suppl 426:14-19

Larsen SA, Homer DR. Relation of breast versus bottle feeding to hospitalization for gastroenteritis in a middle-class U.S. Population. *J Pediatr* 1978, 92:417-418

Lee CN, Lin CC, Kao CL, Zao CL, Shih MC, Chen HN. Genetic characterization of the rotaviruses associated with a nursery outbreak. *J Med Virol* 2001, 63:311-320

Linhares AC, Mascarenhas JDP, Gusmao RHP, Gabbay YB, Fialho AM, Leite JPG. Neonatal Rotavirus Infection in Belem, Northern Brazil: Nosocomial Transmission of a P[6] G2 Strain. *J Med Virol* 2002, 67:418-426

## 6. Literatur

---

- Masendycz PJ, Palombp EA, Gorrell RJ, Bishop RF. Comparison of Enzyme Immunoassay, PCR, and Type-Specific cDNA Probe Techniques for Identification of Group A Rotavirus Gene 4 Types (P-Types). *J Clin Microbiol* 1997, 35:3104-3108
- Matson DO, Estes MK. Impact of rotavirus infection at a large pediatric hospital. *J Infect Dis* 1990, 162:598-604
- McLean B, Holmes IH. Transfer of Antiroviral Antibodies from Mothers to Their Infants. *J Clin Microbiol* 1980, 12:320-325
- Mogilner BM, Bar-Yochai A, Miskin A, Shif I, Aboudi Y. Necrotizing enterocolitis associated with rotavirus infection. *Isr J Med Sci* 1983, 19:894-896
- Murphy AM, Albrey MB, Hay PJ. Rotavirus infection in neonates. *Lancet* 1975, 2:452-453
- Murphy AM, Albrey MB, Crewe EB. Rotavirus infections of neonates. *Lancet* 1977, 2:1149-1150
- Nakata S, Adachi N, Ukae S, Kogawa K, Numata K, Urasawa S, Chiba S. Outbreaks of nosocomial rotavirus gastro-enteritis in a pediatric ward. *Eur J Pediatr* 1996, 155:954-958
- Newburg DS, Peterson JA, Ruiz-Palacios GM, Matson DO, Morrow AL, Shults J, Guerrero MdL, Chaturvedi P, Newburg SO, Scallan CD, Taylor MR, Ceriani RL, Pickering LK. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* 1998, 351:1160-1164
- Pacini DL, Brady MT, Budde CT, Connell MJ, Hamparian VV, Hughes JH. Nosocomial Rotaviral Diarrhea: Pattern of Spread on Wards in a Children's Hospital. *J Med Virol* 1987, 23:359-366
- Pang XL, Joensuu J, Vesikari T. Detection of Rotavirus RNA in Cerebrospinal Fluid in a case of Rotavirus Gastroenteritis with Febrile Seizures. *Pediatr Infect Dis J* 1996, 15:543-545
- Perez-Schael I, Daoud G, White L, Urbina G, Daoud N, Perez M, Flores J. Rotavirus Shedding by Newborn Children. *J Med Virol* 1984, 14:127-136
- Pickering LK, Bartlett AV, Woodward WE. Acute infectious diarrhea among children in day care: epidemiology and control. *Rev Infect Dis* 1986, 8:539-547
- Riedel F, Kroener T, Stein K, Nuesslein TG, Rieger CHL. Rotavirus infection and bradycardia-apnoea-episodes in the neonate. *Eur J Pediatr* 1996, 155:36-40

## 6. Literatur

---

Rocchi G, Vella S, Resta S, Cochi S, Donelli G, Tangucci F, Menichella D, Varveri A, Inglese R. Outbreak of rotavirus gastroenteritis among premature infants.

Br Med J 1981, 283:886

Rodriguez WJ, Kim HW, Arrobio JO, Brandt CD, Chanock RM, Kapikian AZ, Wyatt RG, Parrott RH. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. J Pediatr 1977, 91:188-193

Rodriguez WJ, Kim HW, Brandt CD, Fletcher AB, Parrott RH. Rotavirus: A cause of nosocomial infection in the nursery. J Pediatr 1982, 101:274-277

Rodriguez-Baez N, O'Brian R, Qiu SQ, Bass DM. Astrovirus, Adenovirus and Rotavirus in hospitalized children: Prevalence and association with gastroenteritis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002, 35:64-68

Rotbart HA, Levin MJ, Yolken RH, Manchester DK, Jantzen J. An outbreak of rotavirus-associated neonatal necrotizing enterocolitis. J Pediatr 1983, 103:454-459

Rotbart HA, Nelson WL, Glode MP, Triffon TC, Kogut SJH, Yolken RH, Hernandez JA, Levin MJ. Neonatal rotavirus-associated necrotizing enterocolitis: Case control study and prospective surveillance during an outbreak. J Pediatr 1988, 112:87-93

Ryder RW, McGowan JE, Hatch MH, Palmer EL. Reovirus-like agent as a cause of nosocomial diarrhea in infants. J Pediatr 1977, 90:698-702

Samadi AR, Huq MI, Ahmed QS. Detection of rotavirus in handwashings of attendants of children with diarrhoea. Br Med J 1983, 286:188

Santosham M, Pathak A, Kottapalli S, Vergara J, Wong SJ, Frochlick J, Sack RB. Neonatal rotavirus infection. Lancet 1982, 1:1070-1071

Saulsbury FT, Winkelstein JA, Yolken RH. Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. J Pediatr 1980, 97:61-65

Schiff LA, Fields BN. Reoviruses and Their Replication. Fields Virology 1990, Second Edition:1275-1298

Sebire K, McGavin K, Land S, Middleton T, Birch C. Stability of Human Immunodeficiency Virus RNA in Blood Specimens as Measured by a Commercial PCR-based Assay. J Clin Microbiol 1998, 36:493-498

## 6. Literatur

---

Sharma R, Hudak ML, Premachandra BR, Stevens G, Monteiro CB, Bradshaw JA, Kaunitz AM, Hollister RA. Clinical manifestations of rotavirus infection in the neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J* 2002, 21:1099-1105

Shif I, Silberstein I, Mendelson E. Evidence that Human Babies become infected by Animal Rotaviruses. *Isr J Med Sci* 1994, 30:387-391

Simhon A, Mata L. Anti-Rotavirus Antibody In Human Colostrum. *Lancet* 1978, 1:39-40

Steinhoff MC. Rotavirus: The first five years. *J Pediatr* 1980, 96:611-622

Stoll BJ. Epidemiology of Necrotising Enterocolitis. *Clin Perinatol* 1994, 21:205-218

Thomson AH, Dearlove J, Lewis I, Latham P, Birkin N, Keogh A. Outbreak of rotavirus gastroenteritis among premature infants. *Br Med J* 1981, 283:1405

Thouless ME, Bryden AS, Flewett TH. Rotavirus neutralisation by human milk. *Br Med J* 1977, 2:1390

Totterdell BM, Chrystie IL, Banatvala JE. Rotavirus infections in a maternity unit. *Arch Dis Child* 1976, 51:924-928

Totterdell BM, Chrystie IL, Banatvala JE. Cord blood and breast-milk antibodies in neonatal rotavirus infection. *Br Med J* 1980, 280:828-831

Trudd PT, Carrington D. A prospective study of chlamydial, mycoplasmal, and viral infections in a neonatal intensive care unit. *Arch Dis Child* 1984, 59:120-125

Tyler KL, Fields BN. *Reoviridae: A Brief Introduction*. *Fields Virology* 1990, Second Edition:1271-1273

Ushijima H, Koike H, Mukoyama A, Hasegawa A, Nishimura S, Gentsch J. Detection and Serotyping of Rotaviruses in Stool Specimens by using Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction. *J Med Virol* 1992, 38:292-297

Ushijima H, Xin KQ, Nishimura S, Morikawa S, Abe T. Detection and Sequencing of Rotavirus VP7 Gene from Human Materials (Stools, Sera, Cerebrospinal Fluids, and Throat Swabs) by Reverse Transcription and PCR. *J Clin Microbiol* 1994, 32:2893-2897

## 6. Literatur

---

Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* 2003, 21:3374-3379

Van Renterghem L, Borre P, Tilleman J. Rotavirus and Other Viruses in the Stool of Premature Babies. *J Med Virol* 1980, 5:137-142

Vial PA, Kotloff KL, Losonsky GA. Molecular Epidemiology of Rotavirus Infection in a Room for Convalescing Newborns. *J Infect Dis* 1988, 157:668-673

Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serologic response to infection. *J Infect Dis* 1986, 154:871-880

Weinberg RJ, Tipton G, Klish WJ, Brown MR. Effect of Breast-Feeding on Morbidity in Rotavirus Gastroenteritis. *Pediatrics* 1984, 74:250-253

Widdowson MA, van Doornum GJJ, van der Poel WHM, de Boer AS, Mahdi U, Koopmans M. Emerging group-A rotavirus and a nosocomial outbreak of diarrhoea. *Lancet* 2000, 356:1161-1162

Wilde J, Eiden J, Yolken RH. Removal of Inhibitory Substances from Human Fecal Specimens for Detection of Group A Rotaviruses by Reverse Transcriptase and Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1990, 28:1300-1307

Wilde J, Yolken RH, Willoughby R, Eiden JJ. Improved Detection of Rotavirus Shedding by Polymerase Chain Reaction. *Lancet* 1991, 337:323-326

Wood DJ, David TJ, Chrystie IL, Totterdell B. Chronic Enteric Virus Infection in Two T-Cell Immunodeficient Children. *J Med Virol* 1988, 24:435-444

Yolken RH, Wyatt RG, Mata L, Urrutia JJ, Garcia B, Chanock RM, Kapikian AZ. Secretory antibody directed against rotavirus in human milk - measurement by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *J Pediatr* 1978, 93:916-921

Yolken RH, Bishop CA, Townsend TR, Bolyard EA, Bartlett J, Santos GW, Saral R. Infectious gastroenteritis in bone marrow transplant recipients. *N Engl J Med* 1982, 306:1010

Zhong M, Yan P, Xie M. Human rotavirus infection in perinatal transmission. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1997, 32:735-737



## **Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Christian F. Poets für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Anregungen und seine freundliche Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Gerhard Jahn und Herrn Dr. Dr. Klaus Hamprecht danke ich für das Bereitstellen der Laborräume und des Materials sowie für die Unterstützung und Betreuung bei der Etablierung der RT-PCR.

Herrn Professor Dr. Klaus Dietz vom Institut für Medizinische Biometrie sage ich Dank für die statistische Beratung.

Ganz herzlich danke ich den Schwestern der Neonatologie für ihre Mitarbeit und Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich auch Frau Mikeler und dem Diagnostiklabor.

Herzlichen Dank auch an meine Eltern und Brüder.

## **Lebenslauf**

### **Jutta Hilberath**

#### **Persönliches**

Geburtstag, -ort

7. August 1976, Mainz  
Erstes von vier Kindern des Bernd Jochen Hilberath und  
der Theresia Hilberath

#### **Ausbildung**

08/1987 – 03/1994

Hildegardisschule, Gymnasium, Bingen/Rhein

04/1994 – 07/1994

Highschool in Salmon Arm, Canada

08/1994 – 06/1996

Wildermuth-Gymnasium, Tübingen

10/1997 – 02/1998

Studium der Physik, Universität Tübingen

04/1999 – 08/2004

Studium der Humanmedizin, Universität Tübingen

03/2001

Ärztliche Vorprüfung, Tübingen

03/2002

Erste Ärztliche Prüfung, Tübingen

08/2004

Zweite Ärztliche Prüfung, Tübingen

10/2005

Dritte Ärztliche Prüfung, München

2002 – 2004

Dissertation bei Prof. Dr. Ch. F. Poets,  
Universitäts – Kinderklinik, Neonatologie

#### **Praktisches Jahr**

10/2004 – 01/2005

Kantonsspital Luzern, Innere Medizin

02/2005 – 05/2005

St. John's Hospital, Bangalore, Chirurgie

06/2005 – 09/2005

Dr. von Haunersches Kinderspital, München, Pädiatrie

#### **Famulaturen**

08/2001 – 09/2001

Diakoniekrankenhaus Ingelheim/Rhein  
Innere Medizin

08/2002 – 09/2002

Samrong Hospital, Thailand  
Chirurgie und Notfallmedizin

09/2002 – 11/2002

Universitätsklinik Wien  
Neuropsychiatrie des Kindes- und Jugendalters,  
Neonatologie

09/2003 – 10/2003

Universitäts – Kinderklinik Tübingen  
Allgemeinpädiatrische Sprechstunde/Ambulanz

#### **Weitere Praxiserfahrung**

08/1996 – 08/1997

Orurillo/Ayaviri, Peru  
Missionarisches Jahr, Kinder- und Jugendarbeit

07/1998 – 02/1999

Kezia, Beit Jala, Palästina  
Betreuung von und Arbeit mit geistig- und  
körperbehinderten jungen Frauen

05/1999 – 12/2003

Sitz- und Sonderwachen in der Kinderchirurgie

Wintersemester 03/04

Studentischer Tutor im Wochenpraktikum Kinderheilkunde