

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Neurochirurgische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Prof. Dr. Bernhard Meyer)

HEVIDI-HErpes Virus in Intervertebral Disc -  
Virusinfektion als mögliche Ursache für einen  
Bandscheibenvorfall

Miriam Sabina Sailer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Jens Lehmborg

2. Prof. Dr. Bernhard Meyer

Die Dissertation wurde am 14.05.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.11.2020 angenommen.

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>II</b>
<b>II.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>III.</b>	<b>Abbildungs-, Grafiken- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Rückenschmerzen und ihre Ursachen.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Discus intervertebralis und Diskusprolaps .....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Aufbau des Discus intervertebralis .....	3
1.2.2	Degenerationserscheinungen des Discus intervertebralis.....	4
1.2.3	Prolaps des Discus intervertebralis .....	5
1.2.4	Ursachen für Degeneration und Prolaps des Discus intervertebralis .....	7
<b>1.3</b>	<b>Viren im Allgemeinen .....</b>	<b>9</b>
1.3.1	Herpesviren .....	10
1.3.2	Weitere relevante Viren.....	11
<b>1.4</b>	<b>Polymerasekettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>13</b>
<b>1.5</b>	<b>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Geräte und Material .....</b>	<b>18</b>
3.1.1	Geräte.....	18
3.1.2	Reagenzien .....	19
<b>3.2</b>	<b>Studienaufbau.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Patientenkollektiv/Einschlusskriterien .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>Studiendurchführung .....</b>	<b>20</b>
<b>3.5</b>	<b>Operationsverfahren .....</b>	<b>22</b>
<b>3.6</b>	<b>Serologie.....</b>	<b>23</b>
<b>3.7</b>	<b>Nukleinsäure-Extraktion .....</b>	<b>24</b>
<b>3.8</b>	<b>PCR.....</b>	<b>25</b>
3.8.1	TaqMan Assay.....	25
3.8.2	Zellzahlbestimmung .....	26
3.8.3	Erklärung verschiedener Größen .....	26
3.8.4	Quantitative PCR und Standardkurve .....	28
<b>3.9</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>29</b>

3.10	Signifikanzniveau und statistische Tests .....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
4.1	Patientenkollektiv .....	30
4.2	Demographische Daten .....	31
4.3	Lokalisation der Bandscheibenvorfälle .....	37
4.4	Serologische Testreihen.....	38
4.4.1	HSV-Serologie .....	39
4.4.2	CMV-Serologie.....	40
4.4.3	VZV-Serologie .....	42
4.4.4	Parvovirus B19-Serologie .....	43
4.5	Ergebnisse der Zellzahlbestimmung durch hPrP-PCR.....	44
4.6	PCR-Ergebnisse.....	44
4.6.1	Virale PCR der Herpes- und Enteroviren .....	44
4.6.2	Positive Ergebnisse: Parvovirus B19.....	45
4.6.2.1	Quantitativer DNA-Nachweis.....	48
4.6.2.2	Zusammenhänge zwischen Sequesterpositivität und BMI/Alter.....	51
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>57</b>
5.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse .....	57
5.2	Diskussion des Studienaufbaus und der Methoden.....	58
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	59
5.3.1	Diskussion der serologischen Ergebnisse .....	59
5.3.2	Diskussion der PCR-Ergebnisse.....	60
5.4	Ausblick .....	63
<b>IV.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>65</b>
<b>V.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
<b>VI.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>vii</b>
<b>VII.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>xi</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

ACDF	Anteriore zervikale Diskektomie und Fusion
AK	Antikörper
BMI	Body-Mass-Index
BSV	Bandscheibenvorfall
BWS	Brustwirbelsäule
CMV	Zytomegalievirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Eppstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Enteroviren	Humanpathogene Enteroviren
HHV	Humanes Herpesvirus
hPrP	Humanes Prionprotein
HSV	Herpes-simplex-Virus
HWS	Halswirbelsäule
IgG	Immunglobulin G (Antikörper)
LWS	Lendenwirbelsäule
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Seq	Sequester
VZV	Varizella-Zoster-Virus

### III. Abbildungs-, Grafiken- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Discus intervertebralis .....	3
Abbildung 2: Ablauf der TaqMan-PCR: Von der Bindung des Primers bis zur Abspaltung des Reporters und Bildung des Fluoreszenzsignals.....	14
Abbildung 3: Unterschiedliche ELISA-Formate .....	15
Abbildung 4: CT-Wert und Threshold.....	28
Grafik 1: Boxplot-Graph zur Altersverteilung .....	31
Grafik 2: Boxplot-Graph zur Altersverteilung, geschlechterbezogen .....	33
Grafik 3: Boxplot-Graph zum BMI .....	34
Grafik 4: Häufigkeiten der einzelnen BMI-Klassen .....	36
Grafik 5: Boxplot-Graph zum BMI, geschlechterbezogen .....	37
Grafik 6: Histogramm zu LWS/HWS-Verteilung .....	38
Grafik 7: Histogramm zur HSV-Serologie .....	40
Grafik 8: Histogramm zur CMV-Serologie.....	41
Grafik 9: Histogramm zur VZV-Serologie.....	42
Grafik 10: Histogramm zur Parvovirus B19-Serologie.....	43
Grafik 11: Histogramm zum Sequesternachweis von Parvovirus B19.....	46
Grafik 12: Histogramm zum Sequesternachweis von Parvovirus B19 bei positiver Serologie.....	47
Grafik 13: Zellzahl und Parvovirus B19-DNA.....	49
Grafik 14: DNA-Menge pro Zelle .....	51
Grafik 15: Boxplot-Graph zum BMI bei positivem und negativem Sequesternachweis von Parvovirus B19 .....	53
Grafik 16: Boxplot-Graph zur Altersverteilung bei positivem und negativem Sequesternachweis von Parvovirus B19 .....	54
Tabelle 1: Einschlusskriterien der HEVIDI-Studie .....	21
Tabelle 2: DNA-PCR-Ablauf.....	26
Tabelle 3: RNA-PCR-Ablauf.....	26
Tabelle 4: Anthropometrische Daten.....	30
Tabelle 5: Geschlechterverteilung.....	30
Tabelle 6: Verteilung der Bandscheibenvorfälle .....	30

Tabelle 7: Deskriptive Statistik - Alter .....	31
Tabelle 8: Deskriptive Statistik - Alter und Geschlecht.....	32
Tabelle 9: Deskriptive Statistik - Gewicht.....	33
Tabelle 10: Deskriptive Statistik - Körpergröße .....	33
Tabelle 11: Deskriptive Statistik - BMI .....	34
Tabelle 12: Einteilung in BMI-Klassen* .....	35
Tabelle 13: BMI-Klassen und deren Häufigkeiten .....	35
Tabelle 14: Häufigkeiten HWS/LWS .....	37
Tabelle 15: Addition der einzelnen Antikörpernachweise.....	38
Tabelle 16: Häufigkeiten HSV-IgG .....	39
Tabelle 17: Häufigkeiten CMV-IgG.....	40
Tabelle 18: Häufigkeiten VZV-IgG.....	42
Tabelle 19: Häufigkeiten Parvovirus B19-IgG.....	43
Tabelle 20: Ct-Mittelwerte.....	44
Tabelle 21: Parvovirus B19-Sequester .....	45
Tabelle 22: Häufigkeiten Parvovirus B19: Serologie und Sequester .....	47
Tabelle 23: Deskriptive Statistik DNA-Menge.....	48
Tabelle 24: Deskriptive Statistik Geq pro $10^5$ Zellen .....	50
Tabelle 25: Deskriptive Statistik Parvovirus B19 und BMI/Alter.....	51
Tabelle 26: Gruppenstatistiken Parvovirus B19 und BMI/Alter .....	54
Tabelle 27: Test bei unabhängigen Stichproben .....	55
Tabelle 28: T-Test für die Mittelwertgleichheit .....	55
Tabelle 29: Mann-Whitney-U-Test für BMI und Parvovirus B19 Sequesterpositivität	55

# 1 Einleitung

## 1.1 Rückenschmerzen und ihre Ursachen

Rückenschmerzen sind ein sehr häufiges und viel verbreitetes Beschwerdebild der heutigen Gesellschaft. In Deutschland sind sie die zweithäufigste Ursache für Patientenbesuche in hausärztlichen Praxen. Die Schmerzen sind unterschiedlichster Genese. In 5-15 % der Fälle wird ein lumbaler Bandscheibenvorfall diagnostiziert (Kim et al., 2018). Dieser ist mit circa 60 % der am häufigsten vorkommende Bandscheibenvorfall, gefolgt vom zervikalen Diskusprolaps (Dulebohn, Massa, & Mesfin, 2019). Diskushernien im Bereich der thorakalen Wirbelsäule sind sehr selten und oft traumatischer Genese (Dave, 2018) .

Für die Genese von Bandscheibenvorfällen werden verschiedene Ursachen diskutiert. In dieser Dissertation sollen Viren als mögliche Ursache für einen Bandscheibenvorfall untersucht werden.

Grundlage ist eine Studie aus Griechenland, die das Vorkommen von Herpesviren in prolabierte Bandscheiben nachweisen konnte (Alpantaki, Katonis, Hadjipavlou, Spandidos, & Sourvinos, 2011). Um diese Daten einer kleinen Fallzahl zu verifizieren sollen nun die Ergebnisse in einer größeren Studie mit höherer Fallzahl analysiert werden.

Die griechische Forschungsgruppe der Universität von Kreta, Heraklion, untersuchte 16 Sequester hinsichtlich des Vorkommens von Herpesviren. Als Kontrollgruppe dienten zwei Proben aus traumatischen Bandscheibenschäden (Alpantaki et al., 2011).

Die Studie ergab einen Virusnachweis in 13 der 16 Sequester, während die zwei Kontrollproben negativ waren. In 56,2 % konnte das Herpes-simplex-Virus-1 (HSV 1) nachgewiesen werden und in insgesamt 37,5 % wurde das Zytomegalievirus (CMV) detektiert. Andere Typen der Herpes-Viren Familie konnten nicht nachgewiesen werden. (Alpantaki et al., 2011)

Anhand der Studienergebnisse der griechischen Studie ergibt sich die These, dass die Viren in das avaskuläre Bandscheibengewebe diffundieren können: Die Nutrition der Bandscheiben erfolgt nicht durch Blutgefäße, jedoch über Diffusion (Hadjipavlou,

Tzermiadianos, Bogduk, & Zindrick, 2008; Holm, Maroudas, Urban, Selstam, & Nachemson, 1981; Maroudas, Stockwell, Nachemson, & Urban, 1975; Urban, Smith, & Fairbank, 2004). Der Discus intervertebralis als immunprivilegiertes Organ lässt beispielsweise Immunzellen nicht eindringen (Sun et al., 2013).

Die Ergebnisse der griechischen Studie führen zu der Frage, ob Erreger wie beispielsweise Viren in die Disci eindringen können und dort zu einer Diskusdegeneration bis hin zum Prolaps führen könnten (Alpantaki et al., 2011).

Diese Erkenntnisse würden einen möglicherweise großen Fortschritt in der Therapie von Bandscheibenvorfällen bedeuten. Eventuell könnte die Pathogenese durch Präventivmaßnahmen, wie beispielsweise Impfungen, vermindert werden.

Um hierzu mehr Wissen zu erlangen, müssen die bislang vorhandenen Daten von Alpantaki et al. (2011) erweitert und verifiziert werden. Dies wird unter anderem durch eine prospektive Studie und einer größeren Fallzahl ermöglicht.

Hierzu wurde die vorliegende HEVIDI-Studie konzipiert. HEVIDI ist das Akronym für „HErpes Virus in Intervertebral Disc“ und untersucht die These: Virusinfektion als mögliche Ursache für einen Bandscheibenvorfall. Diese Studie wurde von der neurochirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, in Kooperation mit dem Institut für Virologie der Technischen Universität München, durchgeführt.

## 1.2 Discus intervertebralis und Diskusprolaps

Der Discus intervertebralis, die Bandscheibe, ist die zentrale Struktur, die dem Inhalt dieser Arbeit zugrunde liegt. Dabei handelt es sich um ein wasser- und kollagenreiches Gewebe, welches sich zwischen den einzelnen Wirbelkörpern befindet. Junghanns definierte 1951 die Bandscheibe mit den beiden angrenzenden Wirbelkörpern, sowie die umliegenden Strukturen, als funktionelle Einheit (Junghanns, 1951). Die menschliche Wirbelsäule besteht aus 24 einzelnen Wirbelkörpern und 23 dazwischenliegenden Bandscheiben, sowie dem Os sacrum und dem Os coccygeum (Gray, 1918). Die Bandscheibe dient als Bindeglied und „Stoßdämpfer“ der Wirbelsäule (Humzah & Soames, 1988). Es gibt unterschiedliche Ursachen für die Schädigung und Degeneration der Bandscheiben (Antoniou et al., 1996; Buckwalter, 1995; Hadjipavlou et al., 2008; Lyons, Eisenstein, & Sweet, 1981; Urban & Roberts,

2003). Die Degeneration kann das Gewebe in hohem Maße schädigen und zu Bandscheibenvorfällen führen.

### 1.2.1 Aufbau des Discus intervertebralis

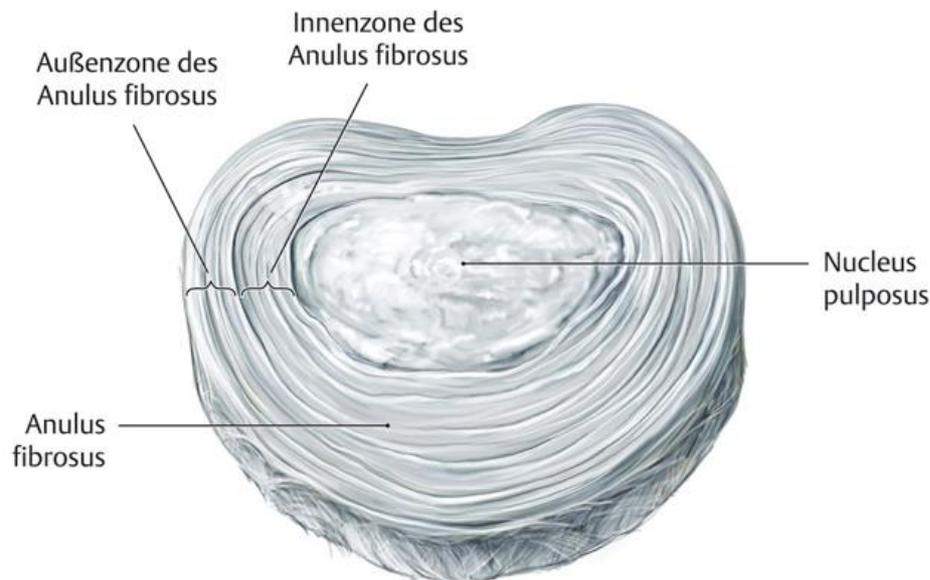


Abbildung 1: Aufbau des Discus intervertebralis<sup>1</sup>

Der Discus intervertebralis unterteilt sich in einen Anulus fibrosus und einen Nucleus pulposus. Der Aufbau des Discus intervertebralis ähnelt dem des Gelenkknorpels (Hadjipavlou et al., 2008). Der stabilere Anulus fibrosus besteht aus Fibroblast-like-cells, die Kollagen Typ I und Typ II herstellen (Hadjipavlou et al., 2008). Der Nucleus pulposus ist zusammengesetzt aus Chondrocyte-like-cells die Kollagen Typ II herstellen, sowie aus Proteoglykanen und Nicht-Kollagen-Proteinen (Hadjipavlou et al., 2008). Proteoglykane bestehen aus einem Core-Protein und radiär angeordneten Glykosaminoglykanketten (Bayliss, Venn, Maroudas, & Ali, 1983).

Viele einzelne Proteoglykane bilden gemeinsam Aggregate, die von Kollagenfasern Typ II zusammengehalten werden. Der Aufbau der Disci ist nicht statisch, es herrscht ein ständiger Auf- und Abbauprozess (Adams & Roughley, 2006; Urban & Roberts,

---

<sup>1</sup> Abbildung des Discus intervertebralis aufgerufen am 25.03.2020:  
[https://eref.thieme.de/images/l/865059\\_25.jpg](https://eref.thieme.de/images/l/865059_25.jpg)

2003). Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise der transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) (Thompson, Oegema, & Bradford, 1991) sowie der insulin-like growth factor (IGF) (Osada et al., 1996) stimulieren die Synthese von Bandscheibenmaterial. Im Gegensatz dazu bauen Metalloproteasen das immer wieder neu entstehende Gewebe ab. Zytokine, wie beispielsweise Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) oder Interferon (IFN) aktivieren die Metalloproteasen (Kobayashi et al., 2005).

Im gesunden Diskus intervertebralis besteht ein Gleichgewicht zwischen Matrixaufbau und -abbau (Adams & Roughley, 2006; Urban & Roberts, 2003).

Die Bandscheiben werden nicht durch Blutgefäße versorgt. Die Kapillaren enden ca. 1-2 mm vor dem Ansatz des Anulus fibrosus. Danach erfolgt die Nutrition mittels Diffusion (Urban et al., 2004). Die benötigten Nährstoffe, wie Sauerstoff und Glucose, sind essentiell für die Zellproliferation. Auch die Wachstumsfaktoren erreichen mittels Diffusion das Innere des Discus intervertebralis. Sie können jedoch durch das Proteoglykannetz nur langsam diffundieren und werden zum Teil an der Diffusion gehindert (Urban et al., 2004). Ein längerfristig niedriger pH-Wert vermindert das Zellwachstum (Urban & Roberts, 2003).

### 1.2.2 Degenerationserscheinungen des Discus intervertebralis

Der Discus intervertebralis verändert sich im Laufe des Lebens. Mit fortschreitendem Alter und ständiger Belastung der Bandscheiben kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Materials (Antoniou et al., 1996; Buckwalter, 1995; Hadjipavlou et al., 2008; Le Maitre, Pockert, Buttle, Freemont, & Hoyland, 2007; Lyons et al., 1981; Urban & Roberts, 2003). Die Grenze zwischen Anulus und Nucleus verschwimmt und auch der Nucleus selbst fibrosiert zunehmend (Buckwalter, 1995). Die einzelnen Kollagenfasern werden unregelmäßiger und ungeordneter (Urban & Roberts, 2003). Zusätzlich kommt es zu einem Ungleichgewicht auf zellulärer Ebene. Das Gleichgewicht zwischen Zellsynthese und -degradation verschiebt sich zugunsten der Degradation (Adams & Roughley, 2006; Le Maitre et al., 2007; Nerlich, Schleicher, & Boos, 1997). Die Aktivität der Zytokine steigt, wodurch die Metalloproteasen mehr Zellmaterial abbauen. Zudem wird auch der Zellanabolismus durch unterschiedliche

Faktoren unterdrückt. Beispielsweise wird der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  durch Cartilage-Intermediate-Layer-Proteins (CILPs) gehemmt (Seki et al., 2005).

Die degenerierten Disci haben weniger Proteoglykane und einen verminderten Wassergehalt (Buckwalter, 1995; Hadjipavlou et al., 2008; Lyons et al., 1981). Diese grundlegenden Veränderungen beeinflussen das Verhalten der Disci bei Belastung und sind prädisponierende Faktoren für ein erhöhtes Verletzungsrisiko. Der häufigste Diskusschaden ist der Prolaps. Dabei reißt der Anulus fibrosus, der Gallertkern tritt aus und kann auf nervale Strukturen drücken (Lyons et al., 1981; Urban & Roberts, 2003). Mechanischer Stress würde auf einen gesunden Discus in der Regel keinen solchen schwerwiegenden Effekt wie das Auftreten eines Diskusprolapses haben. Voraussetzung für die Entstehung einer Discushernie ist die bereits vorhandene Degeneration der Bandscheibe (Urban & Roberts, 2003).

### 1.2.3 Prolaps des Discus intervertebralis

Der Prolaps des Discus intervertebralis (Bandscheibenvorfall, Diskushernie) entsteht in den meisten Fällen nur dann, wenn zuvor bereits degenerative Prozesse die Bandscheibe geschwächt haben (Adams & Roughley, 2006; Antoniou et al., 1996; Buckwalter, 1995; Lyons et al., 1981; Urban & Roberts, 2003). Nur selten kommt es durch rein traumatische Ereignisse zu einem Bandscheibenvorfall (Börm et al., 2005). Die Diskushernie ist am häufigsten in der Lendenwirbelsäule (LWS) lokalisiert, gefolgt von der Halswirbelsäule (HWS) (Dulebohn et al., 2019). Nur 0,25-0,75 % aller Bandscheibenvorfälle befinden sich in der thorakalen Wirbelsäule (Arce & Dohrmann, 1985).

Bei einem Bandscheibenvorfall kommt es zu Rissen im Anulus fibrosus, die Stabilität des Faserrings wird vermindert und der Gallertkern kann nicht mehr stabilisiert werden (Börm et al., 2005). Er dringt durch die Risse nach außen und sequestriert. Hierdurch verliert die Bandscheibe ihre Stoßdämpferfunktion. Der Wasserspeicher im Nucleus pulposus, der ruckartige Bewegungen abfangen soll, ist weniger groß oder komplett funktionslos (Adams & Roughley, 2006). Zu Symptomen führt meist der Bandscheibenvorfall erst, wenn der sequestrierte Teil auf die Nervenwurzel drückt. Hierbei kann es zu neurologischen Ausfällen kommen (Börm et al., 2005). Im lumbalen

Wirbelsäulenbereich können in Abhängigkeit von der Lokalisation der Schädigung einfache Sensibilitätsstörungen oder eine Lumbago auftreten. Eine Schädigung kann jedoch auch zu motorischen Ausfällen mit Funktionsverlust oder sogar zum Cauda Equina Syndrom mit Blasen- und Mastdarmentleerungsstörungen führen (Börm et al., 2005).

Auch bei zervikalen Vorfällen gibt es unterschiedliche Ausprägungen der Symptomatik. Es können Schulter-Nackenschmerzen mit Ausstrahlung in den Hinterkopf, sogenannten Zervikozephalgien, auftreten. Auch ausstrahlende Schmerzen in den Arm, sogenannte Brachialgien, können ebenfalls durch Nervenwurzelkompressionen entstehen. Möglicherweise kommen Hypalgesien und Hypästhesien sowie Reflexausfälle vor. (Papavero et al., 2010)

Die Therapieentscheidung hängt von den vorherrschenden Symptomen ab. Jedoch können 90 % aller lumbalen Bandscheibenvorfälle primär konservativ behandelt werden (Börm et al., 2005). Die SPORT Studie von Weinstein et al. ergab keine signifikanten Ergebnisse für ein besseres Outcome bei konservativer oder operativer Behandlung (Weinstein et al., 2006). Allerdings inkludiert diese Studie keine Patienten, die aufgrund von motorischen Ausfällen oder unbeherrschbaren Schmerzen eine frühzeitige Operation wünschten (Weinstein et al., 2006). Auch Bandscheibenvorfälle der HWS können in den meisten Fällen primär konservativ behandelt werden (Papavero et al., 2010). In beiden Fällen gilt: Sollten sich die Symptome nicht binnen sechs bis acht Wochen Therapie bessern und die Belastbarkeit steigen, muss eine Therapieänderung auch hinsichtlich operativer Vorgehensweise in Erwägung gezogen werden (Börm et al., 2005; Papavero et al., 2010). Lediglich motorische Ausfälle von 3/5 und weniger Kraftgrade nach Janda (bei möglichen 5/5) oder ein Cauda equina Syndrom sind absolute OP-Indikationen für einen lumbalen Bandscheibenvorfall (Börm et al., 2005). Zervikale Diskushernien werden bei einem Kraftgradverlust (3/5 Kraftgrade nach Janda) oder nicht beherrschbaren radikulären Schmerzen ebenfalls primär operativ behandelt (Papavero et al., 2010).

Die konservative Therapie des lumbalen Bandscheibenvorfalles dient der Schmerzreduktion und der Steigerung der Belastbarkeit und Aktivität. Hierbei erweisen sich eine analgetische Therapie (Börm et al., 2005; Van Tulder, Scholten, Koes, & Deyo, 2000) und ein Fortführen der körperlichen Aktivität als zielführend (Börm et al., 2005; Hilde, Hagen, Jamtvedt, & Winnem, 2006). Weiterhin gibt es minimalinvasive Verfahren von Facetteninjektionen bis Chemonukleolyse. Zur operativen Therapie gibt

es verschiedene Maßnahmen. Das Standardverfahren zur operativen Sanierung eines lumbalen Bandscheibenvorfalls ist der dorsale Zugang mit interlaminärer Fensterung und Entfernung des Sequesters (Börm et al., 2005). Die offene Sanierung ist laut Studien der Chemonukleolyse überlegen (Gibson, Grant, & Waddell, 2000). Das mikrochirurgische Verfahren dient der Schonung von umliegendem Gewebe. Dabei wird mithilfe von mikroskopischer Vergrößerung und einem kleineren Zugang der Sequester entfernt (Caspar, 1977; Maroon, Onik, & Sternau, 1989). Der zervikale Bandscheibenvorfall wird meist durch eine anteriore, zervikale Diskektomie und Fusion saniert (Fraser & Härtl, 2007; Gao et al., 2013; Papavero et al., 2010).

#### 1.2.4 Ursachen für Degeneration und Prolaps des Discus intervertebralis

Der physiologische Prozess der Alterung begünstigt die Pathogenese des Bandscheibenvorfalls, ist jedoch nicht die alleinige Ursache (Hadjipavlou et al., 2008). Es gibt mehrere Faktoren, die dafür diskutiert werden. Hierzu zählen Alter, genetische Faktoren, Ernährung des Discus, toxische Faktoren wie Nikotin, metabolische Ungleichgewichte wie beispielsweise Diabetes mellitus oder auch niedriggradige Infektionen (Hadjipavlou et al., 2008).

Die Zellzahlen im Discus intervertebralis sinken während des physiologischen Alterungsprozesses (Nerlich et al., 1997). Die Anzahl der Proteoglykane wird geringer, sie werden kleiner (Buckwalter, 1995; Johnson, Berryman, Mitchell, & Wood, 1985) und weniger stark vernetzt (Johnstone & Bayliss, 1995). Der Kollagentyp wechselt von Typ II zu Typ I und auch die Kollagenmenge sinkt, wodurch der Nucleus pulposus vermehrt fibrosiert (Haefeli et al., 2006). Ebenfalls steigt die Anzahl der Nicht-Kollagen Proteine (Hadjipavlou et al., 2008). Insgesamt verhärtet sich der Kern, er wird trockener und granulös (Vernon-Roberts & Pirie, 1977). Der Faserring hingegen bekommt verbreiterte Kollagenlamellen mit vielen Fibrillen. Bei der Entstehung kann es zu Rissen kommen (Buckwalter, 1995). Woher all diese Veränderungen kommen, ist bisher nicht erforscht (Hadjipavlou et al., 2008).

Die Ernährung des Discus intervertebralis erfolgt mittels Diffusion und Konvektion (Katz, Hargens, & Garfin, 1986; Urban et al., 2004), da der Discus keine Blutgefäße enthält (Hadjipavlou et al., 2008; Holm et al., 1981; Maroudas et al., 1975; Urban et al., 2004).

Die nächsten Blutgefäße sind einige Millimeter von der Bandscheibe entfernt (Katz et al., 1986). Umso höher der Wassergehalt, desto einfacher diffundieren die Nährstoffe (Roberts, Urban, Evans, & Eisenstein, 1996).

Mit zunehmendem Alter der Bandscheiben verringert sich die Speicherkapazität für Wasser. Durch den geringeren Wassergehalt können größere Nährstoffe nicht mehr diffundieren und den Nucleus erreichen (Roberts et al., 1996).

Die Gefäße an der Knochen-Knorpel-Grenze verschwinden bereits nach der ersten Lebensdekade (Nerlich et al., 1997; Roberts et al., 1996). Durch Kalzifizierung der Endplatte verschließen sich auch die Gefäßöffnungen dort und der Nährstofftransport wird erschwert (Nerlich et al., 1997; Roberts et al., 1996).

Der entstehende Nährstoffmangel führt zu oxidativem Stress, bereits sichtbar im Nucleus pulposus von jungen Patienten (Nerlich et al., 1997).

Ein niedriger pH-Wert und ein geringes Sauerstoffniveau führen zu einer verringerten Protein- und Proteoglykansynthese (Ohshima & Urban, 1992). Außerdem sinkt die Zahl der vitalen Zellen (Horner & Urban, 2001).

Zu den toxischen Einflüssen gehört das Nikotin. Es hemmt direkt die Zellproliferation des Discus und die Synthese von extrazellulärer Matrix. Dies wurde in einer in vitro Anzucht von Rinderzellen aus dem Nucleus pulposus nachgewiesen. (Akmal et al., 2004)

Außerdem beeinflusst Nikotin negativ die Kollagen-Genregulierung (Uei et al., 2006). Auch metabolische Erkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus begünstigen die Degeneration des Discus intervertebralis (Robinson, Mirovsky, Halperin, Evron, & Nevo, 1998).

Es spielen ebenfalls mechanische Beanspruchungen eine Rolle in der Diskusdegeneration. Hier sind vor allem Vibration, Torsion und Kompression zu nennen (Hadjipavlou et al., 2008). Des Weiteren sind niedriggradige Infektionen und neurogene Inflammationen sowie Autoimmunprozesse relevant (Hadjipavlou et al., 2008).

So zeigt eine Studie von Stirling, Worthington et al. (2001), dass niedriggradige bakterielle Infektionen, die nicht zu einer Entzündung führen, bei Bandscheibenpatienten vorkommen (Stirling, Worthington, Rafiq, Lambert, & Elliott, 2001). Es lassen sich bakterielle Nukleinsäuren im sequestrierten Bandscheibenmaterial nachweisen. Bei den detektierten Bakterien handelt es sich in

den meisten Fällen um das Propionebakterium *acne*, welches zur dermatologischen Flora gehört (Stirling et al., 2001). Eine Folgestudie von Fritzell, Bergström et al. konnte das Vorkommen des Propionebakterium *acne* mittels PCR-Nachweis jedoch nicht bestätigen (Fritzell, Bergström, & Welinder-Olsson, 2004). In Bezug auf virale niedriggradige Infektionen untersuchten Alpantaki, Katonis et al. die Fragestellung, ob ebenfalls virale DNA im prolabierten Bandscheibenmaterial nachweisbar ist (Alpantaki et al., 2011). In der Untersuchung wurden Herpesviren nachgewiesen. Diese sind aufgrund ihrer neurotrophen Eigenschaften von besonderer Relevanz (vgl. Kapitel 1.3) (Cook, Bastone, & Stevens, 1974; Diefenbach, Miranda-Saksena, Douglas, & Cunningham, 2008; Galloway, Fenoglio, Shevchuk, & McDougall, 1979; Gilden et al., 2001).

### 1.3 Viren im Allgemeinen

Viren sind subzelluläre Partikel, die nur innerhalb von Wirtszellen replizieren, sie sind obligat parasitär (Marsh & Helenius, 2006). Das Virion, also das Viruspartikel, besteht aus Nukleinsäuren (DNA oder RNA) (Crick & Watson, 1957), Proteinen (Tegument) und teilweise Lipiden (Suerbaum, Burchard, Kaufmann, & Schulz, 2016; Whitley, Kimberlin, & Roizman, 1998). Manche Viren sind zusätzlich von einer Lipidhülle umgeben (Whitley et al., 1998). Für die Replikation sowie die Proteinbiosynthese benötigt das Virus die Wirtszelle (Lanzrein, Schlegel, & Kempf, 1994).

Einige Viren sind neurotrop und infizieren vorrangig Nervenzellen (Rechenchoski, Faccin-Galhardi, Linhares, & Nozawa, 2017; Whitley et al., 1998). Die Bandscheibe hat eine besondere Nähe zum Rückenmark, was die These nahelegt, dass neurotrophe Viren auch im avaskulären Bandscheibengewebe vorhanden sein könnten (Alpantaki et al., 2011). Die Studie aus Griechenland ergibt, dass hierbei vor allem die Familie der Herpesviren von Relevanz ist (Alpantaki et al., 2011).

### 1.3.1 Herpesviren

Herpesviren besitzen lineare, doppelsträngige DNA mit einem Molekulargewicht von  $99 \pm 5 \times 10^6$  Dalton (Kieff, Bachenheimer, & Roizman, 1971). Sie bestehen aus dem DNA enthaltenden Core Protein, dem Tegument, dem Kapsid und einer Hülle (Mettenleiter, 2002; Whitley et al., 1998). Nach einer Primärinfektion verbleiben Herpesviren an unterschiedlichen Latenzorten im Wirt. Zur Familie der Herpesviren gehören circa 170 verschiedene Typen - acht davon sind humanpathogen. Diese werden in der Gruppe der humanpathogenen Herpes Viren (HHV) kategorisiert (Arvin et al., 2007).

HHV 1 und 2 werden auch als Herpes-simplex-Virus (HSV) 1 und 2 bezeichnet. HSV-1 verursacht vorrangig Lippenherpes und HSV-2 Herpes genitalis. HHV-3 oder Varicella-Zoster-Virus (VZV) ist der Erreger von Windpocken und Gürtelrose. HHV-4, das Epstein-Barr-Virus (EBV), verursacht Pfeiffersches Drüsenfieber (Mononucleose) mit Lymphknotenschwellungen und Splenomegalie. Eine Infektion mit HHV-5 oder auch Zytomegalievirus (CMV) verläuft bei immunkompetenten Personen meist asymptomatisch. Während der Schwangerschaft kann besonders eine Erstinfektion auf den Fetus/Embryo übertragen werden. Unter Immunsuppression kann es zu schweren Manifestationen von Primärinfektionen oder Reaktivierungen einer bestehenden CMV-Infektion kommen. HHV-6 ist der Erreger des Exanthema subitum während HHV-8 mit dem Kaposi-Sarkom assoziiert ist. (Suerbaum et al., 2016)

Herpesviren lassen sich in Alpha-, Beta- und Gammaviren einteilen. HHV-1-3 sind Alphaherpesviren. Sie sind neurotrope Viren und nutzen sensorische Ganglienzellen als Latenzort. Eine weitere Untergruppe sind die Betaherpesviren - sie sind lymphotrop und zu dieser Gruppe gehören HHV-5, -6 und -7. (Suerbaum et al., 2016)

HHV-4 (EBV) und HHV-8 sind Gammaherpesviren. Diese sind wie die Betaherpesviren lymphotrop, befallen also vermehrt lymphatisches Gewebe. Zusätzlich besitzen sie onkogenes Potential. (Liu & Zhou, 2007)

Herpesviren zeigen eine sehr hohe Seroprävalenz in der deutschen Bevölkerung. So ergab eine Studie des Robert Koch-Instituts von 1998 eine Seropositivität für HSV-1 von 81,8 % (79,9–83,6 %, 95 % KI) in den alten Bundesländern sowie 85,5 % (83,4–87,3 %, 95 % KI) in den neuen Bundesländern. HSV-2 hingegen lag bei 12,6 % (10,7–14,5 %, 95 % KI) in den alten Bundesländern und 16,5 % (14,1–18,9 %, 95 % KI) in

den neuen Bundesländern. (Hellenbrand, Thierfelder, Müller-Pebody, Hamouda, & Breuer, 2005)

Die Seroprävalenz von VZV (HHV-3) ist in den letzten Jahren stark gesunken. Seit 2004 gibt es von der STIKO eine Impfeempfehlung. In den Jahren 2004 bis Anfang 2016 sank die Zahl der Primärinfektionen um 85 %. Bis 2004 lag die Seroprävalenz im Erwachsenenalter laut Robert Koch-Institut bei circa 95 %.<sup>2</sup>

Eine Studie von Wutzler et al aus dem Jahr 2001, somit vor der Impfeempfehlung datiert, untersuchte 4602 Personen von 0 - 70 Jahren auf VZV-IgG-Antikörper. Dabei ließen bei bereits 94,2 % der zehn- bis elfjährigen und nahezu bei allen über 40jährigen Testpersonen Antikörper gegen VZV nachweisen. (Wutzler, Färber, Wagenpfeil, Bisanz, & Tischer, 2001)

Für CMV gibt es keine populationsbezogene, repräsentative Studie zur Seroprävalenz. Bei einer Untersuchung von Blutspendern in Gießen zwischen 1992 und 2002 ergaben sich Seroprävalenzen von 46 %.<sup>3</sup> Die CMV-Prävalenz von Schwangeren in Deutschland liegt bei ca. 42 % (Enders et al., 2012). Allgemeinen Schätzungen zufolge liegt die Seroprävalenz in Industrienationen bei 40-70 %, in Afrika sogar bei bis zu 100 % (Cannon, Schmid, & Hyde, 2010).

### 1.3.2 Weitere relevante Viren

Neben den Herpes Viren wurden in unserer Studie Enteroviren und Parvovirus B19 untersucht.

Die Auswahl dieser Viren erfolgte unter folgenden Kriterien: Enteroviren sind neurotrope Viren (Alexander Jr, Baden, Pallansch, & Anderson, 1994; Rotbart, 1995) und könnten daher ebenso wie die Alphaherpesviren die bandscheibennahen Ganglienzellen als Wirtszelle nutzen. Parvovirus B19 hingegen ist nicht neurotrop (Heegaard & Brown, 2002). Es befällt erythroide Vorläuferzellen des Knochenmarks und nutzt diese als Wirtszelle zur Replikation (Söderlund-Venermo, Hokynar, Nieminen,

---

<sup>2</sup> Mitteilung des Robert Koch-Instituts, Ratgeber für Ärzte „Windpocken, Herpes Zoster“ aufgerufen am 25.03.2020:

[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Varizellen.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Varizellen.html)

<sup>3</sup> Mitteilung des Robert Koch-Instituts, Ratgeber für Ärzte aufgerufen am 25.03.2020: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Zytomegalievirus.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalievirus.html)

Rautakorpi, & Hedman, 2002). Parvovirus B19 scheint in verschiedenen Geweben wie beispielsweise Herz, Lunge, Leber, Nieren und Hoden zu persistieren, nutzt hierfür jedoch andere Mechanismen wie Herpesviren (Söderlund-Venermo et al., 2002). Ein Review verschiedener Studien von Verdonschot legt dar, dass einige Theorien und Studien zum Nachweis von Parvovirus B19 in Myokarditis-Patienten vorliegen. Einzelne Studien zeigten das Virusvorkommen in Endomyokardzellen von Patienten mit Myokarditis, während das Virus in gesunden Kontrollgruppen nicht nachgewiesen werden konnte (Klein et al., 2004; Pankuweit et al., 2003; Verdonschot et al., 2016). Andere Studien konnten keinen Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe belegen (Nielsen, Hansen, Nielsen, Baandrup, & Banner, 2014; Schenk, Enders, Pollak, Hahn, & Huzly, 2009).

Enteroviren gehören zur Gattung der Picornaviren (Oberste et al., 2000). Das sind kleine, unbehüllte RNA-Viren. Sie sind weitestgehend umweltresistent (Bock, Klingel, & Kandolf, 2010). Ursprünglich wurden die 64 humanpathogenen Enteroviren (HEV) in fünf Untergruppen unterteilt: Polioviren, Cocksackie A, Cocksackie B, Echoviren und die Enteroviren 68 bis 71. Dabei waren die Antigeneigenschaften für die Einteilung entscheidend (Caro, Guillot, Delpeyroux, & Crainic, 2001). Eine neue Einteilung unterscheidet die humanpathogenen Enteroviren in Gruppen HEV A bis D und Polioviren. Dabei gliedern sich die Gruppen nach molekularer und biologischer Information (Caro et al., 2001).

Parvovirus B19 gehört zur Gruppe der Parvoviridae. Es ist ein kleines, unbehülltes Einzelstrang-DNA-Virus. Parvovirus B19 verursacht das Erythema infectiosum - die Ringelröteln. Die Erkrankung tritt meist im Kindesalter auf. Bei Immunkompetenten Patienten kann die Erkrankung klinisch stumm verlaufen, bei Patienten mit Immunsuppression können schwere Krankheitsverläufe mit dauerhaften Anämien vorkommen. Eine Infektion während der Schwangerschaft kann zum Hydrops fetalis führen. Die Übertragung erfolgt mittels Tröpfcheninfektion. Das Virus befällt Vorläuferzellen der Erythrozyten und vermehrt sich in diesen. (Suerbaum et al., 2016) Nach einem aktuellem Review zu Parvovirus B19 von Rogo, Mokhtari-Azad, Kabir und Rezaei liegt die weltweite Durchseuchung mit Parvovirus B19 zwischen 70-85 % (Rogo, Mokhtari-Azad, Kabir, & Rezaei, 2014).

#### 1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um Viren nachzuweisen, gibt es unterschiedliche Verfahren. Virale DNA und RNA wird überwiegend mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) detektiert (Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996; Lallemand, Desire, Rozenbaum, Nicolas, & Marechal, 2000).

Die PCR wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt. Sie ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Dazu bindet die DNA-Polymerase an spezifische Primer und synthetisiert anhand der DNA-Matrize dazugehörige Zielsequenzen (Mullis & Faloona, 1987). Die Primer bestehen aus bestimmten Oligonukleotidsequenzen, die komplementär zu den zu amplifizierenden DNA-Strängen sind. Die PCR wiederholt sich stets und repliziert die bereits neusynthetisierte DNA. Somit kommt es bei optimalen Reaktionsbedingungen zu einem exponentiellen Wachstum (Garibyan & Avashia, 2013; Gibbs, 1991). Die Polymerasekettenreaktion gliedert sich in mehrere Einzelschritte. Hierbei benötigt sie unterschiedliche Temperaturen für die jeweiligen Reaktionen. Zunächst wird die zu amplifizierende DNA bei 95°C denaturiert. Hierbei trennt sich der Doppelstrang in zwei Einzelstränge auf. Diese Einzelstränge dienen später als Matrizen - auch Templates genannt - für die Amplifizierung. Im zweiten Reaktionsschritt erfolgt die Hybridisierung (Annealing). Dabei lagern sich die Primer an die Templates an. Dazu werden Temperaturen von circa 60°C benötigt. Es gibt zwei Primer - einen forward und einen reverse Primer. Diese beiden rahmen die zu amplifizierende Zielsequenz ein. Nachfolgend beginnt die Extension, ausgehend von beiden Primern. In 5'-3' Richtung synthetisiert die DNA-Polymerase mit Hilfe von freien dNTPs einen Komplementärstrang zur Ausgangs-DNA. Danach beginnt der Reaktionszyklus erneut. Hierzu wird wieder ein Temperaturoptimum von circa 90-95°C benötigt. Im Laufe der Jahre wurde das Verfahren modifiziert und einzelne Schritte zusammengefasst. Durch den Einsatz von hitzestabilen DNA-Polymerasen entfällt die Enzymsubstitution vor jedem Extensionszyklus. Das hitzestabile Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) besitzt eine solche Polymerase, die häufig Anwendung findet (Saiki et al., 1988). Die Polymerase hat ihr Temperaturoptimum bei ca. 75°C (Innis, Myambo, Gelfand, & Brow, 1988), bleibt jedoch kurzzeitig auch bei über 90°C aktiv (Lawyer et al., 1993). Zusammenfassend werden für die PCR benötigt: hitzestabile DNA-Polymerasen, DNA-Matrizen, Primer und dNTPs.

Bei der TaqMan-PCR bindet eine sequenzspezifische Sonde zwischen den Primern an die spezifische DNA (s. Abbildung 2). Die Sonde trägt am 5'Ende ein Fluorophor

als Reporter und am 3' Ende einen Quencher. Durch die räumliche Nähe dieser kommt es zunächst zu keinem Fluoreszenzsignal. Erst nach Abspaltung des Reporters durch den Forward-Primer entsteht ein Signal. Durch Messung der Fluoreszenz kann ein quantitativer DNA-Nachweis stattfinden (vgl. Kapitel 3.8.1).

Zur Amplifikation von RNA mittels TaqPCR wird diese zunächst unter Einsatz der Reversen Transkriptase in cDNA umgewandelt und anschließend durch die PCR vermehrt (Saiki et al., 1988).

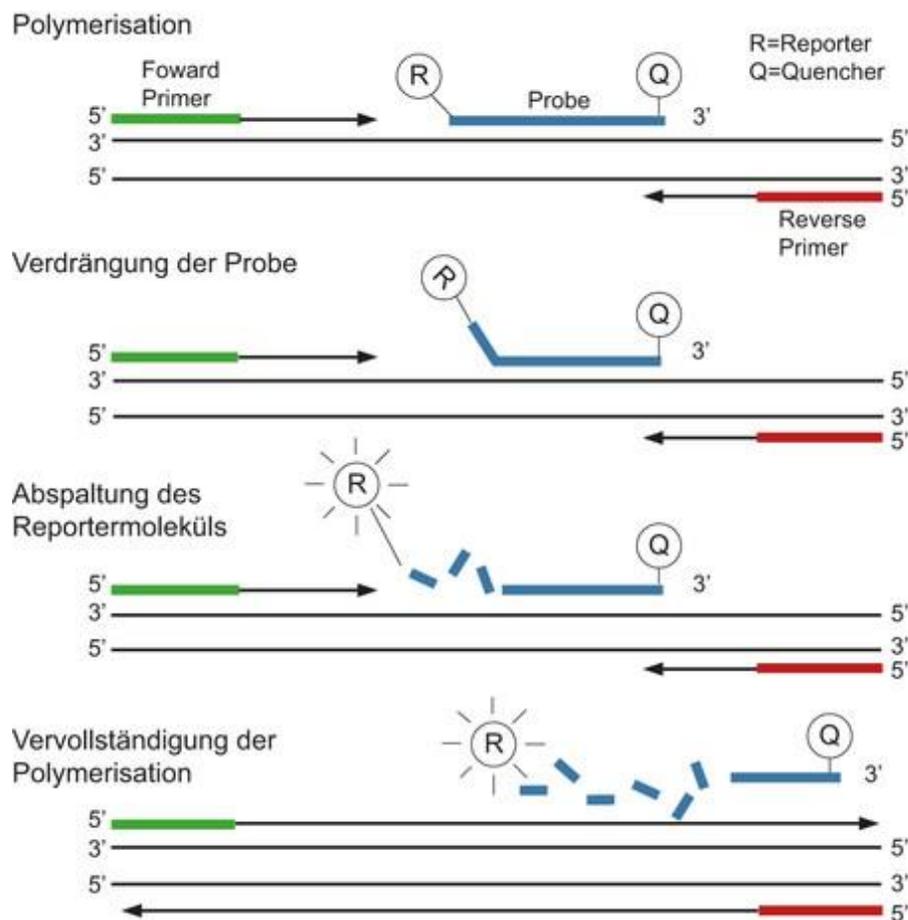


Abbildung 2: Ablauf der TaqMan-PCR: Von der Bindung des Primers bis zur Abspaltung des Reporters und Bildung des Fluoreszenzsignals<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Abbildung des MVZ Martinsried, aufgerufen am 25.03.2020: <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr>

## 1.5 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Der enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)-Test dient dem Nachweis von Antikörpern. Er wurde zu Beginn der 1970er Jahre von Engvall & Perlmann (Engvall & Perlmann, 1971, 1972), sowie von Van Weemen & Schurs (A. Voller, Bidwell, & Bartlett, 1976) entwickelt. Die Eigenschaft von Antikörpern mit Antigenen zu reagieren wird sich hierbei zunutze gemacht. Zusätzlich ist die Reaktion an eine Enzymreaktion gekoppelt, die eine Hydrolyse verursacht (A. Voller et al., 1976). Man unterscheidet qualitative von quantitativen Antikörpernachweisen, sowie direkte und indirekte ELISA Formen. Das sensitivere ELISA Format ist der Sandwich-ELISA. Die direkte Methode besteht aus einem an eine Platte fixierten Antigen, das mit einem Antikörper reagiert. An diesen Antikörper ist eine Enzymreaktion gekoppelt, die nach der Antigen-Antikörper-Bindung abläuft. Die indirekte Form enthält einen weiteren Reaktionsschritt. Dabei bindet an den ersten Antigen-Antikörper-Komplex noch ein weiterer Antikörper. Dieser ist an eine enzymatische Reaktion gebunden (Abbildung 3). (A. Voller et al., 1976)

Die bislang sensitivste Methode ist die doppelte Antikörper-Sandwich-Methode. Dabei bindet das Antigen zunächst an einen an einer Platte fixierten Antikörper. In einem zweiten Schritt bindet der zu detektierende Antikörper an das bereits gebundene Antigen. An diesen wiederum bindet ein weiterer Antikörper, der an eine Enzymreaktion gekoppelt ist (Abbildung 3). (A. Voller, Bartlett, & Bidwell, 1978)

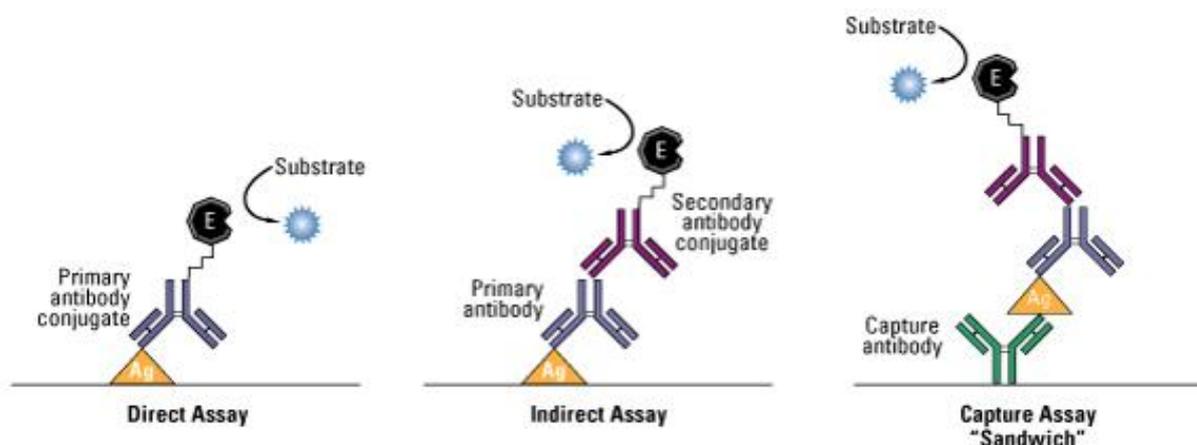


Abbildung 3: Unterschiedliche ELISA-Formate<sup>5</sup>

<sup>5</sup> Abbildung von thermofisher aufgerufen am 25.03.2020:  
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/ELISAFormats575x214.jpg>

## 2 Problemstellung

Wie in Kapitel 1.2.4 beschrieben, sind die Ursachen von Bandscheibenvorfällen nicht vollständig geklärt. Es gibt unterschiedliche Erklärungsansätze, die momentan diskutiert werden. Wie bereits ausgeführt liegen zu einigen Thesen fundierte Studien vor, während andere noch wenig untersucht wurden. Niedriggradige Entzündungen (low-grade inflammation) sind eine mögliche Ursache. Diesbezüglich wurde das Propionebakterium *acne* identifiziert (Stirling et al., 2001) und als Folge ein degenerativer Umbauprozess nachgewiesen (Dudli et al., 2016). Der Nachweis von Bakterien erlaubt die Fragestellung ob auch Viren in den avaskulären Disci intervertebralis vorkommen.

In Griechenland wurde von Alpentaki et al. an der Universität von Kreta, Heraklion, eine Studie zu Herpesviren in Disci intervertebralis durchgeführt (vgl. Kapitel 1.2.4) (Alpentaki et al., 2011). In dieser Studie wurden 16 Bandscheibensequester von prolabierte Bandscheiben intraoperativ entfernt und im Anschluss mittels PCR auf Herpesviren untersucht. Als Kontrollen wurde Bandscheibenmaterial von zwei Patienten mit traumatischen Bandscheibenverletzungen ohne Prolaps analysiert. (Alpentaki et al., 2011)

Zusätzlich wurden Serumproben der Patienten auf Herpesvirenantikörper bestimmt. In 13 der untersuchten 16 Patienten wurden Herpesviren mittels PCR nachgewiesen. Die meisten Patienten wiesen HSV-1 auf, insgesamt neun der untersuchten Sequester (56,25 %). Das am zweithäufigsten detektierte Virus war CMV in sechs aus 16 Patientenproben (37,5 %). In zwei Fällen wurde eine Co-Infektion von CMV und HSV festgestellt. Andere Viren wurden nicht nachgewiesen. In beiden Kontrollproben wurden keine viralen Nukleinsäuren gefunden. (Alpentaki et al., 2011)

Die Serumanalyse erfolgte mittels IgG und IgM Antikörpertestung. Lediglich die IgG Testungen fielen positiv aus, weshalb davon auszugehen ist, dass keine akute Herpesinfektion zum Zeitpunkt der Untersuchung vorhanden war. Bei allen Patienten mit Virusnachweis im Sequester wurde auch die Serumprobe positiv bestätigt. Zusätzlich konnten drei weitere HSV positive Serumproben und sechs weitere CMV-Serumproben nachgewiesen werden. (Alpentaki et al., 2011)

Diese Ergebnisse lassen die Frage zu, ob Herpesviren, wenn sie im avaskulären Bandscheibengewebe aufzufinden sind, auch für eine niedriggradige Infektion

verantwortlich sein können. Könnte diese Infektion das Bandscheibengewebe in solch einem Maße schädigen, dass es zu einem Bandscheibenvorfall führen könnte?

Um die Ergebnisse der griechischen Studie zu verifizieren, wurde die vorliegende HEVIDI-Studie (HErpes Virus in Intervertebral Disc) entworfen. Die vorliegende Studie behandelt die Fragestellung, inwieweit sich diese Ergebnisse in einer Untersuchung mit einem größeren Patientenkollektiv bestätigen lassen. Um den Studienaufbau zu komplettieren werden zusätzlich zu Herpesviren auch Parvovirus B19 und Enteroviren untersucht (vgl. Kapitel 1.3.2). Zudem werden IgG-Antikörper gegen Parvovirus B19 im Serum der Patienten bestimmt.

In vorliegender Studie soll die Relevanz von Herpesviren sowie von Parvovirus B19 und Enteroviren für Bandscheibenvorfälle untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

Die Durchführung der Untersuchungen erfordert zuerst die Rekrutierung von Patienten und die Beschaffung des Sequestermaterials. Danach folgen die Nukleinsäure-Extraktion, Polymerasekettenreaktion sowie die serologische Antikörpertestung. Im Folgenden werden die für die Studie notwendigen Untersuchungen detailliert erläutert.

#### 3.1 Geräte und Material

Um die Untersuchungen durchzuführen werden unterschiedliche Geräte und Materialien benötigt.

##### 3.1.1 Geräte

###### Liste der verwendeten Geräte

7500 Real time PCR System (TaqMan) - Applied Biosystems/ThermoFisher (Waltham, MA USA)

Abbott Architect - Abbott Diagnostics (Lake Forest, Illinois, USA)

Abbott Molecular, m2000 Real Time systems Extraktionsautomat M2000 RT- Blood Extraktionsprotokoll (Des Plaines, Illinois, USA)

BEP 2000 Advance® - Siemens (München, Deutschland)

Enzygnost® - Siemens Healthliners (Erlangen, Deutschland)

Gefrierschrank Liebherr G5216 Comfort - Liebherr (Bulle, Schweiz)

Laminar Flow Biowizard Silverline - Kojair (Tampere, Finnland)

Novagnost® - Nova Tec Immundiagnostica GmbH (Dietzenbach, Deutschland)

Pipette - Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

SAP - SAP Deutschland SE & Co. KG (Walldorf, Deutschland)

Tischzentrifuge 5417- Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

UV-Box: DNA/RNA UV Cleaner - Kisker (Steinfurt, Deutschland)

Vortexer: Vortex2 Genie - Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA)

### 3.1.2 Reagenzien

#### Liste der verwendeten Reagenzien

Enzygnost-Kit - Siemens Healthliners (Erlangen, Deutschland)

Natriumchlorid-Lösung 0,9% - Fresenius (Bad Homburg, Deutschland)

Novagnost Kit - Nova Tec Immundiagnostica GmbH (Dietzenbach, Deutschland)

Primer - Microsynth (Balgach, Schweiz)

Qiagen RNA<sup>later</sup> - Qiagen, (Venlo, Niederlande)

Sonde - Microsynth (Balgach, Schweiz)

TaqMan Universal PCR Master Mix - Thermofisher (Waltham, MA USA)

Zusatz-Reagenzien für Enzygnost - Siemens Healthliners (Erlangen, Deutschland)

### 3.2 Studienaufbau

Die HEVIDI-Studie dient der Überprüfung des Vorkommens von Viren in avaskulärem Bandscheibengewebe. HEVIDI (HErpes Virus in Intervertebral Disc) ist nach den Kriterien einer nicht randomisierten, unizentrischen und prospektiven Studie aufgebaut und untersucht die Virusdurchseuchung prolabierter Bandscheibensequester. Für den Aufbau wurde die griechische Studie von Alpantaki, Katonis et al. als Grundlage genutzt und diese erweitert. Die angestrebte Fallzahl umfasst 50 Patienten der neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar mit operationsbedürftigem Bandscheibenvorfall. Das bei der Operation entfernte Bandscheibenmaterial wird steril und tiefgefroren bei -20°C bis zur Extraktion im Institut für Virologie der Technischen Universität München eingelagert. Es folgen die Nukleinsäure-Extraktion und Virus-PCR, durchgeführt vom Institut für Virologie. Ergänzend wird bei jedem Patienten eine serologische Untersuchung auf virusspezifische Antikörper durchgeführt. Die Auswahl der zu untersuchenden Viren erfolgte bereits im Vorfeld anhand unterschiedlicher Faktoren, wie Neurotropie oder ubiquitärem Vorkommen, wie bei Parvovirus B19. Im Folgenden wird der genaue Aufbau der Studie sowie die einzelnen Untersuchungen beschrieben.

### 3.3 Patientenkollektiv/Einschlusskriterien

Im Studienaufbau werden die Einschlusskriterien für das Patientenkollektiv wie folgt festgelegt: Es sollen 50 Patienten mit operationsbedürftigem Bandscheibenvorfall im Alter von 18 bis 65 Jahren untersucht werden. Die obere Altersgrenze liegt bei 65 Jahren um Störfaktoren wie Degeneration aufgrund von Alterungsprozessen zu minimieren.

Grundsätzlich soll es sich um ein größeres Patientenkollektiv als in der Vorstudie mit 16 Fällen handeln (Alpantaki et al., 2011). Ein Studienkollektiv von 50 Patienten wird als notwendig erachtet um eine statistische Aussagekraft über die Ergebnisse zu erlangen. Diese Fallzahlabeschätzung erfolgte gemeinsam mit dem Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München auf Grundlage der Daten durch die Arbeitsgruppe Alpantaki, Katonis et al.. Die Diagnose des Bandscheibenvorfalles erfordert den klinischen Befund, somit also das entsprechende Beschwerdebild sowie einen Nachweis mittels Magnetresonanztomographie (MRT) oder Computertomographie (CT). Bei dem Bandscheibenvorfall muss es sich um einen weichen sequestrierten Diskusprolaps der Hals-, Brust-, oder Lendenwirbelsäule mit operativem Interventionsbedarf handeln.

Nach Festlegung der Studienkriterien wurde die Studie der Ethikkommission der Technischen Universität München vorgelegt und erhielt ein positives Ethikvotum (Projektnummer: 326/13).

### 3.4 Studiendurchführung

Nach formeller Zulassung der Studie erfolgte die Patientenrekrutierung.

Innerhalb von zehn Monaten, zwischen dem 31.10.2013 und dem 17.09.2014, wurden Patienten der neurochirurgischen Klinik und Poliklinik in die Studie inkludiert. Jeder Patient mit Indikation zur Bandscheiben-OP wurde auf Ein- und Ausschlusskriterien geprüft. Bei Übereinstimmung mit den Einschlusskriterien wurden die jeweiligen Patienten über die mögliche Studienteilnahme aufgeklärt. Nach schriftlicher Einverständniserklärung erfolgte zusätzlich eine Befragung der teilnehmenden Patienten zu einigen demographischen Daten wie Alter, Gewicht und Größe. Die

Abnahme der Serumprobe zur Testung auf virale Antikörper erfolgte, wenn möglich, gemeinsam mit dem präoperativen Routinelabor. Die experimentellen Untersuchungen erforderten eine Serumuntersuchung auf HSV 1 und 2 sowie CMV, VZV und Parvovirus B19. Enteroviren wurden in der HEVIDI Studie nicht serologisch untersucht. Aufgrund der vielen Untergruppen und der damit verbundenen hohen Wahrscheinlichkeit für Antikörper (vgl. Kapitel 1.3.2) ist die Antikörpertestung im Serum obsolet. Es wurde hier lediglich ein direkter Erregernachweis mittels PCR des einzelnen Sequestermaterials durchgeführt. Die abgenommenen Serumröhrchen wurden mit einer HEVIDI-Seriennummer anonymisiert und per Sonderanforderung zur weiteren Untersuchung an die Virologie geschickt.

Die Patienten wurden sowohl im SAP (SAP Deutschland SE & Co. KG, Walldorf, Deutschland) als auch im Patientenkadex als Studienteilnehmer vermerkt und dem Kadex wurde zusätzlich ein steriles mit RNA*later* gefülltes Urotube beigelegt. Die Operation erfolgte nach Standardverfahren. Es wurde lediglich der Diskussequester akquiriert anstatt ihn, wie üblich, zu entsorgen. Der sterile Sequester wurde bei 4-8 °Celsius bis zu sieben Tage aufbewahrt. Die Haltbarkeit des RNA*later* ist nach Herstellerangaben zu diesen Bedingungen garantiert (Uhlenhaut & Kracht, 2005).

Ein- bis zweimal wöchentlich erfolgte der Transfer des Diskusmaterials in das Virologische Institut. Dort wurde das Material bei -20°Celsius asserviert (Uhlenhaut & Kracht, 2005). RNA*later* inhibiert die RNA-Ribonuklease und verhindert dadurch den Abbau von Virus-RNA (Uhlenhaut & Kracht, 2005). Somit wurde die Haltbarkeit bis zur DNA/RNA-Extraktion sichergestellt.

*Tabelle 1: Einschlusskriterien der HEVIDI-Studie*

Alter	18-65 Jahre
Befund (MRT/CT)	weicher, sequestrierter Bandscheibenvorfall
Operationsindikation	gegeben

### 3.5 Operationsverfahren

Bei den untersuchten Patienten kamen unterschiedliche Operationsverfahren zum Einsatz. Diese erfolgten nach Standard zur jeweiligen Diagnose. Im Folgenden soll ein Protokoll einer Standardoperation zu BSV im Lumbalbereich beispielhaft erläutert werden:

*„Lagerung des Pat. in modifizierter Knie-Brust-Lage. Perioperative Antibiotikaphylaxe. Durchleuchtungsmarkierung der Etage LWK4/5. Hautentfettung mit Benzin. Steriles Abwaschen und Abdecken des Zugangsbereiches. Hautschnitt scharf median. Scharfe Präparation des subkutanen Fettgewebes. Koagulation. Paramediane Faszieninzision rechtsseitig und subperiostales Abschieben der Erector trunci-Muskulatur. In der Tiefe trifft man auf einen Halbbogen, dieser wird caudal markiert. Eindeutig wird das Segment LWK4/5 in der Durchleuchtung verifiziert. Einstellen des OP-Mikroskops. Mit der Rosenkopffräse, sowie dann auch mit der Diamantfräse, wird der Halbbogen LWK4 ausgedünnt. Dies bis die Ansatzstelle in das L. flavum hinter dem Halbbogen freigelegt ist. Mediane Dekompression und Flavektomie mit der Stanze bis an den Halbbogen LWK5 heran. Über dem Bandscheiben-Fach zeigt sich eine massive Raumforderung ventral des Duralschlauches, so dass hier sehr vorsichtig mit der 2er und 3er Stanze gearbeitet werden muss. Ebenfalls lateral Dekompression vom hinteren Halbbogen LWK4 nach caudal an den Halbbogen LWK5. Auch hier zeigt sich diese massive, ventral des Duralschlauches gelegene Raumforderung. Es kann der Duralschlauch medialisiert werden. Hierbei zeigen sich starke Verklebungen. Subligamentär zeigt sich der riesige BSV. Das hintere Längsband kann mit dem Dissektor eröffnet und der BSV teilweise mobilisiert werden. Aufgrund der faserigen Beschaffenheit mit teilweise Anulus fibrosus kann der BSV nur sehr mühselig und in kleinen Stücken entfernt werden. Es zeigt sich ein sehr großes Loch im Anulus fibrosus, so dass sämtliche Reste des Nucleus pulposus ausgeräumt werden und der virologischen Aufarbeitung zugeführt werden. Dies forciert, so dass sich kein Nucleus pulposus mehr entfernen lässt. Ausgiebige Spülung mit Ringerlösung. Die Nervenwurzel L5 wird noch entdacht bis weit ins Foramen hinein. Es zeigt sich alles komplett locker. Keine Blutung, Verzicht auf die Einlage einer Redon-Drainage. Schichtweiser Wundverschluss mit Fasziennaht, Subkutannaht und Anlegen von Steristrips.*

### **Zusammenfassung:**

*Komplikationslose, technisch aufwendige Sequesterektomie eines BSV LWK4/5 re. mit Nukleotomie, Ausräumen des Bandscheibenfach u. Radikolyse L5 re.“ (Zitiert nach Herrn Dr. Reinke, Bericht vom 07.01.2014)*

### 3.6 Serologie

Die Serumproben der ausgewählten 54 Patienten werden mittels Antikörpertests im virologischen Institut untersucht. Hierzu wird zunächst mittels Zentrifugation das Blutserum von den korpuskulären Blutbestandteilen getrennt.

In den Seren werden IgG mittels ELISA getestet (vgl. Kapitel 1.5). Es werden semiquantitative immunenzymatische Bestimmungen durchgeführt.

Für die serologischen Nachweise der IgG-Antikörper der Patienten werden in diesem Fall Antigene mittels EILSA präsentiert, an welche die Antikörper binden können. Es kommt zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der ELISA kennzeichnet sich dadurch aus, dass die Bindung von Antikörper und Antigen an eine enzymatische Reaktion gebunden ist. Bei der enzymatischen Reaktion kommt es zu einem Farbumschlag. Um nicht gebundene Antikörper auszuwaschen erfolgt die Zugabe von Konjugaten. Hiermit wird ein fälschlicher Farbumschlag verhindert. Die Farbintensität korreliert mit der Menge der stattgefundenen Reaktionen. Durch die Messung des Farbsignals kann eine Quantifizierung der vorhandenen Antikörper erfolgen.

Für die einzelnen AK-Nachweise werden unterschiedliche Plattformen genutzt. HSV- und VZV-Antikörper wurden mittels Enzygnost® Test (Siemens, München, Deutschland) mit dem BEP 2000 Advance System nachgewiesen. Dabei handelt es sich um ein vollautomatisiertes Analysesystem zur In-vitro-Diagnostik<sup>6</sup>. Mit diesem System kann auch der Novagnost-Test für Parvovirus B19 durchgeführt werden. Die CMV-Serologie wurde mit dem Architect Abbott Vollautomat bestimmt (Chemilumineszenz).

Die Systemhersteller liefern die für die jeweiligen Tests benötigte Kontrolle. Für den Enzygnost für HSV und VZV wird zusätzlich zur Herstellerkontrolle eine eigene

---

<sup>6</sup> Produktinformation des Herstellers, aufgerufen am 20.10.2017:  
<https://www.healthcare.siemens.de/infectious-disease-testing/systems/bep-2000-advance-system>

hergestellte Rilibäk-Kontrolle mitgeführt. Sie dient der Positivkontrolle für IgG-Antikörper und ermöglicht einen qualitativen AK-Nachweis. Novagnost liefert eine Positiv- und Negativ-Kontrolle sowie eine Cut-Off Kontrolle mit, daher wird keine weitere eigene Kontrolle benötigt. Auch der Architect von Abbott liefert eigene Kontrollen. Dieser unterscheidet nicht nur zwischen negativem und positivem AK-Nachweis, sondern differenziert auch des Weiteren zwischen niedrig- und hochpositivem AK-Nachweis und ist somit zur Qualitätssicherung ausreichend.

Die Reagenzien bestehen aus Chromogen, Waschpuffer und Konjugaten. Die Waschpuffer für den Enzygnost-Test können ebenfalls für den Novagnost-Test verwendet werden. Die Firma Siemens hat dies angeglichen. Das Chromogen ermöglicht den Farbumschlag. Die Konjugate waschen nicht-gebundene AK aus, damit diese keinen falsch-positiven Farbumschlag ergeben.

### 3.7 Nukleinsäure-Extraktion

Um mittels PCR einen möglichen Virusbefall nachzuweisen, wird zunächst die DNA/RNA extrahiert. Die Extraktion des gesamten Zellmaterials der 54 Patienten erfolgt in fünf Untersuchungsgruppen in zeitlicher Abhängigkeit zur Entnahme des Bandscheibenmaterials. Zu einer Menge von jeweils 25 mg Sequestermaterial werden je 400 µl 0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung sowie 40 µl Proteinkinase K hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 4,5 h bei 56 °C wird das Material abzentrifugiert. Danach erfolgt die Extraktion mit dem Blood 2000 Extraktions-Protokoll. Es werden je Probe 330 µl abgefüllt. Danach wird 2,4 ml Lysepuffer pro Probe plus je Extraktionszyklus 10 ml Lysepuffer zusätzlich hinzugefügt. Außerdem werden 35 µl Referenz-DNA des Prionproteins der Maus (mprp) pro Einzelextraktionsprobe sowie 140 µl der mprp-DNA pro Extraktionszyklus hinzugegeben.

Die Zugabe von mprp-DNA dient der direkten und indirekten Kontrolle (Extraktions/Inhibitionskontrolle). Durch die parallele Extraktion von mprp- und Virus-DNA/RNA kann ein korrekter Extraktionsprozess belegt werden. Dabei werden in mehreren Durchläufen die einzelnen Extraktionen durchgeführt. Die Zyklenzahl richtet sich nach dem Ct-Wert (*engl. cycle threshold*) der DNA des Mausprionproteins.

### 3.8 PCR

Wie in Abschnitt 2.4 bereits erläutert, erfolgen die Untersuchungen des Sequestermaterials und der Nachweis der Viren mittels PCR. Das Verfahren zur Amplifikation von DNA und RNA wurde seit seiner Entwicklung modifiziert und spezifiziert. In unserer Studie wird der sogenannte TaqMan Assay genutzt (Heid et al., 1996; Ingham, Beer, Money, & Hansen, 2001)

#### 3.8.1 TaqMan Assay

Die PCR erfolgt mittels TaqMan Assay. Hierbei finden Detektion und Amplifikation zeitgleich statt. Diese sogenannte Real-Time-PCR erzeugt ein Fluoreszenzsignal, welches proportional mit der PCR-Vermehrung ansteigt. Der TaqMan Assay nutzt die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase. Die AmpliTaq-Polymerase ist eine modifizierte Polymerase des *Thermus aquaticus*. Sie behält ihre Hitzestabilität und ist bei normalen Temperaturen inaktiv (vgl. Kapitel 1.4). Um sie zu aktivieren muss vor dem Beginn der PCR eine Temperaturerhöhung auf 92-95 °C für 12 Minuten stattfinden. Dadurch wird die AmpliTaq irreversibel aktiviert (Kebelmann-Betzing et al., 1998).

Die durchgeführten diagnostischen PCRs des Instituts für Virologie sind nach der 15189 Norm akkreditiert.

Für den TaqMan Assay wird ein Master Mix benötigt. Dieser enthält bis auf die Primer bereits alle nötigen PCR-Substanzen, wie dNTPS, Taq-Polymerase, Magnesiumchlorid und Pufferlösung.

In Tabelle zwei und drei wird der Ablauf der PCRs mit Zeit und Temperaturangaben dargestellt.

Die quantitativen PCRs zur Detektion von HSV, CMV; VZV, Parvovirus B19 und Enteroviren wurden im Institut für Virologie, TUM entwickelt und etabliert. Dabei wurden Primer und Sonden nach den Vorgaben für TaqMan Assays gewählt. Sie werden von Microsynth, Balgach, Schweiz bezogen.

Zur Detektion von Enteroviren wird zunächst virale RNA im gleichen PCR Ansatz in cDNA revers transkribiert (s. Tabelle 3).

*Tabelle 2: DNA-PCR-Ablauf*

1-mal	Hold I:	50°C	2 Minuten
1-mal	Hold II:	95°C	10 Minuten
45 Zyklen	Denaturierung	95°C	15 Sekunden
	Annealing/Extension	60°C	1 Minute

*Tabelle 3: RNA-PCR-Ablauf*

1-mal	Hold I:	50°C	20 Minuten
1-mal	Hold II:	95°C	5 Minuten
45 Zyklen	Denaturierung	95°C	15 Sekunden
	Annealing/Extension	60°C	45 Sekunden

### 3.8.2 Zellzahlbestimmung

Um sicherzustellen, dass Bandscheibensequester genügend Zellen enthalten, wurde deren Zahl durch Quantifizierung des humanen Prionprotein (hPrP) bestimmt. Das Prionprotein Gen ist in jeder Zelle zweimal enthalten. Ct-Werte < 33,4 zeigen eine ausreichende Zellzahl in der Biopsie für aussagekräftige virale PCR Ergebnisse an.

### 3.8.3 Erklärung verschiedener Größen

Bei den unterschiedlichen virologischen Untersuchungen wie PCR und ELISA gibt es verschiedene relevante Messgrößen und Werte. Vor allem bei der PCR ist es erforderlich verschiedene Messwerte zu kennen und zu interpretieren. Der TaqMan Assay gibt Auskunft über Baseline, Threshold, Ct-Werte und Slope. Diese Größen sollen hier kurz erklärt werden (vgl. Kapitel 1.4).

## Baseline

Die ersten Zyklen der real-time PCR ergeben meist nur wenige Änderungen des Fluoreszenzsignals. Dieses minimale Signal wird als „noise“ oder „background“ bezeichnet. Die Baseline (oder Grundlinie) wird so gesetzt, dass möglichst viel des „backgrounds“ eliminiert wird. Jedoch sollte die Baseline nicht die Zyklen inkludieren, bei denen die Amplifikation über das Niveau des „backgrounds“ steigt. Die Baseline sollte in den verschiedenen PCR-Experimenten gleich bestimmt werden. Hier wurde eine Baseline zwischen 6 und 15 gewählt.

## Threshold

Der Threshold (Schwellenwert) wird so gesetzt, dass sich relevante PCR-Amplifikationen vom background abheben. Dieser wird normalerweise mit einer 10-fachen Standardabweichung des Fluoreszenzniveaus der Baseline automatisch eingesetzt (Abbildung 4).

## Ct-Wert

Als Ct-Wert (*engl. cycle threshold*) wird die Zyklenanzahl bezeichnet, bei der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal den Threshold übersteigt (Abbildung 4), also der Wert, bei dem ein detektierbares Fluoreszenzsignal gemessen wird. Der Ct-Wert kann dazu genutzt werden, die DNA-Menge zu Beginn der PCR zu berechnen. Er ist indirekt proportional zur DNA-Ausgangsmenge: Umso größer der Ct-Wert ist, desto kleiner war die detektierbare DNA-Menge in der Probe und umgekehrt.

Anhand einer Standardreihe von mindestens fünf Verdünnungsstufen kann ein Richtwert/Sollwert ermittelt werden.

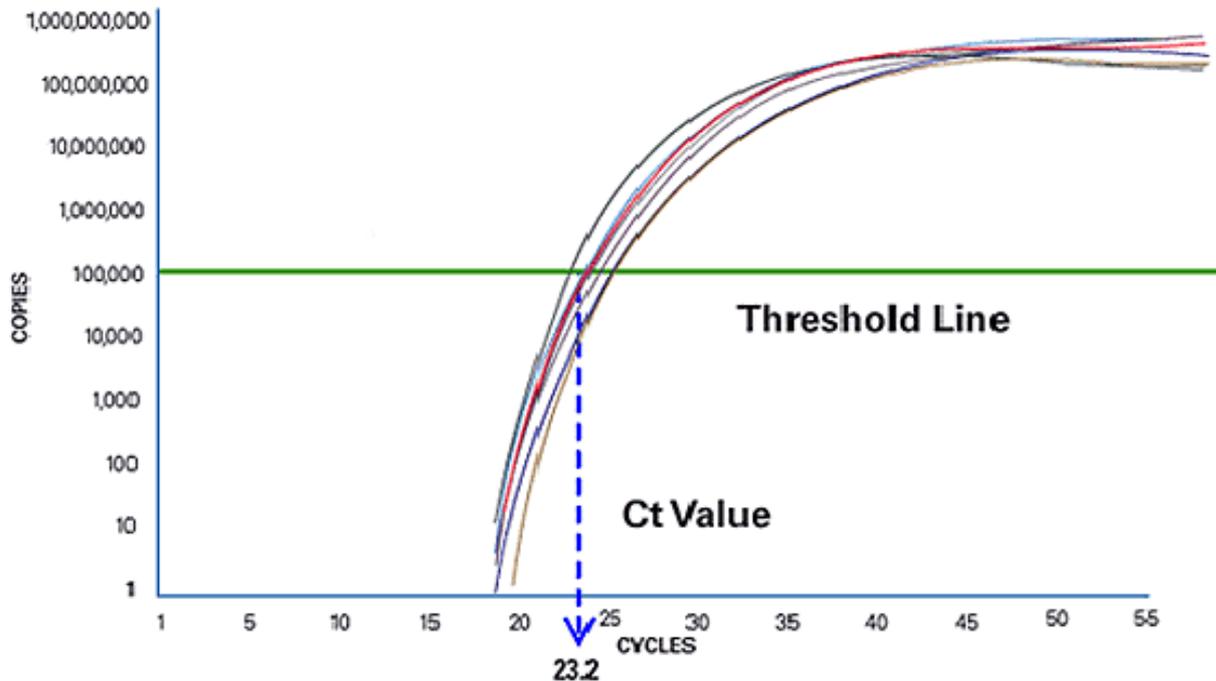


Abbildung 4: CT-Wert und Threshold<sup>7</sup>

## Slope

Der Slope, die Steigung der linearen logarithmischen (log) Phase, misst die Genauigkeit jeder Amplifikation. Für eine 100 %ige Effizienz der Amplifikation sollte die Steigung -3.32 betragen. Bei allen PCR-Ergebnissen lagen die Slope-Werte zwischen -3.15 und -3.74.

### 3.8.4 Quantitative PCR und Standardkurve

Die Messung der Quantität erfolgt beim TaqMan Assay mithilfe von Fluoreszenzsignalen und der Messung der Ct-Werte. Dabei werden zunächst die Ct-Werte in einer Standardkurve festgelegt. Diese können mittels Verdünnungsreihe ermittelt werden.

<sup>7</sup> Abbildung zum Ct-Wert aufgerufen am 25.03.2020:  
<https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/originals/d0/96/23/d0962306e8f7d2603b75417a81b3d818.jpg>

### 3.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung wird das Programm SPSS verwendet. Die Daten wurden vom Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München geprüft. Die in der klinisch-experimentellen Doktorarbeit erhobenen Daten erlauben eine deskriptive Statistik, sowie bei einzelnen Fragestellungen unterschiedliche Testverfahren zum Vergleich parametrischer Daten.

### 3.10 Signifikanzniveau und statistische Tests

Das Signifikanzniveau der statistischen Testungen wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt. Zur statistischen Berechnung werden der T-Test und der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Der T-Test wird in der Studie zur Berechnung der statistischen Unterschiede zweier unabhängiger Stichproben genutzt. Dabei wird er bei Vergleichen mit Gruppengrößen kleiner 30 Fälle für normalverteilte Kohorten angewandt.

Der Mann-Whitney-U-Test ist ebenfalls ein Test zur Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen zwei Untersuchungsgruppen. Dabei wird dieser bei nicht normalverteilten Untersuchungsgruppen angewandt. Die Unterschiede gelten als statistisch signifikant, wenn das Signifikanzniveau kleiner 0,05 ist.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv

In der Untersuchung liegt der Altersdurchschnitt bei 42,0 Jahren, wobei der jüngste Studienteilnehmer 20, der Älteste 65 Jahre alt war. Es nahmen insgesamt 28 Männer und 26 Frauen an der Studie teil.

Es handelte sich um Bandscheibenvorfälle der lumbalen und zervikalen Wirbelsäule (lumbal n= 37, zervikal n= 17). Um mögliche weitere Risikofaktoren zu erfassen, wurden von allen Probanden Gewicht und Körpergröße vermerkt, um den Body-Mass-Index (BMI) berechnen zu können. Es ergibt sich ein Mittelwert von  $26,5 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ .

Dieser Überblick soll in Kapitel 4.1 genauer dargestellt werden.

*Tabelle 4: Anthropometrische Daten*

	Alter in Jahren	Größe in cm	Gewicht in kg	BMI in $\frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$
Durchschnitt	42,2	174,8	81,3	26,5

*Tabelle 5: Geschlechterverteilung*

Geschlecht	weiblich	männlich
Anzahl (n)	26	28

*Tabelle 6: Verteilung der Bandscheibenvorfälle*

Wirbelsäulenbereich	HWS	LWS
Anzahl (n)	17	37

## 4.2 Demographische Daten

Die in Kapitel 3.3 genannten Ein- und Ausschlusskriterien beachtend, konnten 54 Patienten in die Studie eingeschlossen werden.

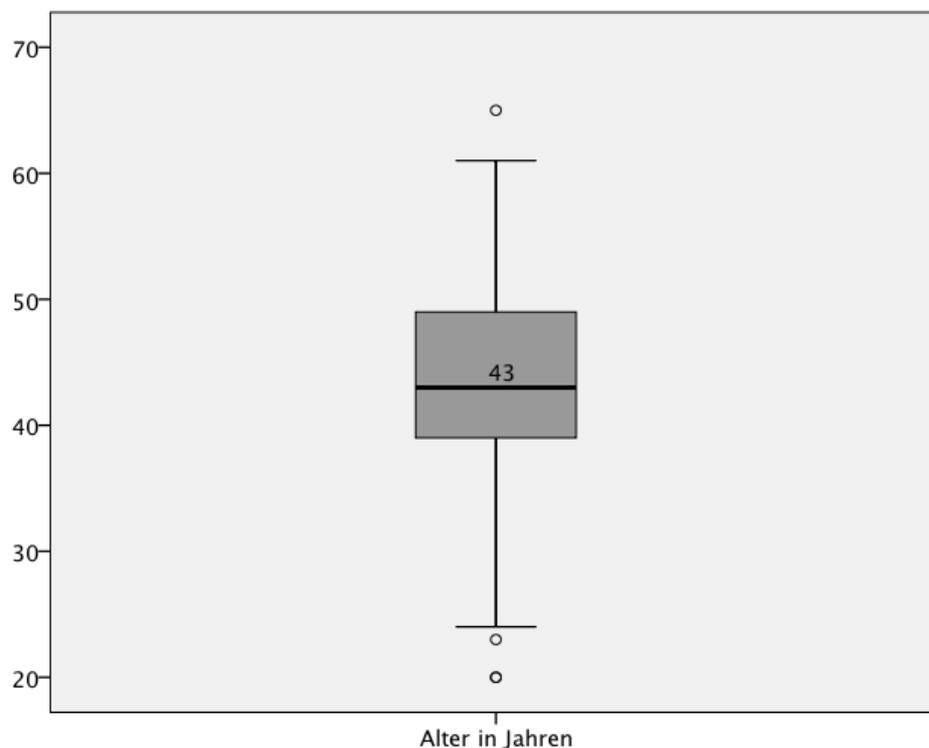
*Tabelle 7: Deskriptive Statistik - Alter*

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Alter in Jahren	54	20	65	42,24	10,002
Gültige Werte (Listenweise)	54				

Die oben aufgeführte Tabelle zeigt die Altersverteilung mit Standardabweichung und Mittelwert. Das 95 %ige Konfidenzintervall liegt bei 39,51 bis 44,97 Jahren.

Die Patienten, die in die Studie inkludiert wurden, waren zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 20 und 65 Jahre alt.

*Grafik 1: Boxplot-Graph zur Altersverteilung*

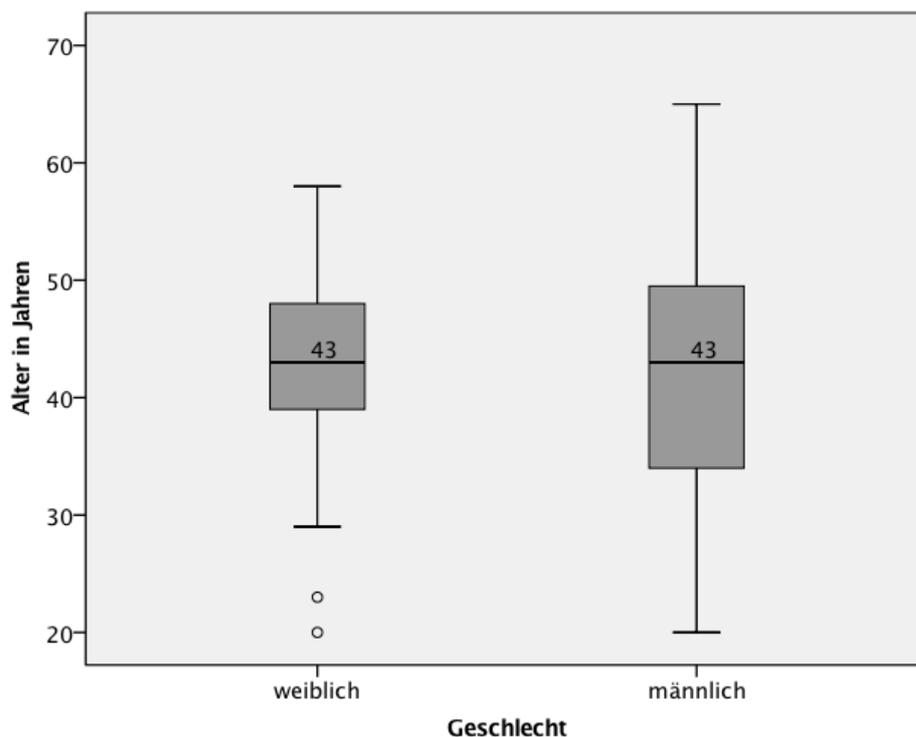


Die Grafik 1 bildet die Altersverteilung in einem Boxplot-Graphen ab. Dieser zeigt in der Box die mittleren beiden Quartilen, wobei der Median bei 43 Jahren liegt. Die Altersverteilung hat einen Mittelwert von 42,24 Jahren und einen Median von 43 Jahren, die Probandengruppe ist annähernd normalverteilt.

*Tabelle 8: Deskriptive Statistik - Alter und Geschlecht*

Geschlecht		Statistik	Standardfehler		
Alter in Jahren	weiblich	Mittelwert	41,81	1,870	
		95 %ige Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	37,96	
			Obergrenze	45,66	
		5 % getrimmtes Mittel		42,11	
		Median		43,00	
		Varianz		90,962	
		Standardabweichung		9,537	
		Minimum		20	
		Maximum		58	
		Spannweite		38	
		Interquartilbereich		9	
		Schiefe		-0,581	0,456
		Kurtosis		0,144	0,887
			männlich	Mittelwert	42,64
95 %ige Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze			38,54	
	Obergrenze			46,74	
5 % getrimmtes Mittel				42,66	
Median				43,00	
Varianz				111,794	
Standardabweichung				10,573	
Minimum				20	
Maximum				65	
Spannweite				45	
Interquartilbereich				16	
Schiefe				-0,042	0,441
Kurtosis				-0,041	0,858

Grafik 2: Boxplot-Graph zur Altersverteilung, geschlechterbezogen



In Tabelle 8 und der zugehörigen Grafik 2 wird die Altersverteilung auf das Geschlecht bezogen. Es ergeben sich unterschiedliche Mittelwerte (Frauen 41,81 Jahre, Männer 42,64 Jahre), der Median liegt bei Männern und Frauen jeweils bei 43 Jahren.

Tabelle 9: Deskriptive Statistik - Gewicht

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Gewicht in kg	54	50	130	81,28	18,97
Gültige Werte (Listenweise)	54				

Das Gewicht der Probanden variiert stark. Die Werte liegen zwischen 50 und 130 kg. Dabei ist das Gewicht als alleinige Größe nicht aussagekräftig, es muss in Bezug auf die Körpergröße betrachtet werden, weshalb der Body-Mass-Index ermittelt wird (BMI) (s. Tabelle 11).

Tabelle 10: Deskriptive Statistik - Körpergröße

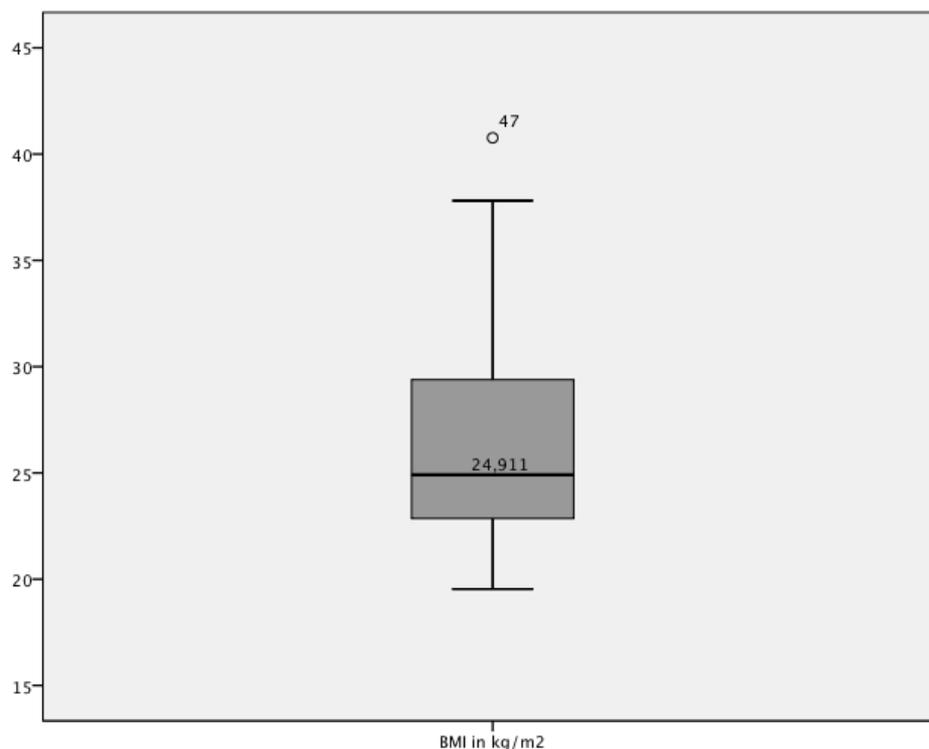
	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Größe in m	54	1,56	1,94	1,7483	0,08801
Gültige Werte (Listenweise)	54				

Die Tabelle gibt einen Überblick über die Größenverteilung der Patienten. Auch diese muss im Verhältnis zum Gewicht betrachtet werden (s. Tabelle 11).

*Tabelle 11: Deskriptive Statistik - BMI*

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
BMI in kg/m <sup>2</sup>	54	19,5	40,8	26,539	5,2777
Gültige Werte (Listenweise)	54				

*Grafik 3: Boxplot-Graph zum BMI*



Anhand des Mittelwerts des BMI mit 26,54 kg/m<sup>2</sup> lässt sich dieser in die Kategorie „Übergewicht“ einordnen. Die große Standardabweichung zeigt, dass es stark variierende Werte gibt. Der Boxplot-Graph in Grafik 3 bildet die BMI Verteilung ab. Es zeigt sich ein Median bei 24,91 kg/m<sup>2</sup>. Der Grenzwert zur Präadipositas ist definiert als BMI größer 25 kg/m<sup>2</sup>, das heißt 50,0 % der Patienten sind normalgewichtig. Keiner der Werte liegt unter 18,5 kg/m<sup>2</sup>.

Tabelle 12: Einteilung in BMI-Klassen\*

Untergewicht	< 18,5
Normalgewicht	18,5 - 24,9
Übergewicht	≥ 25,0
Präadipositas	25 - 29,9
Adipositas Grad I	30 - 34,9
Adipositas Grad II	35 - 39,9
Adipositas Grad III	≥ 40

\* alle Zahlenangaben in Tabelle 12 tragen die Einheit  $\text{kg}/\text{m}^2$

Die Tabelle 12 gibt einen Überblick über die BMI Klassen der Deutschen Adipositas-Gesellschaft.<sup>8</sup>

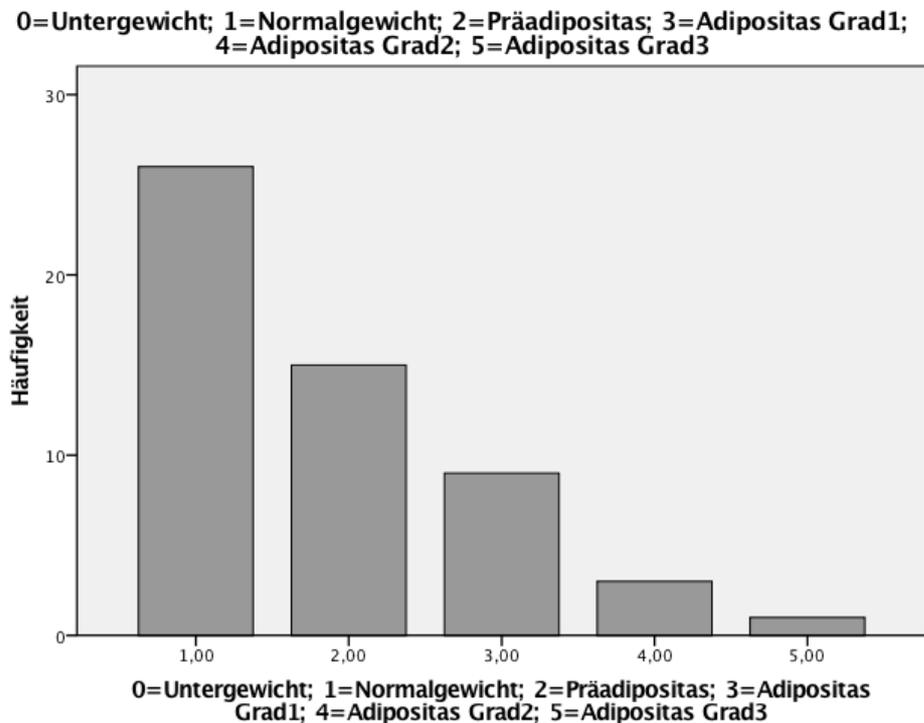
Tabelle 13: BMI-Klassen und deren Häufigkeiten

0=Untergewicht; 1=Normalgewicht; 2=Präadipositas; 3=Adipositas Grad1; 4=Adipositas Grad2; 5=Adipositas Grad3

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	26	48,1	48,1	48,1
	2	15	27,8	27,8	75,9
	3	9	16,7	16,7	92,6
	4	3	5,6	5,6	98,1
	5	1	1,9	1,9	100,0
	Gesamt	54	100,0	100,0	

<sup>8</sup> Definition der Deutschen Adipositas-Gesellschaft aufgerufen am 25.03.2020: <http://www.adipositas-gesellschaft.de/index.php?id=39>

Grafik 4: Häufigkeiten der einzelnen BMI-Klassen

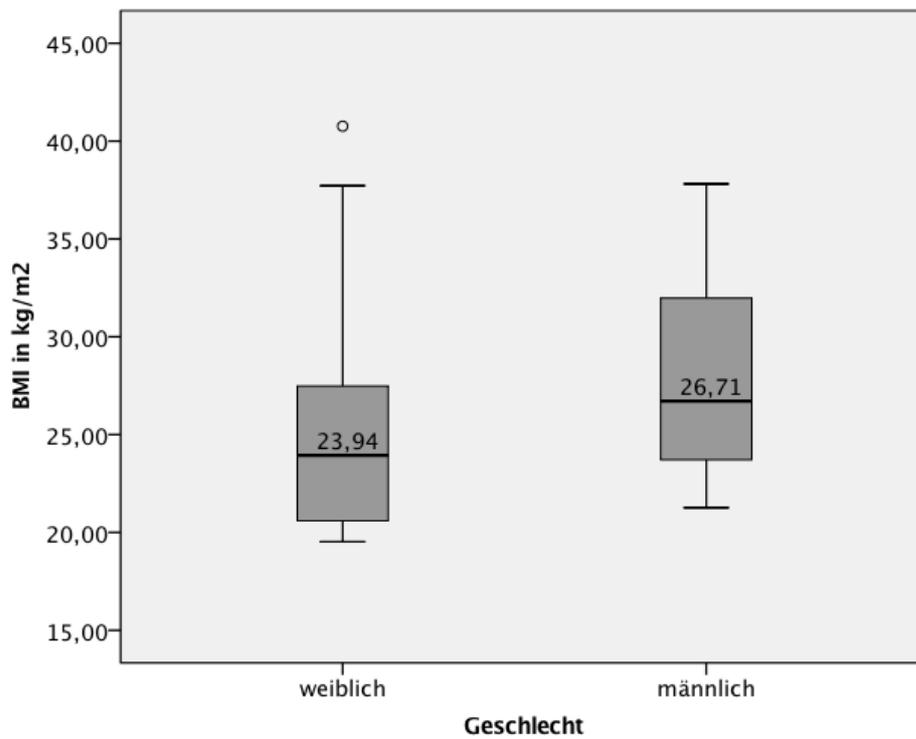


In Tabelle 13 wird die Patientenverteilung hinsichtlich der BMI-Klassen dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass 48,1 % der Patienten normalgewichtig sind. Keiner der Patienten ist untergewichtig. 15 Patienten leiden laut BMI an einer Präadipositas. 13 Patienten sind adipös. Anhand von Tabelle 13 lässt sich auch der Mittelwert von  $26,5 \text{ kg/m}^2$  erklären. Dieser entspricht definitionsgemäß „leichtem Übergewicht“. Grafik 4 dient der Veranschaulichung der Verteilung der BMI-Klassen.

Um genauer zu differenzieren, geben die nachfolgenden Statistiken einen Überblick über den BMI hinsichtlich des Geschlechts. Dabei ergeben sich Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Die Frauen unter den Studienteilnehmern haben einen Mittelwert des BMI von  $25,28 \text{ kg/m}^2$  mit einem 95 %igen Konfidenzintervall von  $23,01 \text{ kg/m}^2$  und  $27,54 \text{ kg/m}^2$ .

Die teilnehmenden Männer hingegen erreichen einen Mittelwert von  $27,57 \text{ kg/m}^2$  ( $25,69 \text{ kg/m}^2$  bis  $29,45 \text{ kg/m}^2$  95 % KI).

Grafik 5: Boxplot-Graph zum BMI, geschlechterbezogen

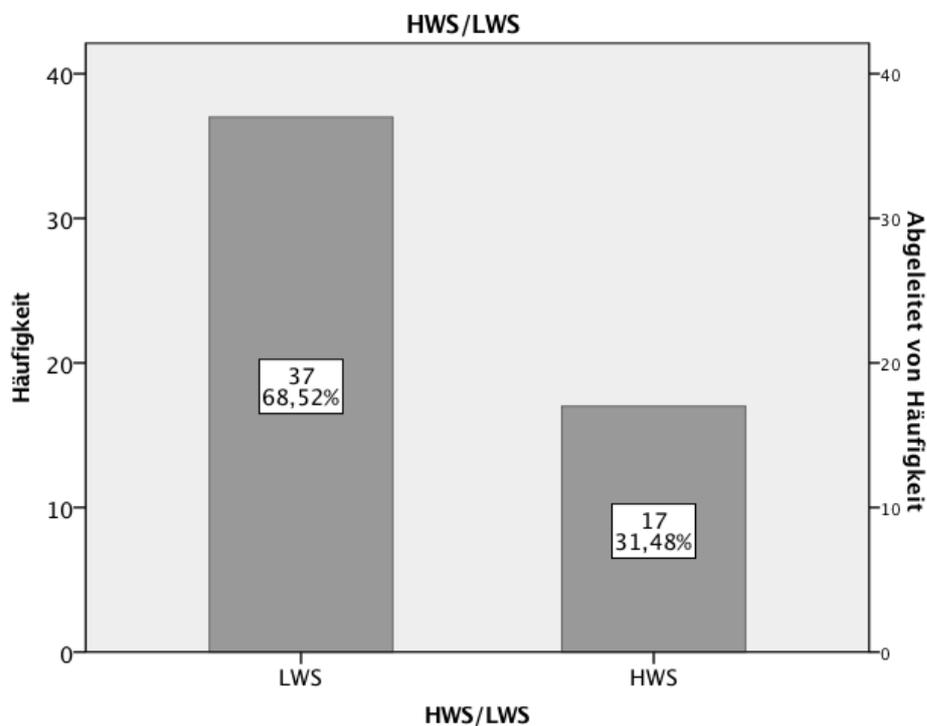


#### 4.3 Lokalisation der Bandscheibenvorfälle

Tabelle 14: Häufigkeiten HWS/LWS

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	LWS	37	68,5	68,5	68,5
	HWS	17	31,5	31,5	100,0
	Gesamt	54	100,0	100,0	

Grafik 6: Histogramm zu LWS/HWS-Verteilung



Die Tabelle beschreibt die Häufigkeiten von lumbalen und zervikalen Bandscheibenvorfällen. 68,5 % der untersuchten Patienten haben einen lumbalen Bandscheibenvorfall und 31,5 % einen zervikalen Diskusprolaps.

#### 4.4 Serologische Testreihen

Zunächst sollen die serologischen Testreihen anschaulich dargestellt, beschrieben und ausgewertet werden.

Tabelle 15: Addition der einzelnen Antikörpernachweise

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	3	5,6	5,6	5,6
	2	14	25,9	25,9	31,5
	3	15	27,8	27,8	59,3
	4	22	40,7	40,7	100,0
	Gesamt	54	100,0	100,0	

Anhand der Tabelle wird sichtbar, dass jeder Patient mindestens einen Antikörpernachweis im Blut hat. Drei der 54 Patienten haben jeweils nur eine positive Serologie (5,56 %), zwischen zwei und drei positiven Antikörpernachweisen ist es annähernd gleich verteilt (25,93 % und 27,78 %). Der Großteil der Patienten (40,74 %) zeigt einen Antikörpernachweis für alle vier serologisch getesteten Viren.

#### 4.4.1 HSV-Serologie

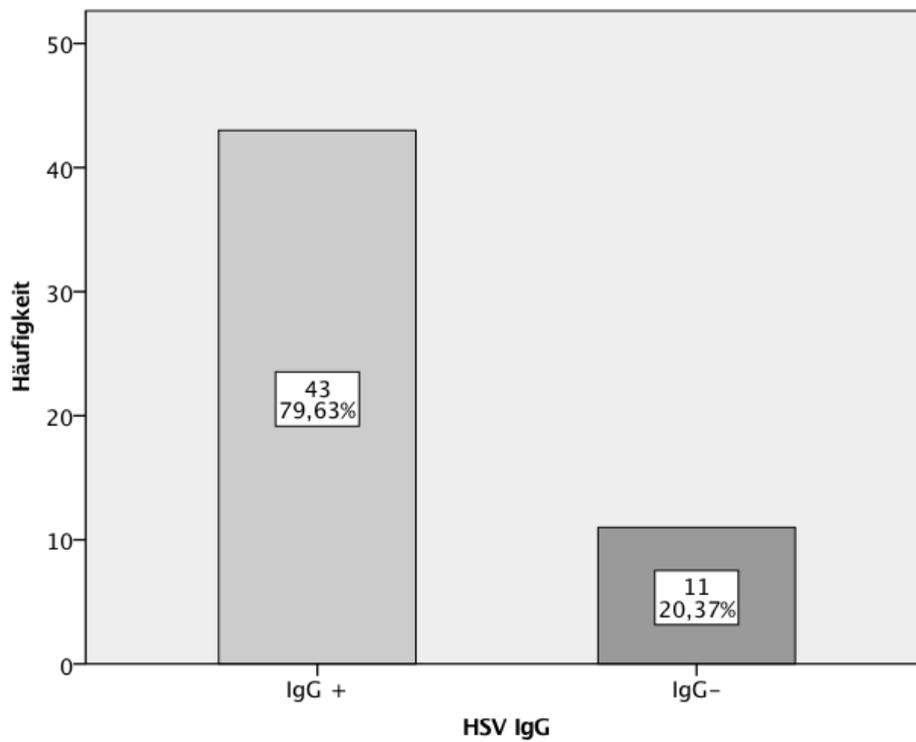
Bei den insgesamt untersuchten 54 Patienten ergab der ELISA bei 43 Patienten einen positiven Nachweis von HSV-IgG.

Dies entspricht 79,6 % mit Seropositivität für HSV und ist vergleichbar mit den Literaturangaben (vgl. Kapitel 1.3.1). Alle elf HSV-negativen Patienten waren 50 Jahre und jünger.

*Tabelle 16: Häufigkeiten HSV-IgG*

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	IgG-	11	20,4	20,4	20,4
	IgG+	43	79,6	79,6	100,0
	Gesamt	54	100,0	100,0	

Grafik 7: Histogramm zur HSV-Serologie



#### 4.4.2 CMV-Serologie

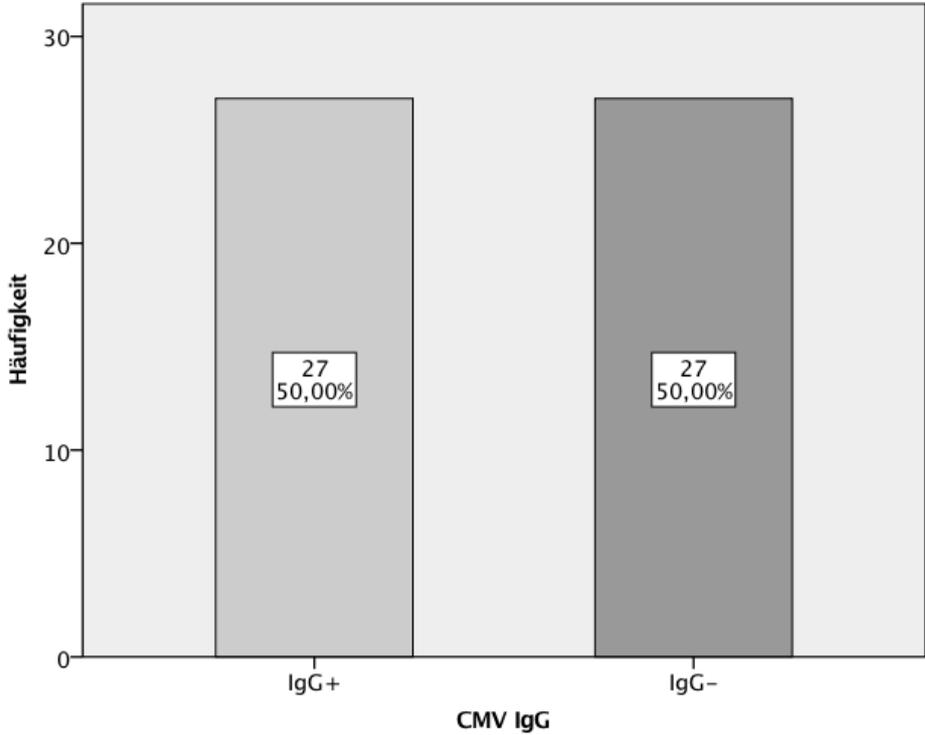
Bei exakt 50,0 % der Studienteilnehmer können wir CMV-IgG nachweisen.

Die Literatur gibt für Industrienationen einen serumpositiven CMV-Anteil von 40-70 % an, in Entwicklungsländern liegt der Anteil bei bis zu 100 % (Cannon et al., 2010)/ (vgl. Kapitel 1.3.1).

Tabelle 17: Häufigkeiten CMV-IgG

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	IgG-	27	50,0	50,0	50,0
	IgG+	27	50,0	50,0	100,0
	Gesamt	54	100,0	100,0	

Grafik 8: Histogramm zur CMV-Serologie



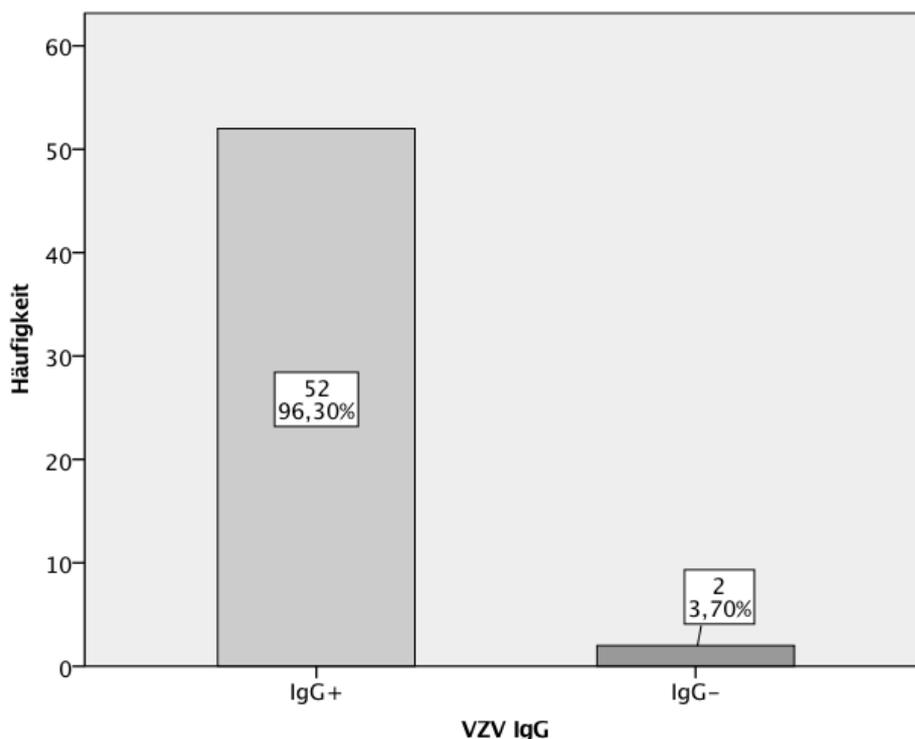
#### 4.4.3 VZV-Serologie

Die serologische Untersuchung von VZV ergibt eine Durchseuchung von 96,3 %. Lediglich in zwei der Probandenserumproben lässt sich kein VZV-IgG nachweisen. Eine 20jährige Frau mit einem BMI von 24,4 kg/m<sup>2</sup> und einem lumbalen Bandscheibenvorfall sowie ein 57jähriger Mann mit BMI von 31,4 kg/m<sup>2</sup> und ebenfalls einem lumbalen Bandscheibenvorfall haben keine VZV-IgGs. Das RKI gibt Zahlen von 95 % VZV-Seropositivität bis 2004 an (vgl. Kapitel 1.3.1). Da die teilnehmenden Patienten alle älter als 18 Jahre sein mussten (vgl. Studieneinschlusskriterien), kann davon ausgegangen werden, dass die 2004 eingeführte STIKO-Impfempfehlung für die HEVIDI-Studie nicht von Relevanz ist.

*Tabelle 18: Häufigkeiten VZV-IgG*

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	IgG-	2	3,7	3,7	3,7
	IgG+	52	96,3	96,3	100,0
	Gesamt	54	100,0	100,0	

*Grafik 9: Histogramm zur VZV-Serologie*



#### 4.4.4 Parvovirus B19-Serologie

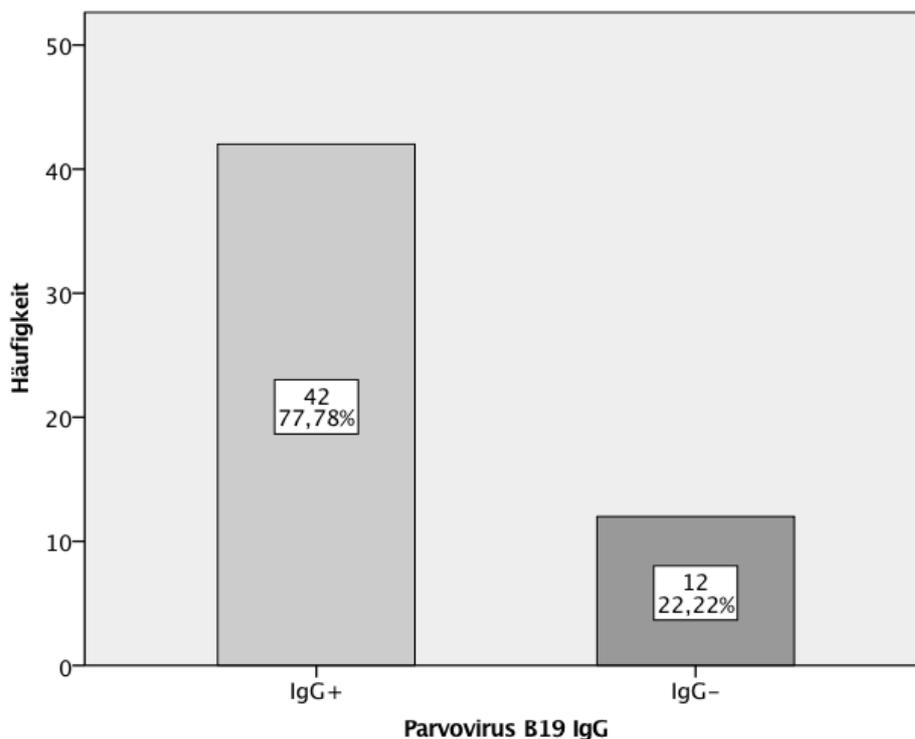
Es ergeben sich serologische Nachweise von Parvovirus B19 in 42 der 54 Fälle. Dies ergibt eine Prozentzahl von 77,8 % positiver Serologien, dementsprechend 22,2 % negative Probandenproben.

Wie in Kapitel 1.3.2. beschrieben, liegt die weltweite Durchseuchung mit Parvovirus B19 zwischen 70-85 % (Rogo et al., 2014). Mit 77,8 % positiver Serologien entspricht das Untersuchungsergebnis der HEVIDI-Studie der zu erwartenden Häufigkeit.

Tabelle 19: Häufigkeiten Parvovirus B19-IgG

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	IgG-	12	22,2	22,2	22,2
	IgG+	42	77,8	77,8	100,0
	Gesamt	54	100,0	100,0	

Grafik 10: Histogramm zur Parvovirus B19-Serologie



Zusammenfassung der serologischen Untersuchung: Alle Ergebnisse der untersuchten Viren liegen in einem Bereich, der zu den Daten aus Literaturangaben äquivalent ist (vgl. Kapitel 1.3.1. und 1.3.2).

#### 4.5 Ergebnisse der Zellzahlbestimmung durch hPrP-PCR

In allen Proben konnte humanes Prionprotein (hPrP) nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.8.2). Pro Ansatz (5 µl) wurden zwischen 875 hPrP und 152139 hPrP gemessen. Der niedrige Wert von 875 hPrP pro Ansatz ergibt sich durch die Struktur des untersuchten Materials. Hierbei handelt es sich um den einzigen Sequester, der vorwiegend aus hartem Bandscheibengewebe mit hohem Kollagenanteil besteht und daher eine niedrigere Zellzahl aufweist. Die sehr hohen Werte lassen sich durch den hohen Anteil an Blut im Probenmaterial erklären.

Die Extraktion der Proben erfolgt in fünf Untersuchungsreihen (vgl. Kapitel 3.7). Im Folgeschritt werden zur Prüfung der erfolgreichen Extraktion die Reihen eins, zwei und fünf einzeln amplifiziert und die Reihen drei und vier zusammengefasst. Dabei ergeben sich für alle Versuchsreihen Ct-Mittelwerte im Soll-Bereich zwischen 25,66 (Extraktion Fünf) und 27,51 (Extraktion Drei und Vier).

Die Ct-Werte sind indirekt proportional zur DNA/RNA-Menge (vgl. Kapitel 3.8.3), somit lässt ein kleiner Ct-Wert auf eine hohe Zellzahl schließen.

*Tabelle 20: Ct-Mittelwerte*

Extraktion	Eins	Zwei	Drei und Vier	Fünf
Ct-Mittelwert	26/27	26,55	27,51	25,66

#### 4.6 PCR-Ergebnisse

##### 4.6.1 Virale PCR der Herpes- und Enteroviren

Die PCR von HSV, CMV, VZV und Enteroviren ergab für alle Sequester negative Ergebnisse. Durch die positive Extraktionskontrolle wurde die korrekte Extraktion

bestätigt. Die gemessenen Zellzahlen lagen in den inhouse festgelegten Grenzen für Biopsien (vgl. Kapitel 4.5).

Damit ist die Validität der Untersuchungen sowohl der Extraktion, als auch des spezifischen DNA-Nachweises durch die PCR, ausreichend bestätigt.

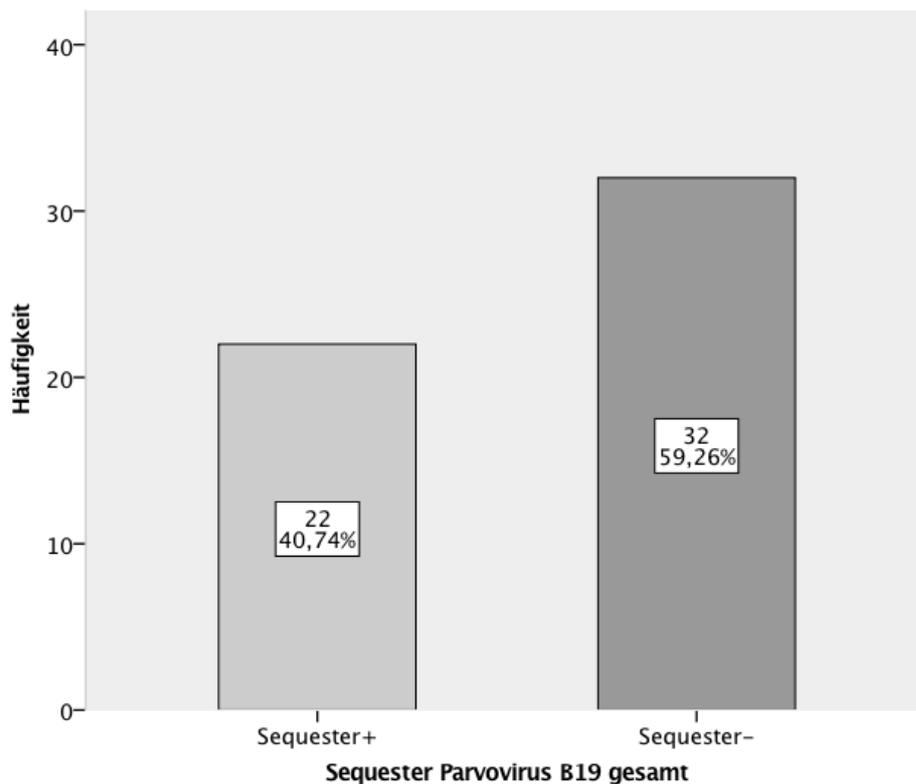
#### 4.6.2 Positive Ergebnisse: Parvovirus B19

Parvovirus B19-DNA wird in 22 der 54 untersuchten Sequestern nachgewiesen. Die 54 Sequester schließen auch jene ein, die bereits in der Serologie keine Parvovirus B19-Antikörper zeigen.

*Tabelle 21: Parvovirus B19-Sequester*

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Sequ.-	32	59,3	59,3	59,3
	Sequ.+	22	40,7	40,7	100,0
	Gesamt	54	100,0	100,0	

Grafik 11: Histogramm zum Sequesternachweis von Parvovirus B19



Aus Tabelle 21 wird deutlich, dass in 40,7 % aller eingeschlossenen Patientensequester Parvovirus B19-DNA nachweisbar ist. Die Grafik 11 veranschaulicht die prozentuale Verteilung.

In dieser Auswertung sind auch die 12 Patienten mit einem negativen Parvovirus B19-Antikörpertest inkludiert (s. Tabelle 19). Diese Proben zeigen erwartungsgemäß allesamt negative PCR-Ergebnisse.

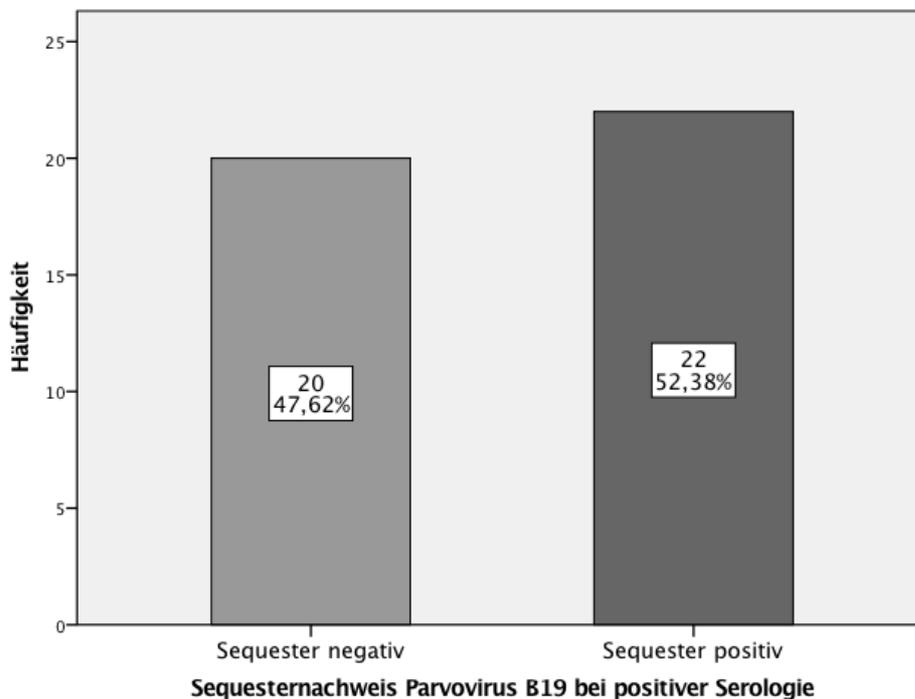
Um die Durchseuchung der Sequester genauer zu differenzieren, werden im Folgenden diese zwölf Patientenproben bei den statistischen Untersuchungen ausgeschlossen. Die folgenden Statistiken beziehen sich lediglich auf die 42 Patienten mit serologischem Antikörpernachweis für Parvovirus B19.

Tabelle 22: Häufigkeiten Parvovirus B19: Serologie und Sequester

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	IgG+ Sequ-	20	37,0	47,6	47,6
	IgG+ Sequ+	22	40,7	52,4	100,0
	Gesamt	42	77,8	100,0	
Fehlend	IgG-	12	22,2		
Gesamt		54	100,0		

Tabelle 22 stellt die Differenzierung der Untersuchungsgruppe dar. Die Testgröße umfasst in den folgenden Untersuchungen 42 Proben, davon sind 22 Sequester positiv und 20 ohne Parvovirus B19-PCR-Nachweis im Bandscheibenmaterial. In 13 Fällen sind LWS-Patienten betroffen und in neun Fällen HWS-Patienten.

Grafik 12: Histogramm zum Sequesternachweis von Parvovirus B19 bei positiver Serologie



Die Grafik 12 veranschaulicht die Daten aus Tabelle 22. Es wird deutlich, dass 52,4 % der Patienten positive quantitative DNA-Nachweise für Parvovirus B19 im Sequestermaterial aufweisen. Dies bezieht sich auf die 42 serologisch positiven

Patienten. Mehr als die Hälfte dieser Proben haben auch in den Sequestern DNA von Parvovirus B19.

#### 4.6.2.1 Quantitativer DNA-Nachweis

Der DNA-Nachweis erfolgt nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ. Um für die gemessene Viruslast genaue Quantitätsangaben der einzelnen DNA-Mengen pro Sequester zu erhalten, werden die nachgewiesenen DNA-Mengen auf die Zellzahlen bezogen.

Aufgrund des diploiden Chromosomensatzes und des hausinternen Ansatzes von stets  $10^5$  Zellen als Referenz ergibt sich folgende Formel zur Berechnung:

$$\frac{\text{Quantität}}{\text{Zellzahl}} \times 200.000.$$

Nach Berechnung der einzelnen DNA-Mengen ergeben sich Werte zwischen 2,151109751 und 14919,96368 Virus-DNA pro  $10^5$  Zellen.

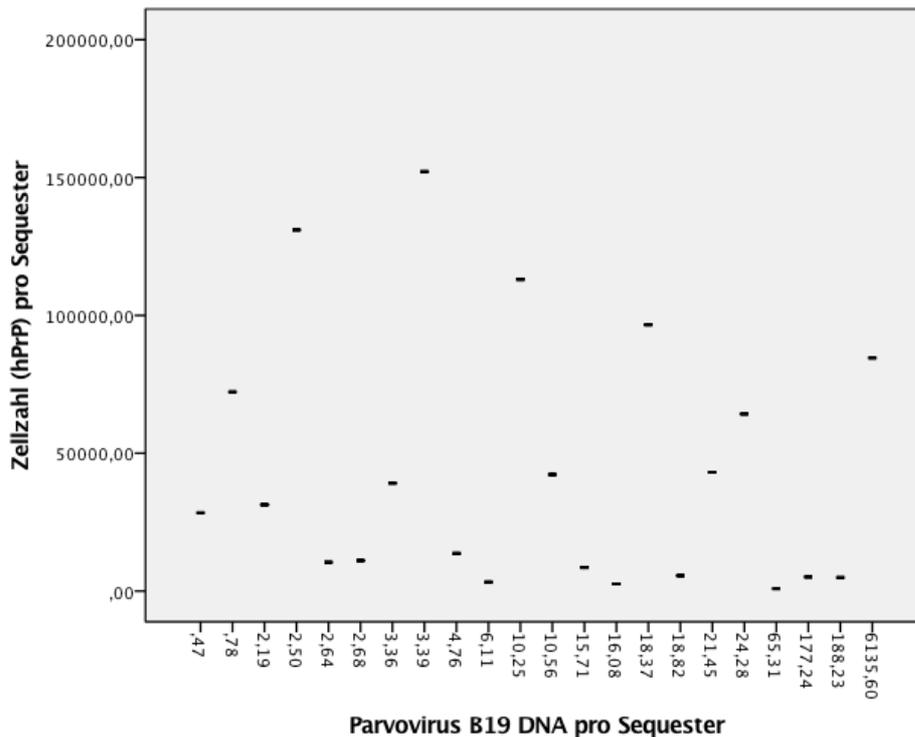
*Tabelle 23: Deskriptive Statistik DNA-Menge*

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Parvovirus B19 DNA	22	0,4700	6135,6000	305,944332	1303,1103420
Zellzahl (hPrP)	22	875,4713	152138,8125	43826,9997	45881,1614
Parvovirus B19 DNA pro Zelle	22	2,15	14919,96	2145,1003	4585,40513
Gültige Werte	22				

Der quantitative Nachweis zeigt deutliche Unterschiede in der DNA-Menge pro Zelle. Der allgemeine DNA-Nachweis ergab bei 22 Sequestern Werte zwischen 0,47 und 6135,60. Die dazugehörigen Zellzahlen ergeben sich aus der Extraktion von hPrP (vgl. Kapitel 4.5). Das Minimum der Anzahl an Zellen pro Untersuchungsmaterial liegt bei 875 und das Maximum bei 152138 pro Ansatz.

Durch die Verrechnung mittels Formel  $\left(\frac{\text{Quantität}}{\text{Zellzahl}} \times 200.000\right)$  ergeben sich Werte zwischen 2,15 Genomäquivalente (Geq) pro  $10^5$  Zellen bis 14919,96 Geq pro  $10^5$  Zellen.

Grafik 13: Zellzahl und Parvovirus B19-DNA



Grafik 13 veranschaulicht die Gegenüberstellung von Zellzahl zu Parvovirus B19-DNA. Es wird deutlich, dass einige hohe DNA-Mengen in Sequestern mit großen Zellzahlen vorhanden sind und umgekehrt. Außerdem ist auffallend, dass einige niedrige DNA-Mengen bei relativ hohen Zellzahlen vorkommen. Um eine Korrelation herzustellen, muss die DNA-Menge, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, berechnet werden.

Tabelle 24: Deskriptive Statistik Geq pro 10<sup>5</sup> Zellen

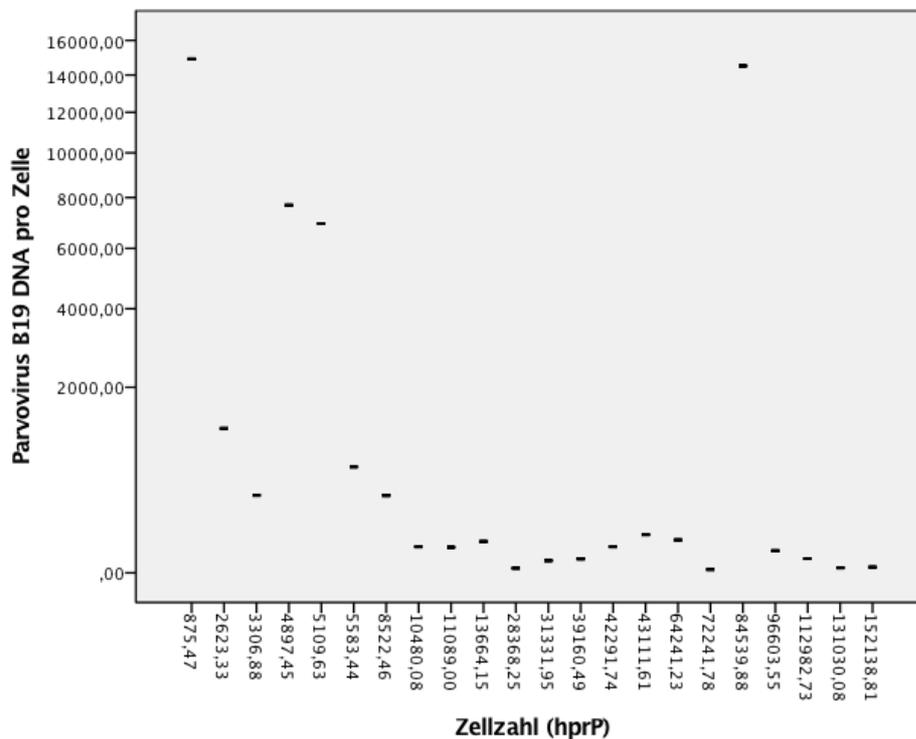
		Statistik	Standardfehler	
Parvovirus B19 DNA pro Zelle	Mittelwert	2145,1003	977,61166	
	95 %iges Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	112,0456	
		Obergrenze	4178,1551	
	5 % getrimmtes Mittel	1556,4764		
	Median	60,0263		
	Varianz	21025940,170		
	Standardabweichung	4585,40513		
	Minimum	2,15		
	Maximum	14919,96		
	Spannweite	14917,81		
	Interquartilbereich	795,60		
	Schiefe	2,234	0,491	
	Kurtosis	3,951	0,953	

Diese deskriptive Statistik veranschaulicht große Schwankungen der einzelnen DNA-Mengen pro Zelle. Das 95 %ige Konfidenzintervall für die DNA-Menge von Parvovirus B19 liegt zwischen 112,0456 und 4178,1551 Geq pro 10<sup>5</sup> Zellen.

Median (60,0263) und Mittelwert (2145,1003) liegen weit voneinander entfernt.

Die kleinste nachgewiesene DNA-Menge liegt bei 2,1 Geq pro 10<sup>5</sup> Zellen, der höchste gemessene Wert bei 14919,96 Parvovirus B19 Geq pro 10<sup>5</sup> Zellen.

Grafik 14: DNA-Menge pro Zelle



Die Grafik stellt die Verteilung der DNA in Bezug auf den jeweiligen Sequester dar. So sind auf der Y-Achse die nachgewiesenen Zellzahlen beschrieben, die X-Achse beschreibt die DNA-Menge, die jeweils in  $10^5$  Zellen detektiert wurde.

#### 4.6.2.2 Zusammenhänge zwischen Sequesterpositivität und BMI/Alter

Vergleich der Parvovirus B19 positiven und negativen Sequester in Bezug auf Alter und BMI:

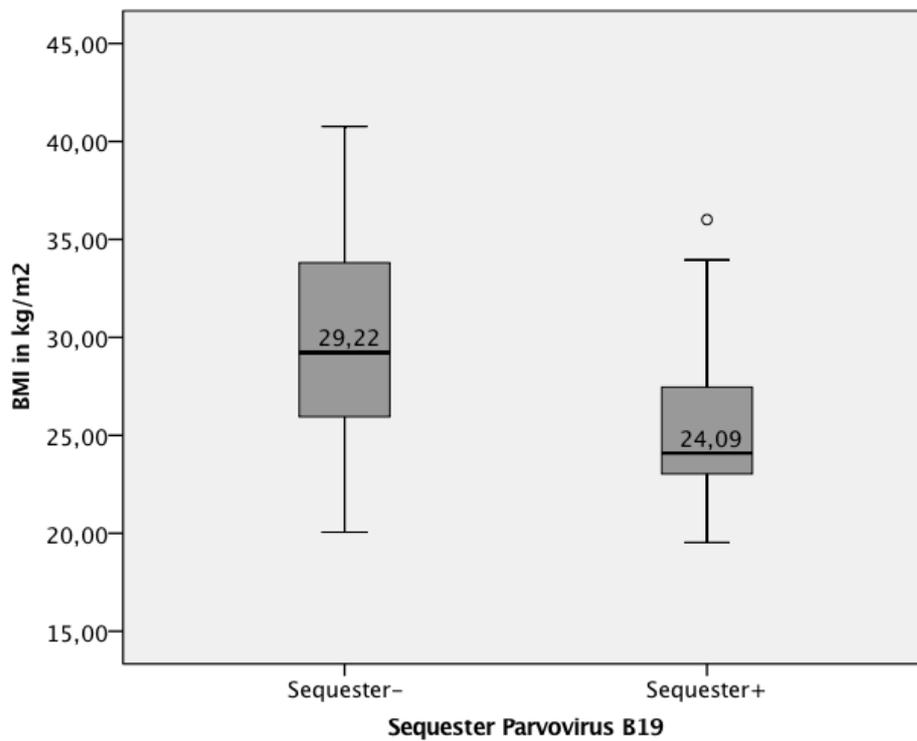
Tabelle 25: Deskriptive Statistik Parvovirus B19 und BMI/Alter

Sequester und Serologie Parvovirus B19		Statistik	Standardfehler
BMI in $\text{kg}/\text{m}^2$	Sequester-	Mittelwert	29,7651
		95 %ige Konfidenzintervall des Mittelwerts	
		Untergrenze	27,0420
		Obergrenze	32,4882
		5 % getrimmtes Mittel	29,6931
		Median	29,2190
	Varianz	33,854	

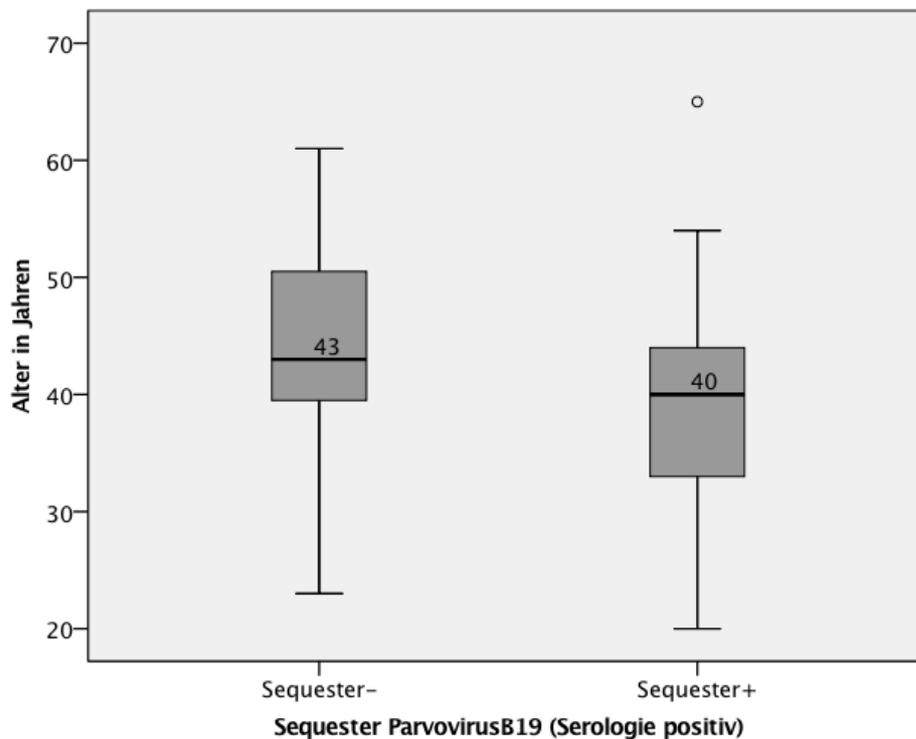
		Standardabweichung	5,81842	
		Minimum	20,06	
		Maximum	40,76	
		Spannweite	20,70	
		Interquartilbereich	8,20	
		Schiefe	0,064	0,512
		Kurtosis	-0,728	0,992
	Sequester+	Mittelwert	25,1841	0,88881
		95 %ige Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	23,3358
			Obergrenze	27,0325
		5 % getrimmtes Mittel	24,9062	
		Median	24,0889	
		Varianz	17,379	
		Standardabweichung	4,16887	
		Minimum	19,53	
		Maximum	36,01	
		Spannweite	16,48	
		Interquartilbereich	4,48	
		Schiefe	1,138	0,491
		Kurtosis	1,402	0,953
Alter in Jahren	Sequester-	Mittelwert	43,95	2,199
		95 %ige Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	39,35
			Obergrenze	48,55
		5 % getrimmtes Mittel	44,17	
		Median	43,00	
		Varianz	96,682	
		Standardabweichung	9,833	
		Minimum	23	
		Maximum	61	
		Spannweite	38	
		Interquartilbereich	12	
		Schiefe	-0,524	0,512
		Kurtosis	0,397	0,992
			Sequester+	Mittelwert
		95 %ige Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	35,89
			Obergrenze	44,38

5 % getrimmtes Mittel	39,88	
Median	40,00	
Varianz	91,742	
Standardabweichung	9,578	
Minimum	20	
Maximum	65	
Spannweite	45	
Interquartilbereich	12	
Schiefe	0,485	0,491
Kurtosis	1,438	0,953

Grafik 15: Boxplot-Graph zum BMI bei positivem und negativem Sequesternachweis von Parvovirus B19



Grafik 16: Boxplot-Graph zur Altersverteilung bei positivem und negativem Sequesternachweis von Parvovirus B19



Betrachtet man Proben mit positivem Parvovirus B19-Nachweis hinsichtlich Alter und BMI, fallen Unterschiede im Vergleich zur Sequestergruppe ohne Parvovirus B19-Nachweis auf.

So sind Patienten mit positivem Nachweis im Durchschnitt jünger. Sie haben ein mittleres Alter von 40,14 Jahren, während die Sequesternegativen im Durchschnitt 43,95 Jahre alt sind. Auch der BMI zeigt Unterschiede. Der Mittelwert der sequesternegativen Patienten liegt bei 29,76 kg/m<sup>2</sup>. Die Patienten mit positivem Ergebnis haben einen Mittelwert von 25,18 kg/m<sup>2</sup>. Die folgenden Tests untersuchen die statistische Signifikanz dieser Unterschiede.

Tabelle 26: Gruppenstatistiken Parvovirus B19 und BMI/Alter

	Sequester Parvovirus B19 wenn serologisch positiv	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Alter in Jahren	Sequ-	20	43,95	9,833	2,199
	Sequ+	22	40,14	9,578	2,042
BMI in kg/m <sup>2</sup>	Sequ-	20	29,7651	5,81842	1,30104
	Sequ+	22	25,1841	4,16887	0,88881

Tabelle 27: Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
Alter in Jahren	Varianzen sind gleich	0,052	0,821	1,273	40	0,211
	Varianzen sind nicht gleich			1,271	39,395	0,211

Tabelle 28: T-Test für die Mittelwertgleichheit

			Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95 %iges Konfidenzintervall der Differenz	
					Untere	Obere
Alter in Jahren	Varianzen sind gleich	sind	3,814	2,997	-2,243	9,871
	Varianzen sind nicht gleich	sind	3,814	3,001	-2,254	9,881

Tabelle 29: Mann-Whitney-U-Test für BMI und Parvovirus B19 Sequesterpositivität

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von BMI in kg/m <sup>2</sup> ist über die Kategorien von sekundserParvopos identisch	Man-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben	9,000	Nullhypothese ablehnen

Asymptomatische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,05

Es werden zwei unterschiedliche Tests durchgeführt. So kann aufgrund der Normalverteilung für die Altersverteilung der T-Test verwendet werden. Für den BMI verwendet man in diesem Fall den Mann-Whitney-U-Test, da keine Normalverteilung vorliegt und die Stichprobengröße je Gruppe kleiner 30 ist.

Die Ergebnisse der Tests zeigen, dass das Alter keinen statistisch relevanten Unterschied in beiden Gruppen aufweist. Der Mann-Whitney-U-Test für die BMI-Verteilung in den Gruppen Sequesterpositiv und Sequesternegativ verwirft die Nullhypothese, dass die BMI-Verteilung über beide Gruppen gleich ist. Der Unterschied im BMI zwischen den Gruppen ist statistisch relevant.

## 5 Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die HEVIDI-Studie wurde entwickelt, um den Nachweis von Viren in Bandscheiben zu erbringen. Dabei diente die Studie von Alpantaki et al. als Vorlage, bei der in 81,25 % der 16 untersuchten Sequester Herpesviren nachgewiesen werden konnten (Alpantaki et al., 2011). Um dies zu verifizieren, untersuchte die HEVIDI-Studie 54 Patienten mit operationsbedürftigem Bandscheibenvorfall auf Viren in den Sequestern mit zusätzlicher Serologie. Bei den untersuchten Viren handelte es sich um HSV1 und 2, CMV, VZV, Parvovirus B19 und Enteroviren. Serologisch untersuchte die Studie auf HSV-, CMV-, VZV-, und Parvovirus B19-IgG-Antikörper mittels ELISA. Die Untersuchung der Sequester erfolgte mittels DNA/RNA-Extraktion und PCR.

Die serologische Auswertung ergibt Antikörpernachweise entsprechend der Angaben des Robert Koch-Instituts hinsichtlich der Durchseuchung der Allgemeinbevölkerung. Die PCR zeigt in der Positiv-Kontrolle mit humanem Prionprotein positive Ergebnisse für alle 54 untersuchten Sequester. Die PCR-Untersuchung für HSV, CMV, VZV und Enteroviren ergibt negative Ergebnisse für alle Sequesterproben. Parvovirus B19 kann in 22 Sequestern nachgewiesen werden. Von den 54 Patienten haben zwölf Patienten keine IgG-Antikörper gegen Parvovirus B19 im Serum. 42 Patienten sind hingegen IgG-positiv für Parvovirus B19, davon 22 auch sequesterpositiv (52,38 %). Aus der Berechnung des DNA-Nachweises pro einzelner Zelle geht hervor, dass die DNA-Verteilung inhomogen ist. In einigen Sequestern lässt sich nur eine sehr geringe DNA-Menge pro Zelle nachweisen, während andere Proben eine sehr hohe DNA-Menge aufweisen. Die Parvovirus B19-positiven Sequester unterscheiden sich hinsichtlich Alters- und BMI-Verteilung von den Parvovirus B19-negativen Sequesterproben. Die Patienten mit positivem Nachweis für Parvovirus B19 sind insgesamt jünger und haben einen niedrigeren BMI. In der statistischen Untersuchung erweist der T-Test für die Unterschiede in der Altersverteilung keine statistische Relevanz. Die unterschiedlichen BMI-Werte können als statistisch relevant mit dem Mann-Whitney-U-Test belegt werden.

## 5.2 Diskussion des Studienaufbaus und der Methoden

Das prospektive Studiendesign über den Zeitraum eines Jahres legte eine Mindestfallzahl von 50 Patienten fest. Da in der Vorstudie nur 16 Patienten und zwei Kontrollproben untersucht wurden (Alpantaki et al., 2011) und auch sonst keine Daten verfügbar waren, konnte eine statistisch fundierte Fallzahlplanung nicht durchgeführt werden, sondern lediglich eine Fallzahlabschätzung erfolgen. Mit 54 Patienten war die Fallzahl der HEVIDI-Studie mehr als dreimal so groß wie die Vorstudie. Entsprechend wird eine hohe Aussagekraft der Ergebnisse angenommen. Für statistisch repräsentative Ergebnisse ist anzunehmen, dass eine Studie mit deutlich höherer Fallzahl notwendig wäre. Diese ist jedoch nur schwer umsetzbar. Die HEVIDI-Studie kann als Grundlage für weitere Studien verwendet werden.

Die folgenden Einschlusskriterien für die HEVIDI-Studie waren unabdingbar: weicher, operationsbedürftiger Diskusprolaps, Alter zwischen 18 und 65 Jahren und eine schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme. Mit diesen Kriterien konnte im gesetzten Zeitraum von einem Jahr das notwendige Studienkollektiv akquiriert werden.

Eine zusätzliche Eingrenzung der Studienkriterien zum Ausschluss weiterer Einflussfaktoren auf die Pathogenese von Bandscheibenvorfällen wie beispielsweise Nikotinabusus oder Diabetes mellitus (vgl. Kapitel 1.2.4) wurde nicht durchgeführt. Daher können diese Faktoren als Ursachen für einen Bandscheibenprolaps nicht ausgeschlossen werden (Hadjipavlou et al., 2008). Bei der HEVIDI-Studie wurde an die Idee der niedriggradigen Infektion angeknüpft, jedoch erfolgte keine Untersuchung auf *Propionibacterium acne* (Stirling et al., 2001). Die HEVIDI-Studie inkludiert auch Patienten mit Nikotinsucht (Akmal et al., 2004; Uei et al., 2006) oder einer metabolischen Erkrankung (Robinson et al., 1998). Die obere Altersgrenze wurde auf 65 Jahre festgelegt, um Einflussfaktoren durch starke Alterungsprozesse zu begrenzen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Patienten unter 65 Jahren altersbedingte degenerative Veränderungen vorweisen (Buckwalter, 1995; Hadjipavlou et al., 2008; Haefeli et al., 2006; Lyons et al., 1981; Urban & Roberts, 2003). Hinsichtlich des Gewichtes wurde zwar in der HEVIDI-Studie der BMI ermittelt, es gab jedoch keine Ausschlusskriterien hinsichtlich Adipositas (Liuke et al., 2005).

Bezüglich der mechanischen Beanspruchung der Wirbelsäule wurden die Patienten im Aufklärungsgespräch zu ihren Sportgewohnheiten bzw. zu ihrem Bewegungsumfang sowie ihrer beruflichen Tätigkeit befragt. Daraus ergab sich ein sehr inhomogenes Bild mit nicht verwertbarer Information, sodass diese in der Bewertung nicht berücksichtigt wurden. Der Einfluss der mechanischen Beanspruchung kann in der HEVIDI-Studie entsprechend nicht erfasst werden, obwohl auch diese die Degeneration fördert (Hadjipavlou et al., 2008).

Die Veränderung der Versorgung des Discus intervertebralis mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren spielt im Alter eine Rolle (Nerlich et al., 1997; Roberts et al., 1996). Da der Nachweis dieser Veränderungen spezielle Untersuchungen der biochemischen Vorgänge implizieren würde, können diese nicht präventiv ausgeschlossen werden. Für die Erfassung der genannten Aspekte sind Folgestudien zu empfehlen.

Die im Studiendesign vorgesehenen Untersuchungen erfolgten nach Standardverfahren. Die serologische Untersuchung ergibt keine Hinweise auf fehlerhafte Ergebnisse. Alle getesteten Viren entsprechen einer Durchseuchung äquivalent zur Allgemeinbevölkerung (vgl. Kapitel 1.3.1, 1.3.2 und Kapitel 4.3).

Die Sequesterproben wurden steril und ordnungsgemäß in RNA/ater asserviert. Es ist davon auszugehen, dass dabei keine RNA oder DNA zersetzt wurde, da die nachfolgende Zellextraktion erfolgreich durchgeführt werden konnte und interne Kontrollen positiv ausfielen. Dies konnte zudem durch den Nachweis von Parvovirus B19-DNA bestätigt werden.

### 5.3 Diskussion der Ergebnisse

#### 5.3.1 Diskussion der serologischen Ergebnisse

Der Antikörpernachweis von IgG-Antikörpern wurde für HSV, VZV, CMV und Parvovirus B19 durchgeführt. Dabei ergab sich ein HSV-IgG-Nachweis in 79,6 % der 54 Fälle. Die Angaben der Literatur nennen Werte von ca. 83 % der Fälle (Hellenbrand et al., 2005). Die Werte der Studie sind annähernd vergleichbar mit den Daten aus repräsentativen Untersuchungen (vgl. Kapitel 1.3.1). Folglich kann davon

ausgegangen werden, dass die Durchseuchungsrate des Patientenguts der HEVIDI-Studie der Durchseuchungsrate der Allgemeinbevölkerung entspricht. Der CMV-Antikörpernachweis lag bei exakt 50,0 %. Die Literaturangaben sprechen von einer Durchseuchung von 40-70 % (Cannon et al., 2010). Auch hier kann von einem repräsentativen Patientenkollektiv ausgegangen werden.

VZV ergab Durchseuchungswerte von 96,3 % der Fälle und belegen damit die Literaturangaben von ca. 95 % (Wutzler et al., 2001). Die Patienten der Studie hatten in 77,8 % der Fälle einen positiven serologischen Nachweis von Parvovirus B19. Frühere Erhebungen beschreiben Durchseuchungsraten von 40 bis 60 % in Industrienationen und bis zu 100 % in Entwicklungsländern (vgl. Kapitel 1.3.2).

Insgesamt ergab der Antikörpernachweis der Viren für alle vier getesteten Viren mit den Literaturangaben vergleichbare Ergebnisse.

### 5.3.2 Diskussion der PCR-Ergebnisse

Bei der Auswertung der Sequester-Ergebnisse wird deutlich, dass HSV, CMV, VZV und Enteroviren nicht nachweisbar waren. In keinem Sequestermaterial konnte virale DNA von HSV, CMV oder VZV, sowie RNA von Enteroviren nachgewiesen werden. Die Extraktions-/Inhibitionskontrollen mit Prionprotein der Maus verliefen regelrecht. Die Zellzahlbestimmung mittels humanem Prionprotein mit Ergebnissen für alle Sequesterproben belegt die Zellextraktion. Ebenso konnte zur Kontrolle auch virale DNA von Parvovirus B19 nachgewiesen werden. Entsprechend ist eine fehlerhafte Extraktion oder Polymerasekettenreaktion im Untersuchungsverlauf nicht wahrscheinlich und kann ausgeschlossen werden.

Die HEVIDI-Studie konnte keine vergleichbaren Ergebnisse zur Studie aus Griechenland erzielen (Alpantaki et al., 2011). Im Gegensatz zur griechischen Studie, die eine 86 %ige Durchseuchung der Sequester feststellt, weist die HEVIDI-Studie keine Durchseuchung nach. Diese Diskrepanzen lassen sich nicht zur Gänze klären. Es könnte sich im Vergleich zur Studie von Alpantaki et al. potentiell um eine andere Bevölkerungsgruppe handeln. Die Serumnachweise aus der griechischen Studie sind ebenfalls äquivalent zu den Angaben aus der Literatur. Ebenfalls kann die HEVIDI-Studie keine Rückschlüsse über systematische Probleme in der Studie von Alpantaki

et al. geben. Die Auswertungen ergeben, dass in unserem Patientenkollektiv weder Herpesviren noch Enteroviren nachweisbar sind.

Aufgrund dieser negativen Ergebnisse für HSV, CMV, VZV und Enteroviren der HEVIDI-Studie kann davon ausgegangen werden, dass auch in Studien mit höherer Fallzahl keiner dieser Viren nachweisbar ist. Daher scheint eine Folgestudie zur Kontrolle der Sequesterdurchseuchung mit Herpes- oder Enteroviren nicht empfehlenswert.

Ein weiteres Ergebnis der HEVEDI-Studie zeigt, dass die extrahierten Zellzahlmengen der internen Kontrolle mit hPrP sehr große Differenzen ergeben, wie in Kapitel 4.5 dargestellt. Aus allen 54 Sequestern konnte humane genomische DNA extrahiert werden. Die Werte zwischen 875 und 152139 Zelläquivalente illustrieren sehr unterschiedliche Zellgehalte der Sequester. Grundsätzlich ist das Bandscheibengewebe zellarm und verändert sich durch Degenerationsprozesse (vgl. Kapitel 1.2). Die hohen Zellzahlen hingegen begründen sich vermutlich durch stark mit Blut kontaminierte Sequesterproben. Entsprechend könnte die hohe Viruslast auch auf den Virusbefall mit Parvovirus B19 in Blutzellen zurückzuführen sein und nicht einen Virusbefall des bandscheibenspezifischen Materials bedeuten. Jedoch ist eine Virämie der Patienten aufgrund fehlender klinischer Infektsymptomatik und des präoperativen Ausschlusses von systemischen Entzündungen durch laborchemische Kontrollen des C-reaktiven Proteins und der Leukozytenzahlen unwahrscheinlich. Der Befund ist von großem Interesse und höchst überraschend.

In Bezug auf das Vorkommen von Parvovirus B19 in Bandscheibenmaterial gibt es keine Daten. Bisherige Untersuchungen zeigen Nachweise von Parvoviren bei anderen Erkrankungen, wie beispielsweise bei Myokarditispatienten (Verdonschot et al., 2016) (vgl. Kapitel 1.3.2), jedoch nicht in Zusammenhang mit Bandscheibenvorfällen.

Bei einer Gesamtzahl von 54 Sequestern entsprechen 22 Sequester mit positivem PCR-Ergebnis für Parvovirus B19 40,7 %. Jedoch haben zwölf der Patienten keine IgG-Antikörper für Parvovirus B19 und folglich ist auch kein Virusnachweis im Sequester möglich.

Werden ausschließlich die Patienten mit einer positiven Serologie für Parvovirus B19 betrachtet, weisen 22 von 42 Patienten auch Parvovirus B19 im Sequestermaterial auf. Dies entspricht 52,4 % der Fälle.

Um Zusammenhänge mit den bei Studieneinschluss erhobenen Daten darzustellen, wurden Tests bezüglich der Alters- und BMI-Verteilung bei den Patienten mit Parvovirus B19-Nachweis durchgeführt. Hierbei ergab sich ein normalverteiltes Alter, während der BMI nicht normalverteilt war.

In Bezug auf die Altersverteilung ergaben die Testergebnisse des T-Tests einen statistisch nicht signifikanten Unterschied für die Gruppe der sequesterpositiven und sequesternegativen Patienten. Dennoch ist ein Unterschied nachweisbar. Dieser Unterschied legt den Verdacht nahe, dass vor allem Bandscheibenvorfälle jüngerer Patienten von Parvovirus B19 beeinflusst werden, obwohl die Seroprävalenz im Alter zunimmt (vgl. Kapitel 1.3.2.). Um diese Annahme statistisch signifikant zu untermauern, könnte mit einer größeren Fallzahl eventuell überprüft werden, ob tatsächlich ältere Patienten weniger Parvovirus B19 in den prolabierten Bandscheiben vorweisen als jüngere Patienten.

Bei der Gegenüberstellung von Sequesterdurchseuchung und BMI zeigen sich Unterschiede. Es unterscheiden sich die Mittelwerte von sequesterpositiven ( $25,2 \text{ kg/m}^2$ ) und sequesternegativen Patienten ( $29,8 \text{ kg/m}^2$ ) statistisch signifikant nach Berechnung mittels Mann-Whitney-U-Test (vgl. Kapitel 4.6.2.2). So kann angenommen werden, dass bei Patienten mit Adipositas weniger Parvoviren in das Bandscheibengewebe eindringen. Es wäre also möglich, dass Adipositas in einem gewissen Maße vor der Bandscheibendurchseuchung mit Parvovirus B19 schützt und es dem Virus erschwert, in das Gewebe zu gelangen. Um diese Hypothese genauer zu beleuchten, wäre eine Folgestudie sinnvoll. Gegebenenfalls sollte diese sowohl in vitro die Diffusion des Virus in das Bandscheibengewebe untersuchen, als auch ob Fettzellen protektive Eigenschaften aufweisen.

Darüber hinaus ist hinsichtlich der Prüfung einer statistischen Signifikanz der Ergebnisse der Parvovirus B19 Durchseuchung von prolabierten Bandscheibensequestern eine Folgestudie zwingend notwendig.

Diese wurde als Folgestudie der vorliegenden HEVIDI-Studie von der Arbeitsgruppe von Dr. Reinke et al. konzipiert und ein wesentlicher Teil der Arbeit bereits durchgeführt. Dabei wurde folgender Studienaufbau gewählt:

In einer Kontrollgruppe ohne Bandscheibenvorfall wurde die Parvovirus B19-Durchseuchung von Bandscheibenbiopsien untersucht. Der Studienaufbau gleicht den

Rahmenbedingungen der HEVIDI-Studie, um eine Vergleichbarkeit sicherzustellen. Die Fallzahl von 50 Patienten wurde ebenfalls angestrebt, außerdem wurden die Altersgrenzen zwischen 18 und 65 Jahre festgelegt. Die Entnahme von Bandscheibengewebe wurde an Personen durchgeführt, die an einem nicht natürlichen Tod verstorbenen waren. Zuvor wurde das schriftliche Einverständnis der Hinterbliebenen eingeholt.

Hierbei musste sichergestellt werden, dass die Verstorbenen nicht an einem Bandscheibenleiden bzw. Wirbelsäulenleiden litten.

Alternativ hätte Bandscheibengewebe von jungen Skoliosepatienten mit Operationsindikation asserviert werden können. Da jedoch das Altersspektrum im Vergleich zur Versuchsgruppe deutlich divergiert hätte, wäre die Vergleichbarkeit einschränkt gewesen. Deshalb wurde davon abgesehen.

Die Untersuchungen in dieser Kontrollgruppe wurden mit den gleichen virologischen Verfahren vorgenommen. Eine erste Sichtung der vorliegenden Rohdaten scheint einen angenommenen relevanten Unterschied nicht zu bestätigen. Da die Auswertung der Daten (inklusive statistischer Analysen) noch nicht beendet ist, kann eine Aussage über die Studienergebnisse und die Vergleiche beider Studien zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht getroffen werden.<sup>9</sup>

#### 5.4 Ausblick

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden HEVEDI-Studie lässt sich die Vermutung nicht bestätigen, dass Herpesviren und Enteroviren Einflüsse auf die Pathogenese von Bandscheibenvorfällen haben. Die Ergebnisse der Studie können bezüglich der Fallzahl und der statistischen Signifikanz der Ergebnisse als aussagekräftig bewertet werden, sodass von weiteren Untersuchungen dieser Annahme kaum neue Erkenntnisse erwartet werden können.

Hingegen weist das Auftreten von Parvovirus B19 in den prolabierten Bandscheiben auf mögliche Zusammenhänge hin, die in mehreren Folgestudien weiter untersucht werden sollten. Wie in Kapitel 6.5 beschrieben, wurde eine Folgestudie mit einer Kontrollgruppe ohne Bandscheibenvorfall bereits initialisiert, jedoch bislang noch ohne

---

<sup>9</sup> A. Reinke, personal communication March 23, 2020

abschließende Ergebnisse. Somit kann auch eine Bewertung hinsichtlich der Verwerfung der These oder hinsichtlich möglicher Präventivmaßnahmen, wie beispielsweise Impfungen, nicht getroffen werden.

Insgesamt sind hinsichtlich der Pathogenese von Bandscheibenvorfällen weitere Forschungsbemühungen notwendig, insbesondere da dies eine häufige Erkrankung mit hoher gesellschaftlicher und gesundheitspolitischer Relevanz ist. Die Pathogenese von Bandscheibenvorfällen zu verstehen und eine Degeneration zu vermindern, sollte weiterhin im Interessensfokus von Forschergruppen bleiben. Die HEVIDI-Studie ist eine prospektive Studie, die den Zusammenhang von Viren und Bandscheibenvorfällen untersuchen sollte und neue Erkenntnisse liefern konnte.

#### IV. Zusammenfassung

Bandscheibenvorfälle sind in der heutigen Gesellschaft ein relevantes Problem. Seit Jahren werden die unterschiedlichen Ursachen untersucht. Es gibt bereits mehrere Hypothesen hinsichtlich der Pathogenese von Bandscheibenvorfällen. So werden beispielsweise auch niedriggradige Infektionen diskutiert. Im Jahr 2011 wurde in 16 untersuchten Bandscheibensequestern eine erhöhte Durchseuchung für CMV und HSV1 bei Patienten mit lumbalem Diskusprolaps nachgewiesen (Alpantaki et al., 2011). In insgesamt 86 % des untersuchten Sequestermaterials konnten Viren nachgewiesen werden, während die beiden Kontrollproben keine Virus-DNA nachwies. Angesichts dieser Ergebnisse wurde die HEVIDI Studie konzipiert, um an einem Patientenkollektiv von mindestens 50 Fällen die Ergebnisse zu verifizieren.

Von 54 Patienten (18 bis 65 Jahre) mit lumbalen und zervikalen Bandscheibenvorfällen (HWS n=17, LWS n=37), die sich einer Bandscheibenoperation unterzogen, wurden die Bandscheibensequester mittels PCR auf HSV 1 und 2, CMV, VZV, Parvovirus B19 und Enteroviren untersucht. Das Probenmaterial wurde nach operativer Sequesterektomie in RNA $\lambda$ ter asserviert und bis zur virologischen Testung bei -20 °C gelagert. Zusätzlich erfolgte eine serologische Analyse mittels ELISA auf IgG-Antikörper für HSV, CMV, VZV und Parvovirus B19. Aus den Sequestern wurden nach mechanischer Zerkleinerung Nukleinsäuren automatisch extrahiert. Der Nachweis viraler Nukleinsäuren erfolgte anschließend mittels quantitativer PCR. Prion-Protein-DNA der Maus wurde als kombinierte Extraktions-/Inhibitionskontrolle dem Lyse Puffer vor Extraktion zugegeben. Außerdem wurde die Validität der TaqMan PCR Tests durch Positivkontrollen und Standards, die in definierten Sollbereichen liegen müssen, gewährleistet.

Alle 54 Sequester waren PCR negativ für HSV, CMV, VZV und Enteroviren. Positive Ergebnisse gab es für Parvovirus B19. Insgesamt 22 der untersuchten Proben zeigten einen positiven DNA-Nachweis im Bandscheibensequester. Das entspricht 52,4 % aller Patienten mit positivem IgG für Parvovirus B19. Die interne Kontrolle lag im erwarteten Normbereich. Die Durchseuchung der Serumproben für alle untersuchten Viren war in unserem Patientenkollektiv entsprechend der in der Literatur erhältlichen Daten für die Normalbevölkerung (positiver Antikörpernachweis: HSV = 79,6 %; CMV = 50,0 %; VZV = 96,3 %, Parvovirus B19 = 77,8 %). Bei der statistischen Auswertung konnte nachgewiesen werden, dass die positiven Sequesterproben eine andere BMI-

und Altersverteilung aufwiesen, als diejenigen Sequester, die trotz Antikörper-Nachweis Parvovirus B19 DNA negativ waren.

Die Ergebnisse der HEVIDI Studie unterscheiden sich grundlegend von der vorangegangenen Studie von Alpantaki et al. In dem in der vorliegenden Studie untersuchten Patientenkollektiv können keine Herpesviren in Bandscheiben nachgewiesen werden. Die Annahme eines Zusammenhangs zwischen Herpesviren in Bandscheiben und Bandscheibenvorfällen kann durch die HEVIDI Studie für unser Patientenkollektiv widerlegt werden.

In der vorliegenden Studie konnte jedoch Parvovirus B19 im Bandscheibensequester nachgewiesen werden. Dieses Virus könnte einen Einfluss auf die Pathogenese von Bandscheibenvorfällen haben. Um dies zu überprüfen wurde eine Kontrollstudie mit nicht erkranktem Bandscheibenmaterial von der Arbeitsgruppe von Dr. Reinke et al. bereits begonnen.

## V. Literaturverzeichnis

- Adams, M. A., & Roughley, P. J. (2006). What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine*, 31(18), 2151-2161.
- Akmal, M., Kesani, A., Anand, B., Singh, A., Wiseman, M., & Goodship, A. (2004). Effect of nicotine on spinal disc cells: a cellular mechanism for disc degeneration. *Spine*, 29(5), 568-575.
- Alexander Jr, J. P., Baden, L., Pallansch, M. A., & Anderson, L. J. (1994). Enterovirus 71 infections and neurologic disease—United States, 1977–1991. *Journal of Infectious Diseases*, 169(4), 905-908.
- Alpantaki, K., Katonis, P., Hadjipavlou, A. G., Spandidos, D. A., & Sourvinos, G. (2011). Herpes virus infection can cause intervertebral disc degeneration: a causal relationship? *J Bone Joint Surg Br*, 93(9), 1253-1258. doi:10.1302/0301-620X.93B9.27002
- Antoniou, J., Steffen, T., Nelson, F., Winterbottom, N., Hollander, A. P., Poole, R. A., Aebi, M., & Alini, M. (1996). The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 98(4), 996.
- Arce, C., & Dohrmann, G. (1985). Herniated thoracic disks. *Neurologic clinics*, 3(2), 383-392.
- Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R., & Yamanishi, K. (2007). *Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis*: Cambridge University Press.
- Bayliss, M. T., Venn, M., Maroudas, A., & Ali, S. Y. (1983). Structure of proteoglycans from different layers of human articular cartilage. *Biochemical Journal*, 209(2), 387-400.
- Bock, C.-T., Klingel, K., & Kandolf, R. (2010). Human parvovirus B19–associated myocarditis. *New England Journal of Medicine*, 362(13), 1248-1249.
- Börm, W., Steiger, H., Papavero, L., Herdmann, J., Ohmann, C., & Schwerdtfeger, K. (2005). Leitlinie: Lumbaler Bandscheibenvorfall. *Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie*.
- Buckwalter, J. A. (1995). Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine*, 20(11), 1307-1314.
- Cannon, M. J., Schmid, D. S., & Hyde, T. B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in medical virology*, 20(4), 202-213.
- Caro, V., Guillot, S., Delpeyroux, F., & Crainic, R. (2001). Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *Journal of General Virology*, 82(1), 79-91.
- Caspar, W. (1977). A new surgical procedure for lumbar disc herniation causing less tissue damage through a microsurgical approach *Lumbar disc adult hydrocephalus* (pp. 74-80): Springer.
- Cook, M. L., Bastone, V. B., & Stevens, J. G. (1974). Evidence that neurons harbor latent herpes simplex virus. *Infection and immunity*, 9(5), 946-951.
- Crick, F. H. C., & Watson, J. D. (1957). Virus structure: general principles. *The Nature of Viruses*, 5-18.
- Dave, A. P. (2018). Thoracic Disc Disease. In O. U. Press (Ed.), *The Spine Handbook* (pp. 195-208).

- Diefenbach, R. J., Miranda-Saksena, M., Douglas, M. W., & Cunningham, A. L. (2008). Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Reviews in medical virology*, 18(1), 35-51.
- Dudli, S., Liebenberg, E., Magnitsky, S., Miller, S., Demir-Deviren, S., & Lotz, J. C. (2016). Propionibacterium acnes infected intervertebral discs cause vertebral bone marrow lesions consistent with Modic changes. *Journal of orthopaedic research*, 34(8), 1447-1455.
- Dulebohn, S. C., Massa, R. N., & Mesfin, F. B. (2019). Disc Herniation. *StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) PMID:28722852*.
- Enders, G., Daiminger, A., Lindemann, L., Knotek, F., Bäder, U., Exler, S., & Enders, M. (2012). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in pregnant women, bone marrow donors and adolescents in Germany, 1996–2010. *Medical microbiology and immunology*, 201(3), 303-309.
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *The Journal of Immunology*, 109(1), 129-135.
- Fraser, J. F., & Härtl, R. (2007). Anterior approaches to fusion of the cervical spine: a metaanalysis of fusion rates. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 6(4), 298-303.
- Fritzell, P., Bergström, T., & Welinder-Olsson, C. (2004). Detection of bacterial DNA in painful degenerated spinal discs in patients without signs of clinical infection. *European Spine Journal*, 13(8), 702-706.
- Galloway, D. A., Fenoglio, C., Shevchuk, M., & McDougall, J. K. (1979). Detection of herpes simplex RNA in human sensory ganglia. *Virology*, 95(1), 265-268.
- Gao, Y., Liu, M., Li, T., Huang, F., Tang, T., & Xiang, Z. (2013). A meta-analysis comparing the results of cervical disc arthroplasty with anterior cervical discectomy and fusion (ACDF) for the treatment of symptomatic cervical disc disease. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 95(6), 555-561.
- Gariyban, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1-4.
- Gibbs, R. A. (1991). Polymerase chain reaction techniques. *Current opinion in biotechnology*, 2(1), 69-75.
- Gibson, J. N. A., Grant, I. C., & Waddell, G. (2000). Surgery for lumbar disc prolapse. *Cochrane Database Syst Rev*, 3, CD001350. doi:<https://doi.org/10.1002/14651858.CD001350>
- Gilden, D. H., Gesser, R., Smith, J., Wellish, M., Laguardia, J. J., Cohrs, R. J., & Mahalingam, R. (2001). Presence of VZV and HSV-1 DNA in human nodose and celiac ganglia. *Virus genes*, 23(2), 145-147.
- Gray, H. (1918). *Anatomy of the human body*: Lea & Febiger.
- Hadjipavlou, A. G., Tzermiadianos, M. N., Bogduk, N., & Zindrick, M. R. (2008). The pathophysiology of disc degeneration. *Bone & Joint Journal*, 90(10), 1261-1270.
- Haefeli, M., Kalberer, F., Saegesser, D., Nerlich, A. G., Boos, N., & Paesold, G. (2006). The course of macroscopic degeneration in the human lumbar intervertebral disc. *Spine*, 31(14), 1522-1531.
- Heegaard, E. D., & Brown, K. E. (2002). Human parvovirus B19. *Clinical microbiology reviews*, 15(3), 485-505.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.

- Hellenbrand, W., Thierfelder, W., Müller-Pebody, B., Hamouda, O., & Breuer, T. (2005). Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997–1998. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *24*(2), 131-135.
- Hilde, G., Hagen, K. B., Jamtvedt, G., & Winnem, M. (2006). Advice to stay active as a single treatment for low-back pain and sciatica. *The Cochrane Library*.
- Holm, S., Maroudas, A., Urban, J. P., Selstam, G., & Nachemson, A. (1981). Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. *Connective tissue research*, *8*(2), 101-119.
- Horner, H. A., & Urban, J. P. (2001). 2001 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine*, *26*(23), 2543-2549.
- Humzah, M. D., & Soames, R. W. (1988). Human intervertebral disc: structure and function. *The Anatomical Record*, *220*(4), 337-356.
- Ingham, D. J., Beer, S., Money, S., & Hansen, G. (2001). Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Biotechniques*, *31*(1), 132-141.
- Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., & Brow, M. A. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(24), 9436-9440.
- Johnson, E. F., Berryman, H., Mitchell, R., & Wood, W. B. (1985). Elastic fibres in the annulus fibrosus of the adult human lumbar intervertebral disc. A preliminary report. *Journal of anatomy*, *143*, 57-63.
- Johnstone, B., & Bayliss, M. T. (1995). The Large Proteoglycans of the Human Intervertebral Disc: Changes in Their Biosynthesis and Structure with Age, Topography, and Pathology. *Spine*, *20*(6), 674-684.
- Junghanns, H. (1951). [Functional pathology of the intervertebral disks as a basis of clinical observations]. *Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir*, *267*, 393-417.
- Katz, M. M., Hargens, A. R., & Garfin, S. R. (1986). Intervertebral Disc Nutrition: Diffusion Versus Convection. *Clinical orthopaedics and related research*, *210*, 243-245.
- Kebelmann-Betzing, C., Seeger, K., Dragon, S., Schmitt, G., Moricke, A., Schild, T. A., Henze, G., & Beyermann, B. (1998). Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR. *Biotechniques*, *24*(1), 154-158.
- Kieff, E. D., Bachenheimer, S. L., & Roizman, B. (1971). Size, Composition, and Structure of the Deoxyribonucleic Acid of Herpes Simplex Virus Subtypes 1 and 2. *Journal of virology*, *8*(2), 125-132.
- Kim, J.-H., van Rijn, R. M., van Tulder, M. W., Koes, B. W., de Boer, M. R., Ginai, A. Z., Ostelo, R. W. G. J., van der Windt, D. A. M. W., & Verhagen, A. P. (2018). Diagnostic accuracy of diagnostic imaging for lumbar disc herniation in adults with low back pain or sciatica is unknown; a systematic review. *Chiropractic & manual therapies*, *26*(1), 37. doi:<https://doi.org/10.1186/s12998-018-0207-x>
- Klein, R. M., Jiang, H., Niederacher, D., Adams, O., Du, M., Horlitz, M., Schley, P., Marx, R., Lankisch, M. R., Brehm, M. U., Strauer B. E., Gabbert, H.E., Scheffold, T., & Gülker, H. (2004). Frequency and quantity of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsies from patients with suspected myocarditis or idiopathic left ventricular dysfunction. *Zeitschrift für Kardiologie*, *93*(4), 300-309.
- Kobayashi, M., Squires, G. R., Mousa, A., Tanzer, M., Zukor, D. J., Antoniou, J., Feige, U., & Poole, A. R. (2005). Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in

- matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis & Rheumatology*, 52(1), 128-135.
- Lallemand, F., Desire, N., Rozenbaum, W., Nicolas, J.-C., & Marechal, V. (2000). Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, 38(4), 1404-1408.
- Lanzrein, M., Schlegel, A., & Kempf, C. (1994). Entry and uncoating of enveloped viruses. *Biochemical Journal*, 302(Pt 2), 313-320.
- Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Chang, S.-Y., Landre, P. A., Abramson, R. D., & Gelfand, D. H. (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome research*, 2(4), 275-287.
- Le Maitre, C. L., Pockert, A., Buttle, D. J., Freemont, A. J., & Hoyland, J. A. (2007). Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochemical Society Transactions*, 35(part 4), 652-655.
- Liu, F., & Zhou, Z. H. (2007). Comparative virion structures of human herpesviruses. In G. C.-F. A. Arvin, E. Mocarski, et al. (Eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*: Cambridge University Press. Chapter 3
- Liuke, M., Solovieva, S., Lamminen, A., Luoma, K., Leino-Arjas, P., Luukkonen, R., & Riihimäki, H. (2005). Disc degeneration of the lumbar spine in relation to overweight. *International journal of obesity*, 29(8), 903-908.
- Lyons, G., Eisenstein, S. M., & Sweet, M. B. (1981). Biochemical changes in intervertebral disc degeneration. *Biochim Biophys Acta*, 673(4), 443-453.
- Maroon, J. C., Onik, G., & Sternau, L. (1989). Percutaneous automated discectomy. A new approach to lumbar surgery. *Clinical orthopaedics and related research*(238), 64-70.
- Maroudas, A., Stockwell, R. A., Nachemson, A., & Urban, J. (1975). Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. *Journal of anatomy*, 120(Pt 1), 113-130.
- Marsh, M., & Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame. *Cell*, 124(4), 729-740.
- Mettenleiter, T. C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *Journal of virology*, 76(4), 1537-1547.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, 335-350.
- Nerlich, A. G., Schleicher, E. D., & Boos, N. (1997). 1997 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Immunohistologic Markers for Age-Related Changes of Human Lumbar Intervertebral Discs. *Spine*, 22(24), 2781-2795.
- Nielsen, T. S., Hansen, J., Nielsen, L. P., Baandrup, U. T., & Banner, J. (2014). The presence of enterovirus, adenovirus, and parvovirus B19 in myocardial tissue samples from autopsies: an evaluation of their frequencies in deceased individuals with myocarditis and in non-inflamed control hearts. *Forensic science, medicine, and pathology*, 10(3), 344-350.
- Oberste, M. S., Maher, K., Flemister, M. R., Marchetti, G., Kilpatrick, D. R., & Pallansch, M. A. (2000). Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1170-1174.
- Ohshima, H., & Urban, J. P. (1992). The effect of lactate and pH on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc. *Spine*, 17(9), 1079-1082.
- Osada, R., Ohshima, H., Ishihara, H., Yudoh, K., Sakai, K., Matsui, H., & Tsuji, H. (1996). Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion,

- and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs. *Journal of orthopaedic research*, 14(5), 690-699.
- Pankuweit, S., Moll, R., Baandrup, U., Portig, I., Hufnagel, G., & Maisch, B. (2003). Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Human pathology*, 34(5), 497-503.
- Papavero, L., Steiger, H., Börm, W., Ebmeier, K., Ohmann, C., & Schwerdtfeger, K. (2010). Leitlinie: Zervikales Wurzelkompressionssyndrom. *Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie (Hrsg), Fulda*.
- Rechenchoski, D. Z., Faccin-Galhardi, L. C., Linhares, R. E. C., & Nozawa, C. (2017). Herpesvirus: an underestimated virus. *Folia Microbiol (Praha)*, 62(2), 151-156. doi:10.1007/s12223-016-0482-7
- Roberts, S., Urban, J. P., Evans, H., & Eisenstein, S. M. (1996). Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification. *Spine*, 21(4), 415-420.
- Robinson, D., Mirovsky, Y., Halperin, N., Evron, Z., & Nevo, Z. (1998). Changes in proteoglycans of intervertebral disc in diabetic patients: a possible cause of increased back pain. *Spine*, 23(8), 849-855.
- Rogo, L. D., Mokhtari-Azad, T., Kabir, M. H., & Rezaei, F. (2014). Human parvovirus B19: a review. *Acta Virol*, 58(3), 199-213.
- Rotbart, H. A. (1995). Enteroviral infections of the central nervous system. *Clinical Infectious Diseases*, 20(4), 971-981.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Schenk, T., Enders, M., Pollak, S., Hahn, R., & Huzly, D. (2009). High prevalence of human parvovirus B19 DNA in myocardial autopsy samples from subjects without myocarditis or dilative cardiomyopathy. *Journal of clinical microbiology*, 47(1), 106-110.
- Seki, S., Kawaguchi, Y., Chiba, K., Mikami, Y., Kizawa, H., Oya, T., Mio, F., Mori, M., Miyamoto, Y., Masuda, I., Tsunoda, T., Kamata, M., Kubo, T., Toyama, Y., Kimura, T., Nakamura, Y., & Ikegawa, S. (2005). A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease. *Nature genetics*, 37(6), 607-612.
- Söderlund-Venermo, M., Hokynar, K., Nieminen, J., Rautakorpi, H., & Hedman, K. (2002). Persistence of human parvovirus B19 in human tissues. *Pathologie Biologie*, 50(5), 307-316.
- Stirling, A., Worthington, T., Rafiq, M., Lambert, P. A., & Elliott, T. S. (2001). Association between sciatica and *Propionibacterium acnes*. *The Lancet*, 357(9273), 2024-2025.
- Suerbaum, S., Burchard, G. D., Kaufmann, S. H., & Schulz, T. F. (2016). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie (pp.553-572)*: Springer-Verlag.
- Sun, Z., Zhang, M., Zhao, X.-H., Liu, Z.-H., Gao, Y., Samartzis, D., Wang, H.-Q., & Luo, Z.-J. (2013). Immune cascades in human intervertebral disc: the pros and cons. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(6), 1009-1014.
- Thompson, J. P., Oegema Jr, T. R., & Bradford, D. S. (1991). Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine*, 16(3), 253-260.
- Uei, H., Matsuzaki, H., Oda, H., Nakajima, S., Tokuhashi, Y., & Esumi, M. (2006). Gene expression changes in an early stage of intervertebral disc degeneration induced by passive cigarette smoking. *Spine*, 31(5), 510-514.

- Uhlenhaut, C., & Kracht, M. (2005). Viral infectivity is maintained by an RNA protection buffer. *Journal of virological methods*, 128(1), 189-191.
- Urban, J. P., & Roberts, S. (2003). Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther*, 5(3). doi:<https://doi.org/10.1186/ar629>
- Urban, J. P., Smith, S., & Fairbank, J. C. (2004). Nutrition of the intervertebral disc. *Spine*, 29(23), 2700-2709.
- Van Tulder, M., Scholten, R. J., Koes, B. W., & Deyo, R. A. (2000). Non-steroidal anti-inflammatory drugs for low back pain. *Cochrane Database Syst Rev*, 2. doi:<https://doi.org/10.1002/14651858.CD000396>
- Verdonschot, J., Hazebroek, M., Merken, J., Debing, Y., Dennert, R., Brunner-La Rocca, H. P., & Heymans, S. (2016). Relevance of cardiac parvovirus B19 in myocarditis and dilated cardiomyopathy: review of the literature. *European journal of heart failure*, 18, 1430-1441.
- Vernon-Roberts, B., & Pirie, C. J. (1977). Degenerative changes in the intervertebral discs of the lumbar spine and their sequelae. *Rheumatology*, 16(1), 13-21.
- Voller, A., Bartlett, A., & Bidwell, D. E. (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology*, 31(6), 507-520.
- Voller, A., Bidwell, D. E., & Bartlett, A. (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: theory and practice. *Bulletin of the World Health Organization*, 53(1), 55-65.
- Weinstein, J. N., Tosteson, T. D., Lurie, J. D., Tosteson, A. N. A., Hanscom, B., Skinner, J. S., Abdu, W. A., Hilibrand, A. S., Boden, S. D., & Deyo, R. A. (2006). Surgical vs nonoperative treatment for lumbar disk herniation: the Spine Patient Outcomes Research Trial (SPORT): a randomized trial. *JAMA*, 296(20), 2441-2450.
- Whitley, R. J., Kimberlin, D. W., & Roizman, B. (1998). Herpes simplex viruses. *Clinical Infectious Diseases*, 541-553.
- Wutzler, P., Färber, I., Wagenpfeil, S., Bisanz, H., & Tischer, A. (2001). Seroprevalence of varicella-zoster virus in the German population. *Vaccine*, 20(1), 121-124.

Abbildung 1: Aufbau des Discus intervertebralis aufgerufen am 25.03.2020:

[https://eref.thieme.de/images/l/865059\\_25.jpg](https://eref.thieme.de/images/l/865059_25.jpg)

Abbildung 2: PCR

MVZ Martinsried, aufgerufen am 25.03.2020:

<http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr>

Abbildung 3: ELISA aufgerufen am 25.03.2020:

<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/ELISAFormats575x214.jpg>

Abbildung 4: CT Value: aufgerufen am 25.03.2020:

<https://s-media-cache->

<ak0.pinimg.com/originals/d0/96/23/d0962306e8f7d2603b75417a81b3d818.jpg>

## VI. Anhang

## Patienteninformation:

Studie: Virusinfektion als mögliche Ursache für einen Bandscheibenvorfall

Sehr geehrter Patient, sehr geehrte Patientin,

in der o.g. experimentellen Studie möchten wir untersuchen, ob Herpesviren in degenerierten Bandscheiben nachweisbar sind. Grundlage sind vorangegangene Studien, die nachweisen, dass eine solche Infektion der Bandscheibe ggf. einen Bandscheibenvorfall verursachen kann. Um weitere Informationen bezüglich Viren in Bandscheiben erhalten zu können, wurde die o.g. Studie entworfen.

Bei Ihrer anstehenden Operation wird nach etablierten Verfahren der Bandscheibensequester/ -vorfall entfernt. Dieser wird im Zuge der Studie virologisch untersucht und anschließend bis zum Abschluss der Studie im Institut für Virologie asserviert. Es wird betont, dass neben dem üblichen operativen Vorgehen mit Entnahme des Bandscheibensequesters kein zusätzliches Gewebe entnommen wird! Um einen möglichen früheren Kontakt mit potentiell verursachenden Viren feststellen zu können, wird mit Ihrem Einverständnis auch eine Blutentnahme erfolgen. Hierbei wird das Blutserum auf virale Antikörper getestet.

Diese Studie beeinträchtigt weder den operativen Eingriff noch Ihre Genesung.

Alle in der Studie erhobenen, studienbezogenen Daten werden entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen und der ärztlichen Schweigepflicht vertraulich behandelt.

Die wissenschaftliche Auswertung der Daten erfolgt pseudonymisiert, d.h. ohne Angabe Ihres Namens.

Für Forschungszwecke und die Sicherheit zukünftiger Patienten ist es besonders wichtig alle Daten korrekt und vollständig aufzuzeichnen.

Die Studienergebnisse werden in Form einer wissenschaftlichen Arbeit veröffentlicht. Auch in diesem Fall bleibt die Anonymität der Studienteilnehmer selbstverständlich gewahrt.

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig und erfolgt nur mit Ihrem Einverständnis. Sie sind jederzeit dazu berechtigt die Teilnahme zu widerrufen, womit selbstverständlich das Löschen Ihrer personenbezogenen Daten verbunden ist. Sowohl durch die Studienteilnahme, als auch durch deren Ablehnung ergeben sich keinerlei persönliche Vor- oder Nachteile für Ihren weiteren Therapieverlauf.

Für Rückfragen stehen wir selbstverständlich jederzeit zur Verfügung.

Dazu wenden Sie sich bitte an:

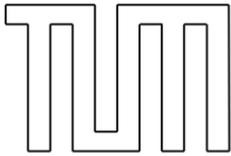
Miriam Sailer

Dr. med. A. Reinke

PD Dr. med. J. Lehmberg

Mit der Teilnahme an der Studie tragen Sie ggf. zur Entwicklung neuer Möglichkeiten der Prävention und Behandlung von Bandscheibenvorfällen bei.

Wir danken Ihnen sehr für Ihre Mithilfe!



**Einwilligungserklärung:**

Allgemeines zur Studie: Herpesvirusinfektionen in degenerierten Bandscheiben

Name: \_\_\_\_\_

Vorname: \_\_\_\_\_

Geburtsdatum: \_\_\_\_\_

Sehr geehrter Patient, sehr geehrte Patientin,

für die Teilnahme an der oben genannten klinisch- experimentellen Studie, ist es erforderlich, dass Sie zuvor Ihr schriftliches Einverständnis äußern.

Am \_\_\_\_\_ wurde ich durch \_\_\_\_\_ über die Teilnahme an der klinisch- experimentellen Studie und deren Bedeutung, sowie den damit verbundenen Risiken aufgeklärt und informiert.

Ich habe die Patienteninformation gelesen und verstanden und konnte alle meine Fragen stellen und klären.

Eine Kopie der Patienteninformation und der Einverständniserklärung habe ich erhalten. An der Studie nehme ich freiwillig teil und mir ist bewusst, dass ich mein Einverständnis zu jedem Zeitpunkt und ohne jeglichen Nachteil für mich widerrufen kann.

Meine Therapie und die ärztliche Betreuung und Behandlung werden durch die Studienteilnahme nicht beeinflusst und es ergeben sich keinerlei persönliche Vor- oder Nachteile für mich.

Ich bin damit einverstanden, dass die erhobenen Daten dieser Studie für wissenschaftliche Zwecke genutzt und weiterverarbeitet werden.

Bezüglich des Datenschutzes:

Die Auswertung der Studienergebnisse erfolgt pseudonymisiert, sodass meine persönlichen Daten geschützt sind.

\_\_\_\_\_

Ort, Datum

\_\_\_\_\_

Unterschrift des Patienten

\_\_\_\_\_

Unterschrift des Arztes

Anamnesebogen

OP-Termin:

Patientenetikett

Alter:

Geschlecht:

Größe:

Gewicht:

Höhe des Discusprolaps:

Mono-/Bisegmental:

Beschwerden seit wann:

Neuerkrankung/ Rezidiv:

Vorerkrankung Wirbelsäule:  
degenerativen Wirbelsäulenerkrankungen:

Allgemein:

Sozialanamnese:

Sport:

Beruf:

Bekannte Herpesinfektionen:

HSV1

HSV2

VZV (Windpocken, Gürtelrose)

CMV

HHV6

JCV

Enterovirus

Parvovirus B19

Serum Antikörpernachweis

IgG+

Sonstiges:

Autoimmunerkrankungen:

(Rheumat. Erkrankungen):

Immunsuppression/Cortisontherapie:

## VII. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Lehmborg für die Überlassung des Themas.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Reinke für die ausgezeichnete Betreuung und zuverlässige Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Hoffmann für die hilfreiche Unterstützung und virologische Expertise bedanken.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der neurochirurgischen Klinik und des virologischen Instituts, die die Durchführung der Studie ermöglichten.

Darüber hinaus gilt mein Dank dem Direktor der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der TU München Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Meyer, der diese Arbeit in seiner Klinik ermöglicht hat.

Ich danke allen Studienteilnehmern, durch welche die Studie erst möglich werden konnte. Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während meines Studiums als auch darüber hinaus.