

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin

Dissertation

**Phänotypische und molekulargenetische Untersuchungen
an Poliovirus Serotyp 1-Isolaten eines Poliovirus-
Dauerausscheiders**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Bernd Olaf Vollnberg
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Th. Schneider
 2. Prof. Dr. med. T. Mertens
 3. Prof. Dr. E. Schreier

Datum der Promotion: 21.11.2008

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Einleitung	6
1.1 Eradikation der Poliomyelitis	6
1.1.1 Geschichte	6
1.1.2 Entwicklung und Anwendung der Impfstoffe	7
1.1.3 Voraussetzungen und Verlauf der Eradikationsbemühungen	9
1.2 Das Poliovirus	12
1.2.1 Klassifikation und Aufbau	12
1.2.2 Genomorganisation (Serotyp 1)	13
1.2.3 Pathogenese und Klinik	15
1.3 Vakzin-abgeleitete Polioviren	16
1.3.1 Zirkulierende VDPVs	16
1.3.2 VDPVs bei Immundefizienten.....	17
1.4 Dauerausscheider von VDPVs	18
1.4.1 Bedeutung.....	18
1.4.2 Einteilung und Häufigkeit	18
1.4.3 Dauer und Termination der Ausscheidung.....	19
1.5 Diagnostik	21
1.5.1 Isolierung und Typisierung.....	21
1.5.2 Intratypische Differenzierung.....	22
2 Zielsetzung.....	24
3 Materialien.....	25
3.1 Patientenmaterial	25
3.2 Chemikalien	25
3.3 Antibiotika und sonstige Zusätze.....	26
3.4 Puffer, Lösungen	26
3.5 Enzyme	27
3.6 Kits	28
3.7 Zellen	28
3.8 Bakterienstämme	28
3.9 Kulturmedien und -lösungen	28
3.10 Oligonukleotide	29
3.11 Geräte / Utensilien.....	30
3.12 Software	31
4 Methoden	32
4.1 Stuhlaufbereitung und Virusanzucht.....	32
4.1.1 Stuhlaufbereitungen	32
4.1.2 Virusanzucht in der RD-Zellkultur.....	32
4.2 Intratypische Differenzierung.....	32
4.2.1 Phänotypische Untersuchungen	32
4.2.2 Molekularbiologische Untersuchung	34

4.3	Erstellung der Totalsequenzen.....	35
4.3.1	RNA Isolierung	35
4.3.2	Reverse Transkription	35
4.3.3	Amplifikation und Sequenzierung von TS1 und TS2	36
4.3.4	Amplifikation und Sequenzierung von TS3	39
4.4	Erstellung von Direktsequenzen in den Regionen VP1 und 5'NCR.....	41
4.4.1	Reverse Transkription der RNA in cDNA	41
4.4.2	Amplifikation.....	42
4.4.3	Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung	43
4.5	Phylogenetische Analyse	43
4.6	Qualitätskontrolle und Vermeidung von Kontamination.....	44
5	Ergebnisse	45
5.1	Intratypische Differenzierung.....	45
5.1.1	Phänotypische Untersuchungen	45
5.1.2	Genotypische Untersuchungen	47
5.2	Genomanalyse	48
5.2.1	Erstellung der Totalsequenzen.....	48
5.2.2	Vergleich der Klonsequenzen mit Direktsequenzen.....	51
5.2.3	Molekulare Feincharakterisierung	53
5.2.4	Phylogenetische Einordnung.....	53
5.2.5	Mutationen zur Sabin Typ 1-Sequenz	58
6	Diskussion	69
6.1	Intratypische Differenzierung.....	69
6.2	Genomanalyse	70
6.2.1	Erstellung der Totalsequenzen.....	70
6.2.2	Molekulare Feincharakterisierung und phylogenetische Analyse	71
6.2.3	Genetische Heterogenität	72
6.2.4	Mutationen zur Sabin Typ 1 - Sequenz	73
7	Literaturverzeichnis	78
8	Anhang	91
8.1	Alignments	91
8.1.1	TS1	91
8.1.2	TS2	108
8.1.3	TS3	134
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	135
8.3	Tabellenverzeichnis.....	136
8.4	Abkürzungsverzeichnis	137
	Danksagung.....	139
	Selbstständigkeitserklärung.....	140
	Lebenslauf.....	141

Zusammenfassung

Ein biologisches Prinzip bei der Poliomyelitis-Eradikation war, dass keine chronischen Poliovirusinfektionen vorkommen. Seit der Einführung der oralen Poliovakzine (OPV) wurden jedoch wenige Fälle von verlängertem Ausscheiden von Vakzin-abgeleiteten Polioviren (VDPV) beobachtet. Ziel der Arbeit war es, zwei Isolate eines in Deutschland lebenden, immundefizienten Poliovirus-Daueraus-scheiders mit Fokus auf die Poliovirusvariabilität phänotypisch und genotypisch zu untersuchen. Der Patient entwickelte im Jahr 2000 eine paralytische Poliomyelitis (letzte OPV-Gabe 1998) und scheidet seit dem Poliovirus Serotyp 1 aus. Die Untersuchungen der Isolate (aus den Jahren 2000 und 2004) basierten auf üblichen Methoden zur intratypischen Differenzierung sowie auf Totalsequenzen, die nach molekularer Klonierung von Teilamplifikaten ermittelt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass beide Isolate auf phänotypischer Ebene (ELISA, rct-Marker) „Non-Sabin-like“, genotypisch (Diagnostik-PCR) dagegen „Sabin-like“ reagierten. Die molekulare Feincharakterisierung ließ eine Einordnung beider Isolate als VDPV zu, welche durch die phylogenetische Analyse der Region VP1-2A bestätigt wurde. Die weitere Sequenzanalyse ergab eine hohe genetische Variabilität in Bezug auf die Sabin Typ 1-Sequenz sowie eine im Verlauf der Infektion gestiegene Mikroheterogenität. Dabei zeigte sich, dass die Nukleotid(NS)- und Aminosäuren(AS)-Substitutionsraten in Teilbereichen des Genoms variierten: die höchsten Raten wurden in dem Abschnitt VP2-2B ermittelt, die Regionen VP4 und 3A-3C waren insbesondere auf AS-Ebene stark konserviert. Der hohe Anteil an synonymen NS- und konservativen AS-Mutationen wies darauf hin, dass die Variabilität v.a. durch neutrale Mutationen getragen wurde. Die putativen Motive der Proteasen und Polymerase, sowie RNA-Sekundärstrukturformationen waren hochgradig konserviert. Hinweise auf positive Selektionen von Mutationen ergaben sich an Positionen, die mit der Attenuierung assoziiert sind und bei beiden Isolaten die Wildtyp-spezifische Besetzung aufwiesen, sowie im Bereich der neutralisierenden, antigenen Determinanten bzw. an Positionen, die mit dem zellulären Poliovirus-Rezeptor interagieren.

1 Einleitung

1.1 Eradikation der Poliomyelitis

1.1.1 Geschichte

Die vermutlich älteste Darstellung der Poliomyelitis ist eine aus dem 14. Jahrhundert v. Chr. stammende ägyptische Stele. Sie zeigt einen auf einen Stock gestützten Priester mit verkümmertem rechten Bein - ein für die Symptomatik der Poliomyelitis typisches Bild (Abbildung 1-1) [Westendorf, 1992].



Abbildung 1-1: Darstellung eines vermutlich an der Poliomyelitis erkrankten Priesters. Ägyptische Stele ca. 1403-1365 v.Chr. [Westendorf, 1992].

Die deutsche Bezeichnung „spinale Kinderlähmung“ stammte von dem Orthopäden Johann Georg Heine, der im 19. Jahrhundert erste klinische Untersuchungen an Poliomyelitispatienten unternahm. Die Bezeichnung „Heine-Medinsche-Krankheit“ geht zudem auf den schwedischen Arzt Oscar Medin zurück, der den ansteckenden Charakter der Erkrankung als Erster beschrieb. Der heute verwendete Name „Poliomyelitis (epidemica) acuta anterior“ - oder kurz „Poliomyelitis“ - wurde von Kussmaul im späten 19. Jahrhundert entsprechend dem histopathologischen Korrelat der Erkrankung begründet [Fanconi, 1952].

Bis zum Ende des 19. Jahrhunderts war die Poliomyelitis eine sporadisch auftretende Erkrankung. Sie zeichnete sich durch ein saisonales Auftreten mit *punctum maximum* im Spätsommer und frühen Herbst und durch das vornehmliche Auftreten im Kindesalter aus [Jochmann, 1914]. Wegen den damals vorherrschenden, mangelhaften hygienischen Verhältnissen führte die Infektion im Kindesalter zu einer hohen Durchseuchungsimmunität in der Bevölkerung. Ältere Jugendliche und Erwachsene waren daher weitestgehend gegen die Erkrankung geschützt. Kam es zu Erkrankungen im höheren Lebensalter, wurden im Vergleich zu Kindern oder Jugendlichen mehr paralytische Poliomyelitiden beobachtet [Fanconi, 1952; Paul, 1992].

Seit dem 20. Jahrhundert erhöhte sich die Frequenz der Epidemien in Europa und Nordamerika. Durch veränderte soziale und hygienische Lebensbedingungen stieg das durchschnittliche Alter der Infizierten und die Anzahl der paralytisch Erkrankten [Fanconi, 1952]. Während 1938 in Deutschland 5.363 Erkrankungsfälle und 696 Sterbefälle gemeldet wurden, sind 1952 10.259 Erkrankte und 819 Sterbefälle registriert worden [RKI, 2000]. In den USA wurden im gleichen Jahr mehr als 20.000 Erkrankte gemeldet [Cono et al., 2002]. Die von Philip Drinker und Louis Shaw 1929 entwickelte „Iron lung“ war für viele Jahre das Sinnbild für den Schrecken dieser Krankheit [Meyer, 1990].

1.1.2 Entwicklung und Anwendung der Impfstoffe

Fortschritte in der Diagnostik viraler Erkrankungen legten seit Beginn des 20. Jahrhunderts die Grundlage für die Erforschung der Ätiologie und der Pathogenese der Poliomyelitis. Der Nachweis der viralen Natur der Poliomyelitis erfolgte durch die Österreicher Karl Landsteiner und Erwin Popper im Jahr 1908 [Landsteiner et al., 1909]. Das 1949 von Thomas Weller, John Enders und Frederick Robbins entwickelte Zellkultur-System bildete zusammen mit der Identifizierung der drei Serotypen die Grundlage für die Entwicklung der Impfstoffe in den folgenden Jahren [Bodian, 1949; Weller et al., 1949].

Mit dem von Jonas Salk 1954 entwickelten IPV-Impfstoff (IPV= inaktivierte Poliovakzine) wurden in den USA Ende der 50er Jahre die ersten Anwendungsversuche erfolgreich durchgeführt [Salk et al., 1954]. In der Bundesrepublik Deutschland wurde ab 1956 mit IPV geimpft, jedoch nur in begrenztem Umfang [Rasch et al., 2001]. Die Anwendung des IPV-Impfstoffs führte in vielen industrialisierten Ländern zu einem weitgehenden und in vier

nordeuropäischen Ländern zu einem kompletten Rückgang der Wildviruserkrankungsfälle (Finnland, Island, Niederlande, Schweden) [WHO, 2003]. Auf Grund der Applikationsform und der hohen Herstellungskosten erfolgte weltweit die Anwendung jedoch nur in geringem Umfang und hatte somit nur geringe Auswirkungen auf die globale Wildviruszirkulation.

Der von Albert Sabin Ende der 50er Jahre entwickelte OPV-Impfstoff (OPV = orale Poliovakzine) enthält Polioviren, die durch mehrfaches Passagieren in humanen und animalen Zellkulturen attenuiert wurden [Sabin et al., 1960; Sabin, 1985]. Dieser Impfstoff wird oral appliziert und führt – im Gegensatz zum IPV-Impfstoff – wegen der enteralen Replikation der Impfviren zu einer mucosalen, IgA-vermittelten Immunität [Ogra, 1984]. Diese stellt eine zusätzliche, effektive Barriere gegen Transmissionen und Zirkulation von Wildviren dar [Onorato et al., 1991]. Über die Ausscheidung von Impfviren konnten zudem primär nicht-immunisierte Kontaktpersonen sekundär „mitgeimpft“ werden („stille Feiung“) [Fox et al., 1980; WHO, 2003].

Seltene Komplikationen des OPV-Impfstoffes sind Vakzin-assoziierte paralytische Poliomyelitiden (VAPP), die sowohl bei Impfungen als auch bei deren Kontaktpersonen auftreten können [WHO, 1976; WHO, 1982; Okuda et al., 2006]. Gemäß der Definition der WHO sind VAPPs paralytische Poliomyelitiden, die innerhalb von 60 Tagen nach OPV-Exposition aufgetreten sind und bei denen OPV-verwandte Polioviren im Stuhl nachgewiesen wurden. Des Weiteren muss ein Zusammenhang mit einer bestätigten Wildvirusinfektion oder einem Poliomyelitisausbruch ausgeschlossen sein [WHO, 1998; Dowdle et al., 2003]. Die Häufigkeit der VAPP - Fälle bei Impfungen oder Kontaktpersonen gibt die WHO mit weniger als 1 : 3,5 Millionen Impfdosen an [Esteves, 1988].

Die Anwendung von OPV (als trivalente oder monovalente Gabe) erfolgte ab 1957 erfolgreich in der UdSSR sowie in weiteren Ländern des Ostblocks. In den USA und Europa kam dieser Impfstoff ab den 60er Jahren zur Anwendung. In der DDR wurde ab 1960, in der BRD ab 1962 mit der OPV-Impfung begonnen. Die letzte autochthone, d.h. durch einheimische Poliowildviren hervorgerufene Erkrankung wurde in der DDR 1962 registriert [Rasch et al., 2001]. In der BRD führte die Einführung der Impfung zu einem schnellen und deutlichen Rückgang der Erkrankungszahlen (Abbildung 1-2). Eine vollständige Unterbindung der Wildviruszirkulation gelang jedoch wegen des ausgeprägten Ferntourismus sowie wegen der umfangreichen Immigrationen aus polio-endemischen Ländern zunächst

nicht. Der letzte autochthone Erkrankungsfall in der BRD wurde 1990 gemeldet. 1998 erfolgte in Deutschland die Umstellung von OPV auf IPV [Rasch et al., 2001].

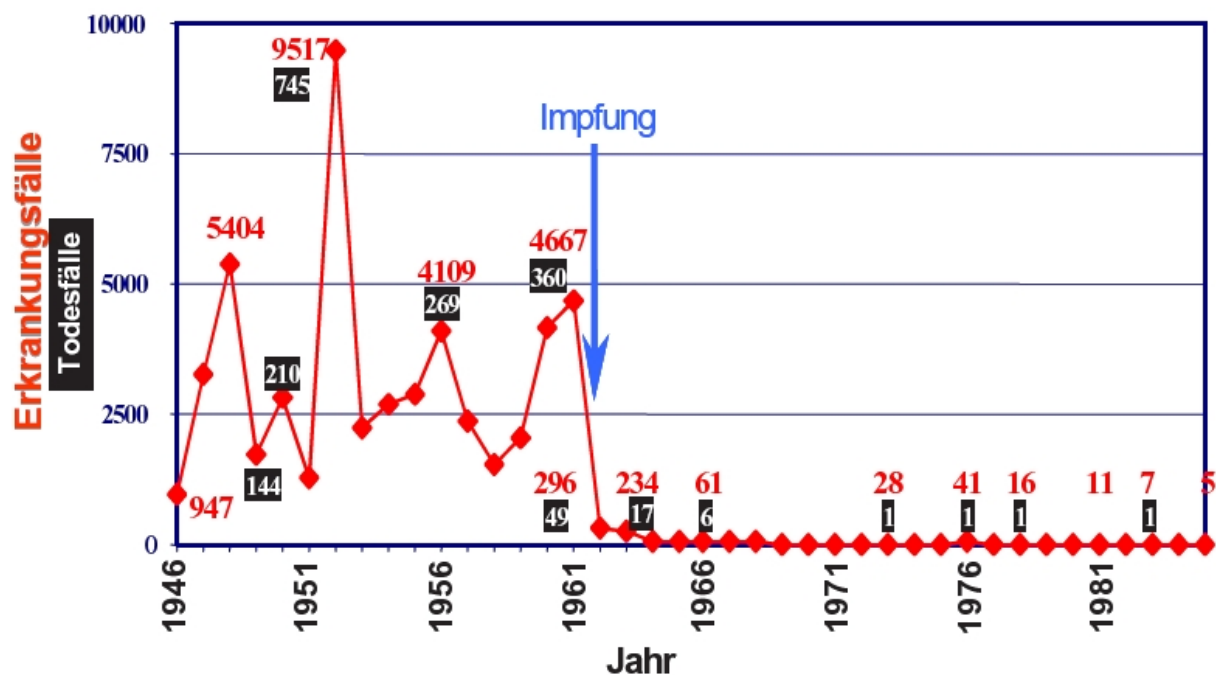


Abbildung 1-2: Entwicklung der Erkrankungs- und Todesfallzahlen in West-Deutschland vor und nach Beginn der Impfungen mit OPV (Grafik: Niedersächsisches Landesgesundheitsamt¹)

1.1.3 Voraussetzungen und Verlauf der Eradikationsbemühungen

Auf Grund der Erfolge der in vielen Ländern erfolgreich durchgeführten Impfkampagnen wurde auf der Weltgesundheitsversammlung 1988 die weltweite Eradikation der Poliomyelitis bis zum Jahr 2000 beschlossen. Als wesentliche Bedingungen für die Eradikation galten:

1. Das Poliomyelitisvirus kommt nur beim Menschen vor.
2. Mit IPV und OPV gibt es zwei effektive Impfstoffe.
3. Es gibt keine chronischen Wildvirusinfektionen mit anhaltender Infektiosität.
4. Ein Überleben der Viren in der Umwelt über einen längeren Zeitraum ist nicht wahrscheinlich.

Die globale Eradikation gilt als abgeschlossen, wenn die sechs WHO-Regionen (Nord- und Südamerika, Europa, Westpazifik, Afrika, Indischer Subkontinent, Mittlerer Osten) als Polio-frei zertifiziert worden sind. Eine wesentliche Voraussetzung für die Zertifizierung „Polio-frei“ ist, dass innerhalb von drei Jahren

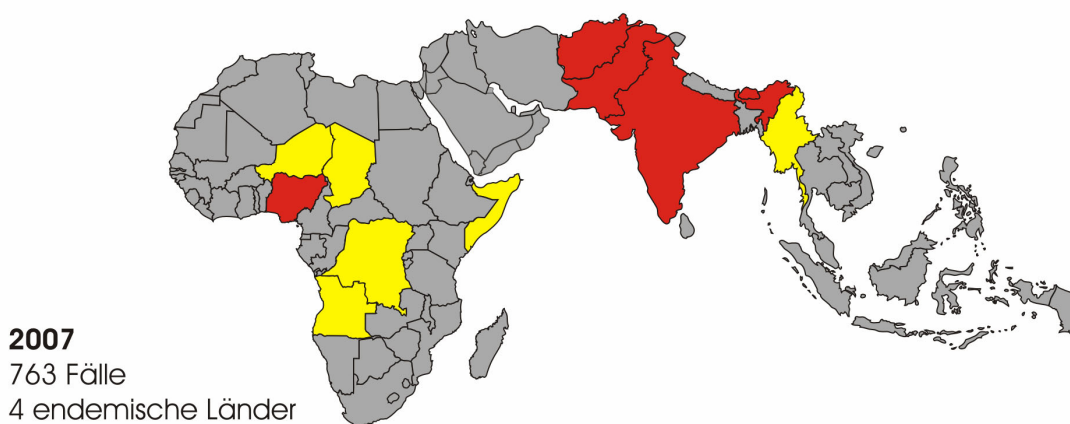
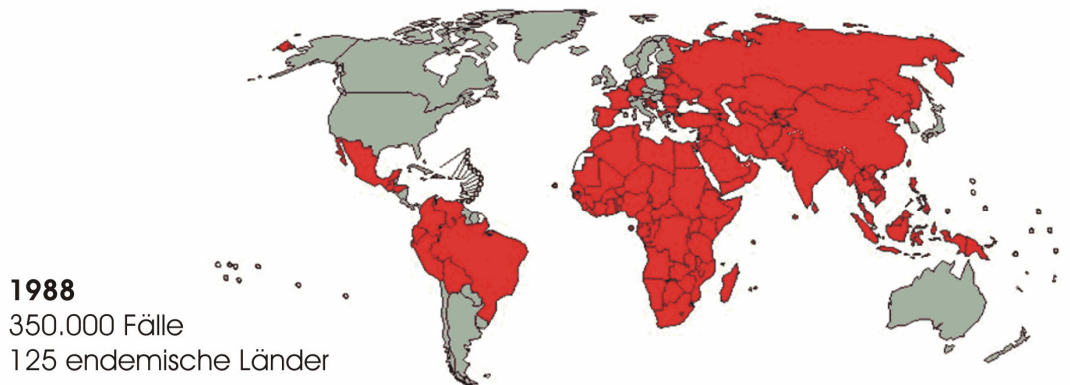
¹ www.nlga.niedersachsen.de > Schwerpunktthemen > Polioeradikation

keine durch Wildvirusinfektionen verursachten Erkrankungen aufgetreten sind [WHO, 1997].

Zum Erreichen der Eradikation werden folgende Strategien verfolgt [WHO, 2003]:

- Erzielung einer hohen Grundimmunisierungsrate
- Durchführung von Massen-OPV-Kampagnen an so genannten „national immunization days“ (NIDs)
- Gezielte Massen-Impfungen mit OPV bei fokalem Auftreten von Wildvirustransmissionen
- Überwachung der Wildviruszirkulation durch drei mögliche Verfahrensweisen:
 - a) Erfassung aller Fälle von akuten, schlaffen Lähmungen (*acute-flaccid paralysis* = AFP-Surveillance; dieses Verfahren wird in Deutschland seit 1998 durchgeführt),
 - b) Überwachung der Enteroviruszirkulation,
 - c) Umweltmonitoring [WHO, 2003].

Auch wenn das angestrebte Ziel, die Poliomyelitis bis zum Jahr 2000 zu eradizieren, nicht erreicht wurde, so haben die weltweiten Anstrengungen dazu geführt, die Poliomyelitis in vielen Ländern zu eliminieren (Abbildung 1-3). Drei WHO-Regionen wurden bisher als polio-frei zertifiziert: 1994 die Region Nord- und Südamerika mit insgesamt 36 Ländern, 2000 die Westpazifische Region (37 Staaten, inkl. China) und 2002 Europa (51 Länder) [WHO, 2003]. Ende 2006 wurden noch 2000 Fälle in 18 Ländern registriert; endemische Länder waren Nigeria, Indien, Pakistan und Afghanistan. Der Wildvirus Serotyp 2 gilt seit 1999 als eradiziert [WHO, 2006].



Legende: ■ Polio-freie Länder ■ Endemische Länder ■ Erneute Transmissionen

Abbildung 1-3: Fortschritt der Wildvirus-Eradikation (Stand 28.11.2007; Quelle: WHO²)

Gründe für nicht ausreichenden Impfschutz in den Endemiegebieten Afrikas, des mittleren Ostens und Süd-Asiens liegen v.a. in den politischen, sozialen und religiösen Gegebenheiten der Länder. Kriegerische Auseinandersetzungen, hohe Bevölkerungsdichten, sowie schlechte hygienische Verhältnisse erschwerten das konsequente Durchführen der Impfkampagnen. Zusätzlich bildeten Migration und gleichzeitig nachlassender Impfschutz in benachbart oder entfernt liegenden Ländern die Grundlage für Importe und Transmissionen von Wildviren in zuvor Polio-freien Länder [Kew et al., 2004]. So wurden beispielsweise im Jahr 2005 in elf Staaten Ausbrüche von Wildvirus-Erkrankungen (Serotyp 1 und 3) registriert, die aus Nigeria importiert worden sind. In den Ländern, mit erneut etablierten Wildvirustransmissionen, betrug der Anteil der gegen Poliovirus geschützten Bevölkerung ca. 50 % [CDC, 2006]. Bis Juli 2007 galten 5 Länder als „re-infected“: Chad, Myanmar, Angola, Demokratische Republik Kongo, Niger [WHO, 2007].

² <http://www.polioeradication.org/casecount.asp>

1.2 Das Poliovirus

1.2.1 Klassifikation und Aufbau

Das Poliovirus gehört zum Genus Enterovirus der Familie Picornaviridae. Das nicht umhüllte Kapsid hat einen Durchmesser von ca. 27 nm (lat. pico = klein) und beinhaltet einen positiv-RNA-Strang. Das Virus ist resistent gegen Säure von bis zu pH 2, was ihm die Magenpassage ermöglicht [Pallansch et al., 1996].

Das Kapsid besteht aus je 60 Kopien der drei Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 und bildet eine ikosaedrale Symmetrie aus (Abbildung 1-4). Das Kapsidprotein VP4 liegt an der Innenseite des Kapsids und ist eng mit der RNA assoziiert [Hogle et al., 1985].

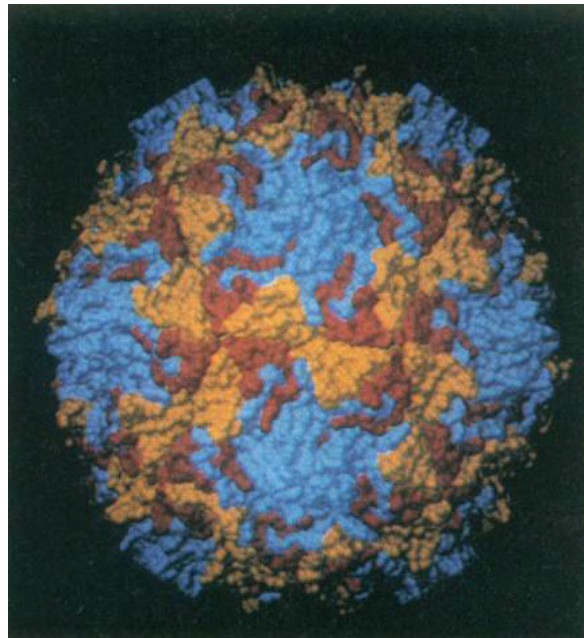


Abbildung 1-4: Kalkuliertes Modell der äußeren Oberfläche des Poliovirus Serotyp 1. VP1 blau, VP2 orange, VP3 rot [Hogle et al., 1985].

Auf der Oberfläche bilden die Kapsidproteine um die Punkte der 5-fachen Symmetrie „Canyons“ aus, die die Punkte der 3-fachen Symmetrie abgrenzen. Diese Vertiefung des Ikosaeders ist bei der Interaktion mit dem Poliovirusrezeptor CD-155 von Bedeutung [Belnap et al., 2000; He et al., 2000]. Vier putative antigene Determinanten wurden auf den Sequenzen von VP1, VP2 und VP3 lokalisiert. Diese sind z.T. direkt benachbart zur Rezeptorbindungsstelle [Rezapkin et al., 1998].

1.2.2 Genomorganisation (Serotyp 1)

Das Genom des Poliovirus besteht aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül positiver Polarität (ss+ RNA) von ca. 7440 Basen Länge [Kitamura et al., 1981; Nomoto et al., 1982]. Es wird in 3 Bereiche eingeteilt (Abbildung 1-5): a) einer nicht kodierenden Region am 5'-Ende (5'NCR = *non coding region*), b) einem ORF (ORF = *open reading frame*), der für ein Polyprotein mit 2209 Aminosäuren kodiert, und c) einer 3'NCR mit einer Länge von 71 Nukleotiden. Am 3'-Ende schließt sich ein poly-A-Rest mit einer Länge von ca. 60 Basen an.

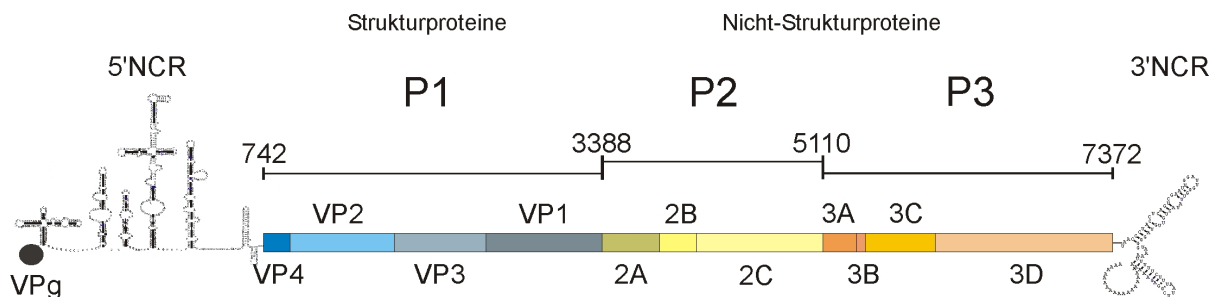


Abbildung 1-5: Genomorganisation des Poliovirus Serotyp1 mit Darstellung der Sekundärstrukturen der 5'NCR und 3'NCR [Kitamura et al., 1981].

Am 5'-Ende ist die RNA über einen pU-Rest kovalent an ein Protein gebunden, genannt VPg (= *viral protein, genome linked*) [Lee et al., 1977].

Die 5'NCR bildet ausgeprägte Sekundärstrukturformationen aus, deren gepaarte Sequenzen hochgradig konserviert sind (>80% Homologie) [Toyoda et al., 1984; Skinner et al., 1989]. Es lassen sich 7 stem-loop Formationen unterscheiden („I-VII“, Abbildung 1-6). Der Grund für die hohe Konservierung liegt in der Funktion, die diese Formationen während der Replikation ausüben. Die ersten 88 Basen, die eine *clover leaf-like* Struktur (Formation I) ausbilden, formen nach Bindung des PCBP (=pC binding Protein) und des viralen Proteins 3CD einen Ribonucleoproteinkomplex. Dieser initiiert die Negativstrangsynthese [Andino et al., 1990]. Die Domains II, IV, V und VI bilden die so genannte IRES (= *internal ribosomal entry site*, Basen 134-556), die der cap-unabhängigen intraribosomalen Bindung dient und die Translation an einem spezifischen AUG-Triplett (Basen 742-744) initiiert [Pelletier et al., 1988].

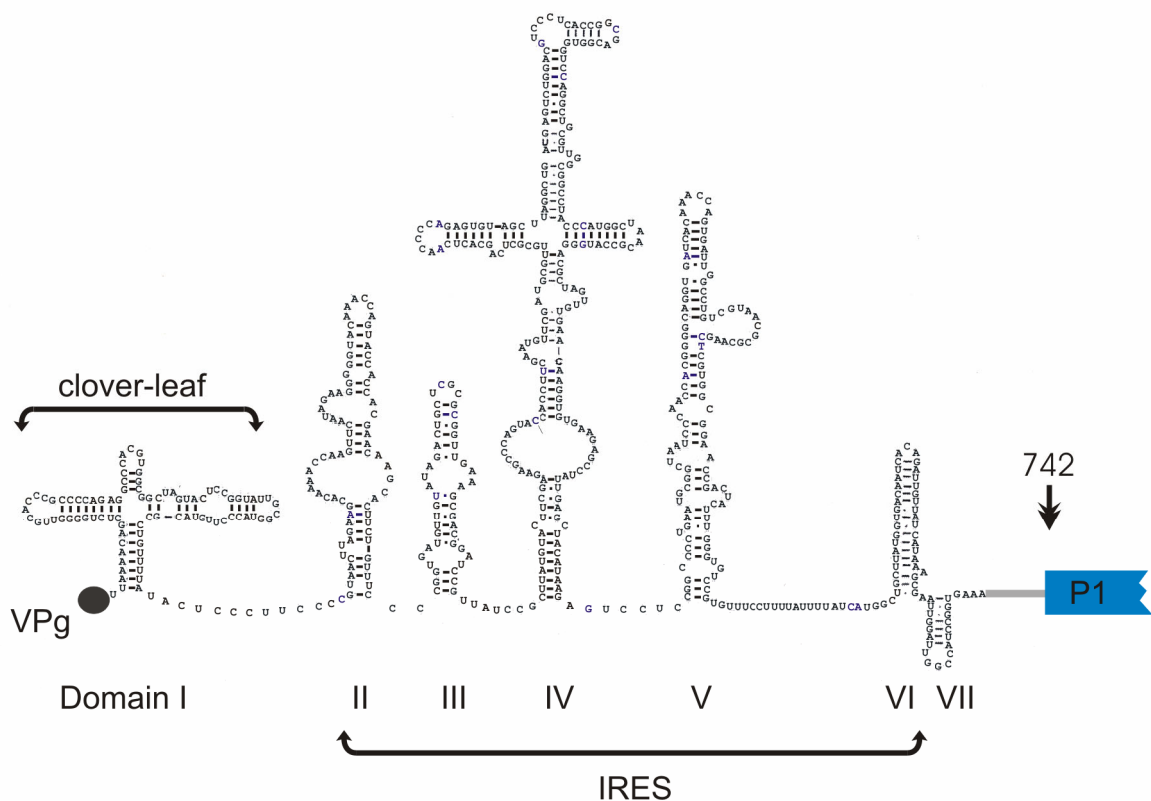


Abbildung 1-6: Sekundärstrukturmodell der 5'NCR.

Darstellung der clover-leaf-like Formation und IRES [Skinner et al., 1989].

Der ORF wird nach Zellinfektion in ein autokatalytisches Polyprotein translatiert, dessen Spaltprodukte die Struktur- und Nicht-Strukturproteine bilden. Es wird in 3 Teile eingeteilt. Im Abschnitt P1 sind die Kapsidproteine VP1 bis 4 kodiert. Der Abschnitt P2 kodiert für 3 (2A - C), der Abschnitt P3 für 4 Nicht-Strukturproteine (3A - D) [Wimmer et al., 1993].

Das translatierte Polyprotein wird durch die viruskodierten Proteasen 2A, 3C und 3CD gespalten [Hellen et al., 1991; Lawson et al., 1992]. Durch Spaltung von 3CD entstehen die 3C Protease und die 3D-Polymerase. Neben der proteolytischen Aktivität im Rahmen der Polyproteinprozessierung zeigen die Proteasen 2A und 3C auch inhibitorische Funktionen im Wirtszellstoffwechsel [Krausslich et al., 1987; Sonenberg, 1987]; [Clark et al., 1991; Yalamanchili et al., 1996].

Die weiteren Nichtstrukturproteine weisen Funktionen im Rahmen der Virusreplikation und in der Interaktion mit Wirtszellprozessen auf [Bienz et al., 1990; Cho et al., 1994]; [Paul et al., 2003]; [Towner et al., 1996; Richards et al., 1998; Strauss et al., 2003]; [Agol, 2002]; [Goodfellow et al., 2003].

Die 3'NCR beinhaltet zwei stem-loop Formationen, die über Interaktionen einen tertiären Pseudoknoten bilden und bei der Initiation der negativ-Strangsynthese des Virus von Bedeutung sind. Die Sequenzen der stem-Formationen sind hochgradig konserviert. [Pilipenko et al., 1992; Jacobson et al., 1993; Brown et al., 2005].

1.2.3 Pathogenese und Klinik

Die Übertragung des Poliovirus erfolgt fäkal-oral. Nach der oralen Aufnahme repliziert das Virus in Zellen der Schleimhaut des Pharynx und der Tonsillen, sowie nach der Magenpassage in den Geweben der duodenalen Mucosa, der Peyerschen Plaques und in den tiefen mesenterialen Lymphknoten. Die Inkubationszeit beträgt ca. 7 bis 14 Tage [2–25] [Cohen, 2001].

Mit der enteralen Replikation folgt bei den meisten Infizierten eine erste Virämie mit anschließendem Befall des systemischen Monozyten-Makrophagen-Systems. Dieses Stadium tritt klinisch evtl. als „grippaler Infekt“ in Erscheinung und kann nach Kontrolle der Infektion durch das Immunsystem als abortive Poliomyelitis die einzige klinische Erscheinung bleiben. Bei ca. 4 - 8 % aller Infizierten kommt es im weiteren Verlauf zu einer weiteren Virämie die sich klinisch in einer aseptischen Meningitis mit schneller Genesung ausdrückt [Cohen, 2001].

Ca. 1% aller Infizierten entwickeln eine paralytische Poliomyelitis. Diese ist gekennzeichnet durch den Untergang von Vorderhornzellen im Rückenmark und von alpha-Motoneuronen. Dies führt zur schlaffen Lähmung der innervierten Muskeln. Etwa 10 % aller paralytisch erkrankten Patienten müssen beatmet werden. Die Sterblichkeit unter Kindern beträgt ca. 2 - 5 %, unter Erwachsenen 15 - 30 % [Cohen, 2001].

Der genaue Weg der ZNS-Infektion ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen. Zwei Theorien dominieren die Diskussionen: 1. Das Virus gelangt direkt aus dem Blut ins Gehirn, nach Passieren der Blut-Gehirn-Schranke, unabhängig vom Rezeptor. 2. Wie bei Versuchen an Poliovirus-Rezeptor transgenen Mäusen gezeigt werden konnte, ist ebenso ein retrograder axonaler Transport von motorischen Endplatten ins ZNS möglich [Pallansch et al., 1996].

Die Genesung beginnt mit der Wiederherstellung der Funktionen in den betroffenen Muskelgruppen und kann über 6 Monate dauern. Paresen, die über diese Zeit hinweg persistieren, bleiben auf Dauer bestehen [Cohen, 2001].

Die Ausscheidung der Viren ist abhängig vom Immunstatus des Individuums: so wird die Quantität und Dauer der Ausscheidung signifikant reduziert durch erworbene

Immunität aus einer früheren natürlichen Infektion mit Wildviren, Impfungen oder konkurrierenden enterischen Infektion [Pallansch et al., 1996; Alexander et al., 1997]. Die natürliche Ausscheidungsdauer nach Infektion mit Polioviren beträgt selten mehr als 3 Monate [Gelfand et al., 1957]. Die längste dokumentierte Ausscheidung von Typ 1-Wildviren mit einer Dauer von 6 Monaten wurde von Hovi et al. bei Immigrantenzwillingen in Finnland beschrieben [Hovi et al., 2004].

1.3 Vakzin-abgeleitete Polioviren

Im Vergleich zu DNA-Viren oder zellulären Organismen zeichnen sich RNA-Viren, wie das Poliovirus, durch hochvariable Genome und eine hohe Evolutionsrate aus [Domingo et al., 1997; Drake, 1999; Drake et al., 1999]. Die Substitutionsrate pro Nukleotid und Jahr beträgt für das Poliovirusgenom ca. $6,9 \times 10^{-3}$ - $1,4 \times 10^{-2}$ (im Vergleich: zelluläre DNA 10^{-8} - 10^{-9} pro Nukleotid und Jahr) [Domingo, 2007].

Alterationen im antigenen Muster oder Reversionen in den genetischen Markern der Attenuierung treten schon während der natürlichen Exkretionsperiode von 3 - 4 Wochen nach Impfung auf [Minor et al., 1988; Minor, 1990]. In mehreren Untersuchungen von Stuhl und Liquor von VAPP-Patienten konnten Polioviren nachgewiesen werden, die sowohl genotypisch als auch phänotypisch als neurovirulent eingestuft werden konnten [Minor, 1992; Furione et al., 1993; Georgescu et al., 1994; Li et al., 1996; Georgescu et al., 1997]. Ein wesentlicher Faktor in der Ätiologie der VAPP wird daher in der Reversion zum neuropathogenen Phänotyp von im Darm replizierenden Impfviren gesehen [Macadam et al., 1989; Georgescu et al., 1997].

Entsprechend dem Grad der genetischen Divergenz zum Impfvirus in der Genomregion VP1 werden solche Viren als Sabin-ähnlich (=OPV-like, <1% Divergenz) oder als *vaccine-derived polioviruses* (=VDPV, Vakzine-abgeleitete Polioviren, 1% - 15% Divergenz) eingestuft [WHO, 2004].

1.3.1 Zirkulierende VDPVs

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die durchschnittliche Zirkulationsdauer von Polioimpfviren nach Massenimpfkampagnen maximal 3 Monate beträgt [Domok et al., 1961; Domok et al., 1962; Mas Lago et al., 2001]. Eine hohe Populationsimmunität begrenzt normalerweise die Dauer der Zirkulation [Dowdle et

al., 2003]. Bei nachlassendem Impfschutz in der Bevölkerung sowie schlechten hygienischen Verhältnissen können VDPVs langanhaltend zirkulieren (=cVDPV, *circulating* VDPV) und paralytische Erkrankungen auslösen. Dies wird begünstigt durch den weitgehenden Rückgang der Wildviruszirkulation und dem damit verbundenen Verlust von „natürlicher“ Immunität in der Bevölkerung. Ein hohes Risiko für cVDPVs tragen daher insbesondere die Regionen, in denen bei geringer Grundimmunisierungsrate intermittierende Massenimmunisierungskampagnen durchgeführt worden sind [Kew et al., 2004]. Ausbrüche von paralytischen Erkrankungen assoziiert mit cVDPVs traten in Hispaniola in den Jahren 2000-01 (Serotyp 1), 2001 auf den Philippinen (Typ 1), in Madagascar 2001-02 (Typ 2) und 2005 und in Nigeria 2007 auf. Retrospektiv konnte ein Ausbruch in Ägypten in den Jahren 1988-93 (Typ 2) und in Polen 1968 (Typ 3) festgestellt werden. Auf Hispaniola betrug die durchschnittliche Immunitätsrate unter 30%, in einigen Regionen unter 7 %. Die Ausbrüche wurden durch Massenimmunisierungen mit OPV gestoppt [Kew et al., 2004; Roberts, 2007].

1.3.2 VDPVs bei Immundefizienten

Von den cVDPVs werden formal *iVDPVs* unterschieden, die bei *immundefizienten* Patienten mit Hypogammaglobulinämie auftreten. Patienten mit primären Immundefizienzsyndromen haben im Vergleich zu Gesunden ein ca. 3000fach höheres Risiko an einer VAPP zu erkranken, wenn sie OPV exponiert waren [Sutter et al., 1994; Minor, 2001; Khetsuriani et al., 2003]. Die Applikation des Lebendimpfstoffes bei solchen Patienten ist daher kontraindiziert. Da ein gewisser medizinischer Standard in der Diagnostik und Behandlung von Immundefizienzsyndromen vorliegen muss, sind die meisten dieser Fälle in industrialisierten Ländern beobachtet worden. Bei entsprechend hoher Immunisierungsrate in diesen Ländern sind Transmissionen oder anhaltende Zirkulationen von *iVDPVs* äußerst selten [Dowdle et al., 2003].

1.4 Dauerausscheider von VDPVs

1.4.1 Bedeutung

Eine wesentliche Voraussetzung für die Eradikation der Poliomyelitis war, dass es keine chronischen Infektionen mit Polioviren gibt. Jedoch sind schon seit den 60er Jahren, kurz nach der Einführung des OPV-Impfstoffes, mehrere Fälle verlängerter Exkretion von Impfviren beschrieben worden [MacCallum, 1971].

Die Patienten, die Polioimpfviren verlängert ausscheiden, entwickeln häufig im Verlauf paralytische Symptomatiken, nur wenige bleiben neurologisch gesund [Misbah et al., 1991; Hovi et al., 2004; Martin et al., 2004]. Auf Grund der kontinuierlichen Akkumulation von Nukleotidsubstitutionen konnten auch bei diesen VDPV-Isolaten genetische und phänotypische Alterationen beobachtet werden, die auf eine erhöhte Neurovirulenz schließen ließen. Im Tiermodell konnten diese Annahmen bestätigt werden [Buttinelli et al., 2003; Martin et al., 2004; Yang et al., 2005]. Die Divergenzen zum Sabin-Progenitor betragen in einigen Studien z.B. über 10% in der VP1 Region [Kew et al., 1998; MacLennan et al., 2004].

Auch wenn iVDPV-Transmissionen von einem Dauerausscheider zu Kontaktpersonen bislang nicht beschrieben worden sind, erfahren die Fälle verlängerter Replikation im Rahmen der globalen Eradikationsbemühungen eine besondere Aufmerksamkeit, da sie eine Persistenz von potentiell neuropathogenen Polioviren in der Posteradikationsära bedeuten würden [WHO, 2003].

1.4.2 Einteilung und Häufigkeit

Ein verlängertes Ausscheiden von Polioviren wird abhängig von der Replikationsdauer entweder als prolongiert (Replikationsdauer bis max. 6 Monate) oder als chronisch (Replikationsdauer über 6 Monate) bezeichnet.

Ingesamt sind prolongierte oder chronische Ausscheidungen von Polioimpfviren selten. Seit den ersten Beschreibungen in den 60er Jahren sind weltweit ca. 30 Fälle von prolongierter oder chronischer Ausscheidung dokumentiert worden [MacCallum, 1971; WHO, 2003; Martin, 2006]. Aktuell sind 4 Fälle bekannt, die Polioviren kontinuierlich ausscheiden. Auf Grund fehlender Screening-Untersuchungen sind jedoch keine genauen Angaben zur Prävalenz möglich.

Da die Immunität gegen Polioviren hauptsächlich durch Antikörper vermittelt wird, stellen Patienten mit Immundefizienzsyndromen mit Hypogammaglobulinämie eine Gruppe mit erhöhtem Risiko für eine verlängerte enterale Replikation dar. So weisen

die meisten Dauerausscheider ein primäres Immundefizienzsyndrom auf. Von den publizierten Fällen zeigten nur wenige keine immunologischen Störungen [Wood et al., 2000; Cherkasova et al., 2002; Martin et al., 2004]. Jedoch sind auch in dieser Patientenpopulation Dauerausscheider selten. So ergab eine Studie von Halsey et al. bei 306 solcher Patienten aus den USA, Mexiko, Brasilien und Großbritannien keinen Dauerausscheider [Halsey et al., 2004].

Zu den assoziierten primären Immundefizienzsyndromen mit Ausprägung einer Hypogammaglobulinämie gehören ätiologisch uneinheitliche Krankheitsbilder, u.a.:

(i) Die X-linked Agammaglobulinaemia (Prävalenz ca. 1:700.000 in industrialisierten Ländern [Rosen et al., 1995]), die auf einem Block in der Prä-B-Zell-Differenzierung beruht, so dass keine Immunglobuline gebildet werden können – diese Erkrankung tritt zumeist schon während der Kindheit auf; (ii) das Hyper-IgM-Syndrom, welches in einem gestörten Klassen-Wechsel von IgM zu IgG, IgA und IgE ätiologisch begründet ist [Cooper et al., 2001]; (iii) die IgA-Defizienz (Prävalenz ca. 1:600 unter Europäern), die vermutlich auf einen Block der B-Zell-Differenzierung mit Beeinträchtigung der B-T-Zell-Interaktion beruht [Cooper et al., 2001]; (iv) das Common Variable Immunodeficiency Syndrome (kurz CVID, Prävalenz unter Kaukasiern ca. 1:25.000 [Castigli et al., 2006]), dessen Ätiologie nicht näher definiert ist – dieses tritt klinisch erst in der zweiten oder dritten Lebensdekade in Erscheinung. Eine OPV-Exposition in der Kindheit ist bei den CVID-Patienten anamnestisch häufig vorzufinden.

In wieweit eine AIDS-Erkrankung für eine verlängerte Ausscheidung von Polioviren prädisponiert ist bislang unklar. Gouandjika-Vasilache et al. konnten bei 28 untersuchten HIV-Infizierten aus Zentralafrika kein verlängertes Ausscheiden von Polioviren nach OPV-Exposition nachweisen [Gouandjika-Vasilache et al., 2005]. Dagegen beschrieb Pavlov et al. bei 3 von 186 untersuchten HIV-infizierten Kindern aus Süd Afrika Sabin-ähnliche Polioviren, die die letzte OPV-Impfung 15 und 42 Monate zuvor bekommen hatten [Pavlov et al., 2006].

1.4.3 Dauer und Termination der Ausscheidung

Die Dauer der Ausscheidung kann mehrere Jahre betragen. Die bislang längste Ausscheidung, die anhand von kontinuierlich gesammelten Stuhlproben beobachtet wurde, beträgt 12 Jahre [MacLennan et al., 2004]. Auf Grund der großen genetischen Divergenz der im Stuhl detektierten VDPVs zum Sabin-Stamm und der daraus extrapolierten Replikationsdauer wurde in mehreren Fällen ein wesentlich

längerer Zeitraum der enteralen Replikation angenommen. Die daraus ermittelten Infektionszeitpunkte zeigten z.T. Übereinstimmungen mit den in den Anamnesen vorgefundenen Daten der letzten OPV-Applikationen [Kew et al., 1998; Bellmunt et al., 1999; MacLennan et al., 2004].

Die Termination der prolongierten Replikation erfolgte in vielen Fällen mit dem Tod der Patienten, jedoch auch ohne erkennbare Gründe [WHO, 2002]. Es ist anzunehmen, dass sekretorisches IgA eine wesentliche Rolle bei der Termination der enteralen Replikation spielt. Savilahti et al. zeigte, dass Individuen mit IgA-Defizienz Sabin-Impfviren für längere Perioden ausschieden als Gesunde [Savilahti et al., 1988]. Mac Callum et al. berichteten von einer Termination der Ausscheidung nach einer *Shigella sonnei* – Infektion [MacCallum, 1971].

Erprobte Konzepte für eine medikamentöse Virusclearance gibt es zur Zeit nicht. Patienten mit Hypogammaglobulinämie werden mit regelmäßiger Gabe von intravenös applizierten Immunglobulinen (IVIGs) behandelt, die auch Antikörper gegen Polioviren enthalten. Eine Termination der Ausscheidung wurde jedoch unter dieser Behandlung nicht beobachtet. Butinelli et al. berichteten, bei gleichzeitiger Gabe des Virostatikums Pleconaril eine Virusclearance erreicht zu haben [Buttinelli et al., 2003]. Versuche von MacLennan et al., bei einem Dauerausscheider mit CIVD eine Virusclearance durch Applikation von oralen Immunglobulinen, Brust-Milch, Ribavirin oder Pleconaril zu erreichen, schlugen fehl [MacLennan et al., 2004; Martin, 2006].

1.5 Diagnostik

In der Labordiagnostik der Poliomyelitis steht die Isolierung (Anzucht) und Identifizierung (Typisierung) des Virus aus Patientenmaterial im Vordergrund. Serologische Untersuchungen, wie der Neutralisationstest, spielen bei epidemiologischen Untersuchungen eine Rolle. Bei der Diagnose der akuten Poliomyelitis sind sie von untergeordneter Bedeutung, da sie wegen der langen Inkubationszeit und der späten klinischen Präsentation der Poliomyelitis zumeist keine sichere Diagnose der akuten Poliomyelitis ermöglichen [Baumeister, 1996; Pallansch et al., 1996]. Auch der direkte Virusnachweis durch die Elektronenmikroskopie spielt in der Routine-Diagnostik keine Rolle [Cohen, 2001; WHO, 2004].

1.5.1 Isolierung und Typisierung

Die Virusisolierung erfolgt im Allgemeinen aus Stuhlproben, ist jedoch bei meningitischem Krankheitsbild auch aus dem Liquor oder, falls früh im Krankheitsverlauf gewonnen, aus Rachenspülwasser möglich [Cohen, 2001]. Es stehen verschiedene Zellkultursysteme zur Verfügung: u.a. L20B-, RD-, HEP2-Zellen [Baumeister, 1996; Wood et al., 1999]. Während RD- (humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie) und HEP2-Zellen (humane Larynxkarzinom-Zelllinie) auch ein Wachstum von anderen Non-Polio-Enteroviren ermöglichen, zeichnen sich L20B-Zellen (murine Zellen mit Expression des humanen Poliovirus-Rezeptors) durch eine höhere Selektivität für Polioviren aus [Wood et al., 1999]. Daher wird von der WHO eine Kombination von L20B- und RD-Zellkultursystemen empfohlen [WHO, 2004]. Die Replikation kann mikroskopisch an Hand des charakteristischen zytopathischen Effektes (CPE) nachgewiesen werden. Die Typisierung erfolgt mittels Neutralisationstests mit typenspezifischen, polyklonalen Antiseren [Baumeister, 1996; WHO, 2004]. Die Sensitivität von Zellkultursystemen bei der Diagnostik von Enterovirus-Infektionen ist von Robart et al. auf 65 - 75% beziffert worden [Rotbart et al., 1997].

Die Verwendung von spezifischen Primern ermöglicht die Anwendung der RT-PCR-Methode als hochsensitive Methode in der Diagnostik von Poliovirusinfektionen [Kilpatrick et al., 1996; Kilpatrick et al., 1998]. Yang et al. ermittelten in einer Studie zur Detektion und Identifikation von VDPVs eine 100-fach höhere Sensitivität der RT-PCR als das Zellkulturverfahren [Yang et al., 1991]. Die Sensitivität der PCR-

Methode konnte von Abraham et al. auf 100% bei einer Spezifität von 96% beziffert werden [Abraham et al., 1993]. Mehrere Genomabschnitte sind für die RT-PCR geeignet. Sowohl die Amplifikation in hochkonservierten Abschnitten wie die 5'NCR als auch in moderat konservierten Genomregionen wie die VP1 ermöglichen die Diagnose und Differenzierung von Polioviren. Darüber hinaus wird durch die Amplifikation die weitere Sequenz-Analyse und phylogenetische Einordnung der viralen RNA möglich [Pallansch et al., 1996; WHO, 2004; Pliaka et al., 2007].

1.5.2 Intratypische Differenzierung

Für die intratypische Differenzierung zwischen Impf- und Wildvirusinfektion stehen verschiedene Tests auf a) phänotypischer oder b) genotypischer Ebene zur Verfügung. Wegen möglicher Differenzen in den Testergebnissen werden bei der Beurteilung von Poliovirus-Isolaten, die in regionalen Referenz-Laboratorien durchgeführt wird, Untersuchungen auf beiden Ebenen durchgeführt [van der Avoort et al., 1995; WHO, 2004].

ad a) Auf phänotypischer Ebene werden u.a. folgende Methoden verwendet: ELISA, Mikroneutralisationstest, rct-Marker-Test (rct = reproductive capacity at different temperatures). Die Einordnung der Isolate erfolgt dabei als „Sabin-like“ (SL) oder „Non-Sabin-like“ (NSL). Der ELISA und der Mikroneutralisationstest basieren auf antigenen Differenzen zwischen Impf- und Wildviren, die durch kreuz-adsorbierte oder monoklonale stammspezifische Antikörper mit hoher Spezifität unterschieden werden können [Nibbeling et al., 1994]; [Osterhaus et al., 1983] [Osterhaus et al., 1984]. Dem gegenüber beruht der rct-Marker-Test (rct = reproductive capacity at different temperatures) auf unterschiedlichen Wachstumskapazitäten der Wild- und Impfviren bei supraoptimalen Temperaturen (>39°C) [Dubes et al., 1957; Nakano et al., 1978]. Da allerdings auch rct-negative Wildstämme beschrieben worden sind [Baumeister, 1996], wird dieses Verfahren von der WHO nicht zur routinemäßigen Anwendung empfohlen [WHO, 2004].

Für die experimentelle Untersuchung der Neurovirulenz von Virusisolaten stehen Affen und transgene Mäuse, die den humanen Poliovirus-Rezeptor exprimieren, als Tiermodelle zur Verfügung. Wegen der hohen Kosten in Etablierung und Durchführung werden Untersuchungen am Affen nicht routinemäßig eingesetzt. Sowohl beim Affenneurovirulenztest als auch beim transgenen Maus-Modell werden Polioviren intraspinal oder intrazerebral inokuliert [Kirschstein et al., 1960; Ren et al.,

1990]. Ein Tiermodell, welches den natürlichen Infektionsweg via Intestinum darstellen kann, existiert bislang nicht [Mueller et al., 2005].

ad b) Auf genotypischer Ebene stehen u.a. molekularbiologische Methoden wie RT-PCR mit Poliovirus-spezifischen Primern [Avalos Redon et al., 1998], RFLP (=restriction fragment length polymorphism assay) [Schweiger et al., 1994] und die probe-hybridization Methode zur Verfügung [De et al., 1995; WHO, 2004]. Diese Methoden basieren auf RNA-Sequenzunterschieden zwischen Wild- und Impfviren. Eine vergleichende Studie ergab für alle drei Methoden Übereinstimmungen von über 90% [van der Avoort et al., 1995]. Im Gegensatz zu RFLP und probe-hybridization Methode ermöglicht die Anwendung der RT-PCR zusätzlich die Analyse der RNA-Sequenz und damit die phylogenetische Einordnung von Poliovirus-Isolaten. Durch Sequenzierung im Genomabschnitt VP1 lassen sich folgende Einteilungen der Viren unternehmen [WHO, 2004]:

1. OPV-ähnliche Viren mit einer Divergenz von unter 1 % zum Impfstamm,
2. Vakzin-derived Polioviren (VDPV) mit einer Divergenz von 1 - 15 % zum Impfvirus.
3. Wildvirus-ähnliche Viren mit einer Divergenz von über 15 % auf Nukleotidebene.

2 Zielsetzung

Prolongierte oder chronische enterale Replikationen sind seltene Komplikationen bei der Anwendung des OPV-Impfstoffes. Auf Grund der möglichen Persistenz von potentiell neuropathogenen Polioviren erhalten jedoch Dauerausscheider im Rahmen der globalen Eradikationsbemühungen eine besondere Aufmerksamkeit.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, Poliovirus Serotyp 1-Isolate von einem in Deutschland lebenden Dauerausscheider hinsichtlich ihrer phänotypischen und genotypischen Eigenschaften zu untersuchen. Dies sollte anhand von zwei sequentiellen Virusisolaten erfolgen, um Aussagen über die Variabilität des Poliovirus während prolongierter enteraler Replikation treffen zu können.

In dem ersten Teil der Untersuchung sollten die Isolate mit international angewendeten Methoden zur intratypischen Differenzierung auf genotypischer und phänotypischer Ebene untersucht und charakterisiert werden.

In dem zweiten Teil sollten Totalsequenzen beider Isolate ermittelt werden. Anhand derer sollten zum einen eine phylogenetische Einordnung zu der Sabin Typ 1 Sequenz sowie zu weiteren bekannten Poliovirus-Sequenzen vorgenommen werden. Des Weiteren sollte die genomische Variabilität mit dem Fokus sowohl auf die putativen antigenen und attenuierenden Determinanten als auch auf andere entscheidende Genomregionen untersucht werden.

3 Materialien

3.1 Patientenmaterial

Die hier untersuchten Poliovirus-Isolate stammen von einer in Deutschland lebenden Patientin, die seit 2000 Polioviren des Serotyp 1 dauerhaft ausscheidet.

Die Patientin, geboren 1975 in Deutschland, litt im Alter von 23 Jahren unter einer Serie von schweren, atypischen Pneumonien worauf die Diagnose eines Antikörpermangelsyndroms unklarer Spezifität gestellt wurde. Nachfolgend erhielt die Patientin alle vier Wochen intravenöse Ig-Substitutionen. Im Januar 2000 entwickelte sie, nach einem kurzen viralen Infekt des oberen Respirationstraktes, eine basale Meningoenzephalitis mit subakuter Tetraparese und transienter Beatmungspflichtigkeit. Im März 2000 wurde Poliovirus Serotyp 1 als auslösendes Agens im Nationalen Referenzzentrum für Poliomyelitis- und Enteroviren am Robert Koch-Institut in Berlin isoliert.

Poliomyelitis-Routineimpfungen erhielt die Patientin in der Kindheit, die letzte Booster-Dosis ca. 3 Monate vor Diagnosestellung des AK-Mangelsyndroms. Die Patientin absolvierte von 1997 bis 1999 eine Ausbildung zur Medizinisch-technischen Assistentin in einem Routinelabor, wo sie regelmäßig in Kontakt mit Stuhlproben kam. Reisen in Länder mit endemischer Wildtyp-Zirkulation oder cVDPVs sind nicht bekannt.

Die hier beschriebenen Isolate wurden im März 2000 (Isolat 00-87), kurz nach Auftreten der Paresen, sowie im Juni 2004 (04-372) aus dem Stuhl der Patientin asserviert.

3.2 Chemikalien

Agarose	AGS, Heidelberg
Bromphenolblau	Feinchemie K.-H. Kallis KG
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Serva, Heidelberg
dN(U)TPs	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg

Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Glycerin	Serva, Heidelberg
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kalium-dihydrogen-orthophosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
L-Glutamine	Biochrom AG, Berlin
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Riedel-de Haën, Seelze
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Poly-oxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma, Taufkirchen
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin (TMB)	Sigma, Taufkirchen

3.3 Antibiotika und sonstige Zusätze

Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	MP Biomedicals, Eschewege
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Fötale Kälberserum (FCS)	GIBCO BRL, SA
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	Biochrom AG, Berlin
ELISA – Konjugat	Sigma, Taufkirchen
DNA-Längenstandard „Hyper-Ladder“	Bioline, Luckenwalde
DNA-Längenstandard 100bp	Gibco BRL, USA

3.4 Puffer, Lösungen

Standardpuffer und -lösungen

TBE (10x)	0,89 M Tris
	0,89 M Borsäure
	10 mM EDTA, pH 8,0

PBS (pH 7,2)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 80,9 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
TE (10x)	0,1 M Tris, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0
Probenpuffer für Gelelektrophorese	10 mM Tris-HCL, pH 7,5 2 mM EDTA Glycerin 15 % (v/v) Bromphenolblau 0,1% (v/v)

ELISA

Diluent	0,01 M PBS, pH 7,2 Tween 20 (Endkonzentration 0,5%) Kälberserum (Endkonzentration 5%)
Substrat	180 mg TMB 30 ml DMSO
Karbonat-Puffer (pH 9,6)	1,27 g Na ₂ CO ₃ 2,34 g NaHCO ₃ in 1 l Aqu.dest.
Natriumacetat-Puffer (pH 5,5)	9 g Natriumacetat in 900 ml Aqu.dest. mit 10% Essigsäure zu pH 5,5
Wasch-Puffer	Tween 20 (Endkonzentration 0,05 %) 0,01 M PBS, pH 7,2

3.5 Enzyme

M-MLV Reverse Transkriptase	GIBCO Life Sciences, USA
Powerscript Reverse Transkriptase	Clontech, St-Germain-en-Laye, France
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
RNAasin	Promega, USA
Taq DNA-Polymerase	InVitek, Berlin
Trypsin	Serva, Heidelberg

3.6 Kits

BigDye Terminator Cycle Sequencing-Mix with AmpliTaq ®FS	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Topo-XL-PCR CloningKit	Invitrogen, USA
OneShot Top10 Kit	Invitrogen, USA
Poliovirus-Diagnostik-Kit	CDC, Atlanta, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp Viral RNA Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Mini-Kit	Qiagen, Hilden
RIVM ELISA – Kit	RIVM, Bilthoven, Niederlande

3.7 Zellen

RD-Zelllinie	RKI, Berlin
L20B-Zelllinie	RKI, Berlin

3.8 Bakterienstämme

Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> Δ (<i>araleu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
-------	--

3.9 Kulturmedien und -lösungen

Nährmedien für die Bakterienkultivierung, sowie Zellkulturmedien wurden zentral am RKI hergestellt.

Bakterienkultur:

SOC	siehe TOPO XL PCR Cloning Kit
LB	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,2

Zellkultur:

MEM-HANK	Seromed, München
MEM-EARLE	Biochrom AG, Berlin

Die Zellkulturmedien MEM (1:1) wurden mit 10% FCS, 1% L-Glutamine, 1% NEAA, 1% Penicillin/Streptomycin und 5,6% NaHCO₃ versetzt.

Trypsin-Versenlösung (5L)	47,8 g isotonischer Puffer
	40 g NaCl
	1 g KCl
	5,75 g Na ₂ HPO ₄
	1g KH ₂ PO ₄
	0,05 g Phenolrot
	6,25 g Trypsin
	2,0 g EDTA

3.10 Oligonukleotide

Primer	Polarität*	Primer – Sequenz (5' – 3')	Position**	Spezifität
<u>Primer aus Poliovirus-Diagnostik-Kit, Spezifität gg. Poliovirus Serotyp 1 (VP1)</u>				
Sabins1	s	TCC ACT GGC TTC AGT GTT	2567 - 2585	IS00,IS04
Sabins2	as	AGG TCA AGA TGC TTG AAA GC	2488 - 2505	IS00,IS04
<u>Primer für Amplifikation und Sequenzierung in der Genomregion VP1</u>				
NRZ 22	s	GTC GTC CCT CTT TCG ACA CC	2362 - 2381	IS00,IS04
NRZ 6	as	AAR ATH TGC AAT TAC CAC TT	3430 - 3449	IS00,IS04
NRZ 21	s	TCC TTG GTT TTG TGT CAG CG	2396 - 2415	IS00,IS04
NRZ 7	as	AAY AAR GCA GTG TAC ACA GC	3403 - 3422	IS00,IS04
<u>Primer für Amplifikation und Sequenzierung in der Genomregion 5'NCR</u>				
NRZ 27	s	AGA GGC CCA CGT GGC GGC TA	31 – 50	IS00,IS04
NRZ 2	as	TGGCTGCTTATGGTGACAAT	579 - 598	IS00,IS04
NRZ 80	as	TACTTTGGGTGTCCGTGTT	542 - 562	IS00,IS04
<u>Primer für Amplifikation des zu klonierenden Genomabschnitts: TS-1</u>				
NRZ 27a	s	AGA GGC CCA CGT GGC GGC TAG TAC TCC GGT ATT GC	31 - 65	IS00,IS04
NRZ 15	as	AAC ACT GAA GCC AGT GGA	2566 - 2583	IS00,IS04
<u>Primer für Amplifikation des zu klonierenden Genomabschnitts: TS-2</u>				
NRZ 22	s	GTC GTC CCT CTT TCG ACA CC	2362 - 2381	IS00,IS04
NRZ 33	as	TCA TAC TGT TGT AGG GGT AAA TTT TTC TTT AAT TCG GAG	7404 - 7442	IS00,IS04
<u>Primer für Amplifikation und Sequenzierung in der Genomregion 3D - 3'NCR</u>				
NRZ 57	s	ATC AAT TAG ATG GAC AAA AGA	7185 - 7205	IS00,IS04
NRZ 58	s	CTT GGC ACA ATG GCG AAG AAG	7250 - 7270	IS00,IS04
T11C	as	GTT TTT TTT TTT	7442 - X	IS00,IS04

Primer	Polarität*	Primer – Sequenz (5' – 3')	Position**	Spezifität
<u>Sequenzierungsprimer</u>				
M13 rev	s	CAG GAA ACA GCT ATG A		Vektor
M13 forw	s	GTA AAA CGA CGG CCA G		Vektor
NRZ 27a	s	AGA GGC CCA CGT GGC GGC TAG TAC TCC GGT ATT GC	31 - 65	IS00,IS04
NRZ 34	s	CCT GAA TGC GGC TAA TCC CA	454 - 471	IS00,IS04
NRZ 43 TW	as	GGG GAT GTT TTT ATC AGG AC	925 - 941	IS00,IS04
NRZ 38 TW	s	ATG GGC GTT GGC CAG AAT AT	1055 - 1074	IS00,IS04
NRZ 39 TW	as	ATC CAC CGG GCA GAA CCT AC	1466 - 1485	IS00,IS04
NRZ 42 TW	s	ACA CTG GTG CTT CCT TAC GT	1570 - 1589	IS00,IS04
NRZ 35 TW	as	ACA GTT TGC CAG TTG CCA TC	2139 - 2158	IS00,IS04
NRZ 22	s	GTC GTC CCT CTT TCG ACA CC	2360 - 2379	IS00,IS04
NRZ 15	as	TCC ACT GGC TTC AGT GTT	2566 - 2583	IS00,IS04
NRZ 44 TW	s	GCA TGC GTG ACC ATT ATG ACC GTG G	2734 - 2758	IS00
NRZ 45 TW	s	ACA GTG GAC AAC TCA GCT TCC ACC G	2752 - 2776	IS04
NRZ 49 TW	s	CTT ACA CCy CTT CCC ACT AA	3352 - 3371	IS04
NRZ 48 TW	s	ACA CCC CTy CCC ACT AAG GA	3355 - 3374	IS00
NRZ 40 TW	s	GCA GGT TAC AAr ATT TGC AA	3421 - 3440	IS00,IS04
NRZ 51 TW	s	AAT ATA ACA GAG TTG ACT AAT ATG G	3904 – 3928	IS00
NRZ 52 TW	s	CCA GCA TGG TGA CCA GTA CC	3920 - 3939	IS04
NRZ 55 TW	s	CCC ATG GCA TCC CTG GAG GA	4729 - 4748	IS00,IS04
NRZ 46 TW	s	GTC CTT TAG TGT GTG GTA AGG CAA TTC	4970 – 4996	IS00,IS04
NRZ 47 TW	as	CCA ATG TTG GAT CTT CTG TTT CTC TC	5062 - 5087	IS00,IS04
NRZ 54 TW	s	CAT CAA GAC GAG TCC CCC TC	5145 - 5164	IS00,IS04
NRZ 53 TW	as	AGT TTG GCG CCC ACC GAG AT	5816 – 5835	IS04
NRZ 41 TW	as	AGA CCA TCA GTG CCA TAC AT	6289 - 6308	IS00,IS04
NRZ 50 TW	as	GTT TGT TCA AGA TGT CTC TC	6369 - 6386	IS04
NRZ 56 TW	as	ACC AGT GGG AGG TTG ATT CCA T	6431 – 6452	IS00
NRZ 37 TW	as	ACT AGC GTC AAC TTC ATG GG	6992 - 7011	IS00,IS04

* as = antisense, s = sense

3.11 Geräte / Utensilien

Gelelektrophorese-Kammer	Biozym Diagnostik, Oldenburg
CO2-Schränke CB-150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Mikrotiterplatten	TPP, Schwerin
SpectraFluor Plus	Tecan, Crailsheim
TPersonal	Biometra

Laborzentrifuge
Sequenzierungsgerät
Thermozykler
Videodokumentationssystem

Hettich, Tuttlingen
PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Biometra, Göttingen
Herolab, Wiesloch

3.12 Software

BioEdit 7.0.1
PHYMLIP, Version 3.65
Sequencher 3.1.1
Tree View 1.6.6
Mfold

Tom Hall³
Joe Felsenstein⁴
GeneCodes Corp, USA
R.Page⁵
M.Zuker⁶

³ www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html

⁴ <http://evolution.genetics.washington.edu/phymlip.html>

⁵ <http://evolution.genetics.washington.edu/phymlip.html>

⁶ <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/zukerm/home.html>

4 Methoden

4.1 Stuhlaufbereitung und Virusanzucht

4.1.1 Stuhlaufbereitungen

Zur Herstellung der Stuhlsuspension wurden ca. 5 g Stuhl mit 5 ml PBS-Puffer, 0,5 ml Chloroform und einigen Glasperlen (2 bis 4 Stück) versetzt. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur für 15 min. geschüttelt und bei 15.000 rpm für 10 min. zentrifugiert. Die wässrige Phase (Stuhlsuspension) wurde zur weiteren Bearbeitung entnommen.

4.1.2 Virusanzucht in der RD-Zellkultur

Zur Anzüchtung der Virusisolate wurden 25 µl aus der Stuhlsuspension auf 50 µl Vorlagemedium pro Well einer 96 - Lochplatte gegeben. Nach Zugabe von 100 µl RD-Zellsuspension pro Well erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Bei mikroskopischem Nachweis eines über die gesamte Welloberfläche ausgedehnten CPEs wurde die Suspension abgesogen und bei -20° C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

4.2 Intratypische Differenzierung

4.2.1 Phänotypische Untersuchungen

4.2.1.1 ELISA

Der Test basiert auf den Einsatz von kreuzabsorbierten Antikörpern, die zwischen Sabin-like – Isolaten (SL) und Non-Sabin-like – Isolaten (NSL) unterscheiden.

Als Testgrundlage wurde das RIVM-ELISA – Kit benutzt [Nibbeling et al., 1994]. Die Durchführung erfolgte nach Testvorschrift [WHO, 2004].

Das zu untersuchende Virusisolat mit bekanntem Serotyp wurde frisch passagiert. Zunächst wurde eine 96er Mikrotiterplatte mit bovinem Anti-Poliiovirus-Serotyp1 IgG beschichtet (= coating), bei 4°C über Nacht inkubiert und anschließend viermal mit Wasch-Puffer gewaschen. Um eine unspezifische Bindung von Antigen, Antiserum oder Konjugat an der Platte zu vermeiden, wurden 100 µl Diluent-Puffer zugefügt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert (= blocking mit PBS und 5% Kälberserum). Nach

erneutem viermaligem Waschen wurden 100 µl der Virusisolate zugegeben. Poliovirus Serotyp 1 - Prototypstämme (Mahoney als NSL-Kontrolle bzw. Sabin als SL-Kontrolle) wurden als Kontrollen eingesetzt. Die Platte wurde bei 37°C für 2 Stunden inkubiert und danach vier Mal gewaschen. Anschließend wurde die Platte mit 100 µl kreuz-absorbiertem Kaninchen-Antiserum (NSL-spezifisches Antiserum (anti-NSL), SL-spezifisches Antiserum (anti-SL) und typenspezifisches Antiserum (anti-total) als Positivkontrolle) beimpft und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurde jedes Well mit 100 µl Konjugat (Ziegen anti-Kaninchen-IgG, konjugiert mit Peroxidase) versetzt und erneut für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden 100 µl Substratlösung TMB zu jedem Well hinzugegeben und für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 2N H₂SO₄ gestoppt.

Das Messen der Extinktion erfolgte photometrisch bei 450 nm.

Zur Auswertung und Interpretation des Tests wurden Kriterien gemäß dem WHO-Laboratory Manual verwendet [WHO, 2004]:

1. Eine Probe gilt als SL, wenn der Quotient anti-SL / anti-NSL der Extinktionswerte Werte gleich oder größer als 2,5 aufweist.
2. Eine Probe gilt als NSL, wenn der Quotient anti-NSL / anti-SL der Extinktionswerte Werte gleich oder größer als 2,5 aufweist.

4.2.1.2 rct-Marker-Test

Unterschiedliche Reproduktionskapazitäten der Wild- und Impfviren bei supraoptimalen Temperaturen werden zur intratypischen Differenzierung genutzt und als rct-Wert quantitativ ausgedrückt [Dubes et al., 1957; Nakano et al., 1978]. Der rct-Wert ist definiert als Differenz zwischen dem log₁₀-Virus Titer eines Zellkulturisolates gemessen bei optimaler Temperatur (37°C) und supraoptimaler Temperatur (40°C). Die Titer der inokulierten Proben werden in TCID₅₀ (= tissue culture infective dose; Dosis / ml, die zur Infektion von 50% der Zellkulturwells einer Titerstufe benötigt wird) ausgedrückt. Entsprechend den Auswertungskriterien nach Nakano et al. werden Isolate mit rct-Werten > 2 als temperatursensitiv und damit als SL bzw. Isolate mit rct-Werten ≤ 2 als NSL eingestuft [Nakano et al., 1978].

Beide Isolate wurden in 10er Schritten verdünnt und für 6 Tage auf L20B-Zellen bei 37°C und 40°C inkubiert. Zusätzlich wurden NSL-Kontrollen und SL-Kontrollen

mitgeführt. Anschließend wurden beide Versuchsreihen auf CPEs in der Zellkultur untersucht und die TCID50-Werte ermittelt.

4.2.2 Molekularbiologische Untersuchung

4.2.2.1 Poliovirus-Diagnostik-PCR

Der Poliovirus-Diagnostik-PCR-Kit wird zur intratypischen Differenzierung auf genomischer Ebene von der WHO empfohlen [WHO, 2004]. Der Test ist als Stufentest aufgebaut und beinhaltet PCR-Tests zum Nachweis von Entero- bzw. Polioviren, zur Polioserotypisierung sowie einen PCR-Test zur intratypischen Differenzierung von Poliovirus-Isolaten. In dieser Arbeit wurde lediglich der Test zur intratypischen Differenzierung mit Sabin-spezifischen Primern durchgeführt.

Der Test basiert auf einer Multiplex-PCR-Reaktion mit Sabin-spezifischen Primern für alle 3 Serotypen.

Die verwendeten Puffer sind:

1. Puffer A – enthält spezifische Primer gegen Sabin-Viren der Serotypen 1 bis 3
2. Puffer B – PCR-Puffer, die vor Benutzung mit 0,7 µl 1M DTT, 6,9µl 40 U/µl RNAse, 3,6 µl 25 U/µl AMV Reverse Transkriptase und 13,7 µl 5 U/µl Taq-Polymerase versetzt wurden.

Zunächst wurden 1 µl der Virusisolate in einer 1:4 Verdünnung mit 19 µl Puffer A vermengt. Anschließend wurde die Lösung für 5 min. bei 95°C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Die erkaltete Probe wurde schließlich mit 5µl Puffer B versetzt.

Die Reaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

20 min. reverse Transkription bei 42°C	
3 min. Inaktivierung bei 95°C	
45 sek. bei 95°C Denaturierung	} 30 Zyklen
45 sek. bei 55°C Primer Annealing	
45 sek. bei 70°C Elongation	
Ende der Reaktion und Lagerung bei 4°C	

Für die elektrophoretische Analyse der Amplifikate wurde ein 2,0% Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) verwendet. Als Phorese-Puffer wurde 0,5x TBE-Puffer eingesetzt. 5 µl des Amplifikates wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer (enthält 0,25% Bromphenolblau) versetzt und in die Geltaschen appliziert.

Für die Größenbestimmung wurde parallel ein Längenstandard (10bp DNA-Leiter) aufgetragen.

Die Auswertung erfolgte auf einem MTP-Fluoreszenz-Photometer (SpectralFluor Plus) mittels kurzwelligem UV-Licht (280 nm) und einem Videodokumentations-System.

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte an Hand der Existenz und Größe der PCR-Amplifikate im Vergleich mit den Kontroll-Reaktionen (Sabin Typ 1 – Sabin Typ 3).

Ein positives Signal einer Probe wurde als SL eingestuft, bei Fehlen eines Signals entsprechend als NSL [WHO, 2004].

4.3 Erstellung der Totalsequenzen

4.3.1 RNA Isolierung

Die Isolation der RNA aus den Zellkulturisolaten erfolgte mit Hilfe des QIAmp Viral RNA Kit der Firma Qiagen entsprechend den Herstelleranweisungen. Die RNA wurde nach Zugabe von RNAsin (1,25 µl /50 µl, 40 U/l) bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

4.3.2 Reverse Transkription

Die Umschreibung der viralen RNA in cDNA wurde mit Hilfe des PowerScript-Enzymsystems der Fa. Clontech unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden 5 µl RNA mit 1 µl Primer und 14 µl H₂O versetzt, bei 94°C für 80 sek. denaturiert und auf Eis abgekühlt. Der denaturierte Ansatz wurde anschließend dem Lyophilisat (enthält Reverse Transkriptase, dNTPs und Puffer) zupipettiert. Die Elongation erfolgte bei 42°C für 90 min. Bei 70°C für 15 min. wurde die Reaktion terminiert.

Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die Amplifikation und Sequenzierung erfolgte in 3 sich überlappenden Abschnitten: TS1, TS2 und TS3.

4.3.3 Amplifikation und Sequenzierung von TS1 und TS2

Polymerase-Kettenreaktion

Zur Minimierung von durch die Polymerase eingebauten Fehlern wurde mit einer DNA-Polymerase gearbeitet, die eine 3' – 5' Exonuklease-Funktion besitzt und somit fehlerhaft eingebaute Basen ausschneiden kann („proof-reading“). Es wurde das Phusion-PCR-Kit der Fa. Finnzymes Oy verwendet.

Die Auswahl der Primer für die PCR erfolgte anhand eines Alignments von zwei Sabin Typ 1 Sequenzen (accession number V01150 und AY184219) und zwei Mahoney Sequenzen (accession number V01148 und V01149). Es ergaben sich zu amplifizierende DNA-Moleküle von 2550 bp (bezeichnet mit **TS1**) bzw. 5081 bp (bezeichnet mit **TS2**) Länge.

Das Protokoll für den Reaktionsansatz stellte sich wie folgt dar:

H ₂ O	11,8 µl
5x PhusionPuffer HF	4 µl
MgCl (50 mM)	0,8 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
sense Primer (25 µM)	0,4 µl
antisense Primer (25 µM)	0,4 µl
PhuPol (2 Units/µl)	0,2 µl
cDNA	2 µl

Auf Grund der unterschiedlichen Länge der zu erwartenden Produkte und wegen der unterschiedlichen Primer wurden bzgl. Elongationszeit und Annealingtemperatur unterschiedliche Reaktionsprogramme angewendet.

Reaktionsablauf für TS1:

30 sek. Denaturierung bei 98°C	} 35 Zyklen
10 sek. Denaturierung bei 98°C 10 sek.	
Hybridisierung bei 52°C	
1 min. 30 sek. Elongation bei 72°C	
5 min. abschließende Elongation bei 72°C	
Ende der Reaktion und Lagerung bei 4°C	

Reaktionsablauf für TS2:

30 sek. Denaturierung bei 98°C
10 sek. Denaturierung bei 98°C 10 sek.
Hybridisierung bei 59°C
3 min. 45 sek. Elongation bei 72°C
5 min. abschließende Elongation bei 72°C
Ende der Reaktion und Lagerung bei 4°C

} 35 Zyklen

Gelpräparation und Vorbereitung zur Klonierung

Im Anschluss an die PCR wurde eine Gelelektrophorese bei 100 V für ca. 1,5 h und eine Extraktion der Banden mit der definierten Länge aus dem Gel vorgenommen. Die Banden wurden unter langwelligem UV-Licht aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion der DNA aus den Exzisaten erfolgte unter Verwendung des QIAQuick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben.

Auf Grund der Amplifikation mit Hilfe eines proof-reading Enzyms fehlten an den 3'-Enden der DNA-Doppelstränge überstehende Adenin-Reste, die für die Ligation zur Klonierung vorhanden sein müssen. Die fehlenden Adenin-Basen wurden in einem weiteren Zyklus unter Verwendung der Taq-Polymerase an die Amplifikate angehängt. Dazu wurde jedes Extraktionsfiltrat mit 1 µl Taq-Ansatz (enthält 0,1 µl Taq-Polymerase und 0,4 µl dNTPs) versetzt und folgende Inkubationen durchgeführt:

30 sek. Denaturieren bei 94°C
30 sek. Annealing bei 42°C
15 sek. Processing bei 72°C
4°C Ende des Programms

} 5 Zyklen

Im Anschluss wurden die Substrate mit Hilfe des QIA PCR Purification-Kit der Firma Qiagen von Salzen, Enzymen und überschüssigen dNTPs gereinigt. Die Reinigung wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Klonierung

Das Poliovirus liegt auf Grund seiner fehleranfälligen RNA-Polymerase als Quasispezies im Isolat vor. Um bei der Sequenzierung Heterogenitäten im Chromatogramm zu vermeiden, wurden mit Hilfe der Klonierung die PCR-Amplifikate vereinzelt.

Bei der Klonierung wurde das TOPO XL PCR-Cloning Kit der Firma Invitrogen eingesetzt, das alle benötigten Reagenzien enthält (inklusive Topoisomerase 1 und pCR-XL-TOPO Vektor).

Die Ligation erfolgte über die Bindung der angehängten Adenin-Reste an den 3'-Enden der Amplifikate an die beim Vektor am 5'-Ende vorhandenen Thymin-Reste (TA-cloning, sticky ends ligation). Mit Hilfe der Topoisomerase 1 des Vacciniavirus wurde die DNA an den Vektor kovalent gebunden.

Kompetente Top10 E.coli-Stämme wurden mittels der Hitzeschockmethode nach Herstellerangaben (One Shot Kit) transformiert, auf selektiven LB-Agarplatten (mit 50 µg Kanamycin/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mini-Plasmidpräparation zur Sequenzierung

Die Kolonien wurden in 4 ml vorbereitetes LB-Kanamycin-Medium überimpft und für 12-16 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden anschließend für 5 min. bei 4.000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Die Plasmidpräparation wurde mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Lagerung der gereinigten Plasmide erfolgte bei -20°C.

DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung der Amplifikate wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger angewendet. Die Sequenzanalysen wurden nach dem Protokoll "BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4 µl Stammlösung (enthält Puffer, ddNTPs, dNTPs und Taq-Polymerase) wurde entsprechend den Herstellerangaben hergestellt und mit 1 µl Primer und 1 bis 2,5 µl der Substratlösung (entsprechend der Bandenstärke in der Gelelektrophorese; ca. 50 ng DNA) versetzt.

Das Standardprotokoll der Sequenzierungsreaktion lautete:

1 min. Denaturierung bei 96°C	}	35 Zyklen
15 sek. Denaturierung bei 96°C		
15 sek. Hybridisierung bei 42°C		
4 min. Elongation bei 60°C		
Ende der Reaktion und Lagerung bei 4°C		

Die Annealingtemperatur wurde je nach Schmelztemperatur des verwendeten Primers spezifisch eingestellt.

Durch Ethanol-Fällung (für PAGE-Sequencer ABI 377) oder Aufreinigung über Sephadex-Säulen (Sephadex G-50 Superfine) wurden überschüssige Farbstoffe entfernt.

Die Säulen-Aufreinigung und die Bedienung der Sequenzierautomaten wurde zentral am RKI durchgeführt.

Zur Analyse der Sequenzchromatogramme wurde das Programm „Sequencher“ (Version 3.1, Gene Codes Corp, Michigan-USA) eingesetzt.

4.3.4 Amplifikation und Sequenzierung von TS3

Da durch die Klonsequenzen die Region 3'NCR nicht erfasst werden konnte, wurde durch folgende *nested* PCR mit anschließender Direktsequenzierung die molekularbiologische Analyse der Isolate 00-87 und 04-372 auf diesen Bereich ausgedehnt.

Protokoll für die äußere PCR:

H ₂ O	14,4 µl
10x Taq-Puffer	2,5 µl
MgCl (50mM)	0,75 µl
dNUTPs (2 mM)	1,25 µl
sense Primer (25 µM)	0,5 µl
antisense Primer (25 µM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
cDNA	5 µl

Reaktionsprogramm für die äußere PCR:

30 sek. Denaturierung bei 94°C
30 sek. Hybridisierung entspr. Schmelztemperatur der Primer
15 sek. Elongation bei 72°C
3 min. abschließende Elongation bei 72°C
Ende der Reaktion und Lagerung bei 4°C

} 35 Zyklen

Protokoll für die innere PCR:

H ₂ O	17,4 µl
10x Taq-Puffer	2,5 µl
MgCl (50mM)	0,75 µl
dNUTPs (2 mM)	1,25 µl
sense Primer (25 µM)	0,5 µl
antisense Primer (25 µM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Produkt aus äußerer PCR	2 µl

Reaktionsprogramm für die innere PCR:

30 sek. Denaturierung bei 94°C
30 sek. Hybridisierung entspr. Schmelztemperatur der Primer
10 sek. Elongation bei 72°C
3 min. abschließende Elongation bei 72°C
Ende der Reaktion und Lagerung bei 4°C

} 35 Zyklen

Die Sequenzierung erfolgte gemäß dem in Abschnitt 4.3.3 DNA-Sequenzierung angegebenen Protokoll.

4.4 Erstellung von Direktsequenzen in den Regionen VP1 und 5'NCR

Um die ermittelten Klonsequenzen im Rahmen der Quasispezies-Verteilung im Stuhlmaterial einordnen zu können, wurden zusätzlich PCR-Amplifikate der Region 5'NCR und VP1 aus der Stuhlprobe bzw. aus dem Zellkulturüberstand angefertigt und anschließend direkt sequenziert. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe der Phusion DNA-Polymerase als *nested* PCR.

4.4.1 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Die Umschreibung erfolgte durch Reverse Transkriptase (RT).

Zusammensetzung des RT-Ansatzes:

5×RT-Puffer	2,0 µl
100 mM DTT	0,5 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
Primer(25 µM)	0,5 µl
RNAsin (40 U/µl)	0,25 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	
(200 U/µl)	0,25 µl
Nukleinsäure	0,5 µl

Der Ansatz wurde 5 min. bei 42°C, 20 min. bei 37°C und 5 min. bei 94°C inkubiert.

4.4.2 Amplifikation

Protokoll für die äußere PCR:

H ₂ O	11,3 µl
5x Phusion HF Puffer	4 µl
MgCl (50 mM)	0,8 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
Sense Primer	0,4 µl
Antisense Primer	0,4 µl
Phusion Polymerase	0,2 µl
cDNA	2,5 µl

Reaktionsprogramm für die äußere PCR:

30 sek. Denaturierung bei 98°C	} 35 Zyklen
10 sek. Denaturierung bei 98°C	
10 sek. Hybridisierung bei 42°C	
3 min. 45 sek. Elongation bei 72°C	
5 min. abschließende Elongation bei 72°C	
Ende der Reaktion und Lagerung bei 4°C	

Protokoll für die innere PCR (nur im Genomabschnitt VP1 angewendet):

H ₂ O	12,8 µl
5x Phusion HF Puffer	4 µl
MgCl (50 mM)	0,8 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
Sense Primer	0,4 µl
Antisense Primer	0,4 µl
Phusion Polymerase	0,2 µl
Amplifikat aus erster PCR	1 µl

Reaktionsprogramm für die innere PCR:

30 sek. Denaturierung bei 98°C
10 sek. Denaturierung bei 98°C
10 sek. Hybridisierung bei 50°C
3 min. 45 sek. Elongation bei 72°C
5 min. abschließende Elongation bei 72°C
Ende der Reaktion und Lagerung bei 4°C

} 35 Zyklen

4.4.3 Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung

Die Analyse der PCR-Amplifikate erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem 1,0% Agarosegel. Als Längenstandard wurde je nach zu erwartender Amplifikatgröße die 100 bp DNA-Leiter oder die Hyper-Ladder (Fa. Bionline) mit aufgetragen.

Die Sequenzierung erfolgte gemäß dem in Abschnitt 4.3.3 DNA-Sequenzierung angegebenen Protokoll.

4.5 Phylogenetische Analyse

Mit Hilfe der phylogenetischen Analyse wurden die gewonnenen Nukleotidsequenzen in Form von Baumdiagrammen graphisch dargestellt und nach der genetischen Distanz ausgewertet. Die Länge der Äste in einem phylogenetischen Baum ist ein Maß für die Nukleotidaustausche pro Position.

Zur Berechnung der Identitäten, Divergenzen (DNAdist: Kimura-2, Transition/Transversion = 2,0) und des Stammbaums (Neighbour, Treeview 1.6.6) wurde die Software BioEdit 7.0.1 (enthält PHYLIP 3.5) verwendet. Bootstrapwerte für die Stammbäume wurden mit dem PHYLIP-Paket 4.0 ermittelt. Analysen hinsichtlich der Sekundärstruktur von RNA-Abschnitten wurden nach der Methode von D. Stewart und M. Zuker [Zuker, 2003] durchgeführt.

4.6 Qualitätskontrolle und Vermeidung von Kontamination

Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen durch Produktverschleppung oder bei der Aufarbeitung von Patientenproben wurden besondere Sicherheitsmaßnahmen eingehalten.

Die Stuhlsuspension, die RNA-Isolierung sowie die Zugabe der RNA, cDNA und der DNA zu den jeweiligen Reaktionsansätzen erfolgten jeweils unter einer separaten Laminar-Flow-Arbeitsbank mit strikter räumlicher Trennung. Die jeweiligen Reaktionsgemische wurden in einem Raum angesetzt, in dem weder RNA noch DNA verarbeitet wurden.

Beim Pipettieren von DNA-oder RNA-haltigen Lösungen kam es grundsätzlich zum Einsatz von Filterpipettenspitzen, um eine Kontamination der Proben durch Aerosole zu vermeiden. Zusätzlich wurden Negativkontrollen mitgeführt.

5 Ergebnisse

Die hier beschriebene Untersuchung erfolgte an zwei Poliovirus-Isolaten:

00-87 aus dem Jahr 2000 und

04-372 aus dem Jahr 2004.

Die bei Erstdiagnose der Poliomyelitis im Jahr 2000 über den Neutralisationstest erfolgte Typisierung der Virusisolate ergab den Serotyp 1.

Die Untersuchung lässt sich in zwei Phasen einteilen:

1. die intratypische Differenzierung der Isolate, basierend sowohl auf Untersuchungen des Virusphänotyps (ELISA, rct-Marker) als auch auf genomischen Charakteristika (Poliovirus-Diagnostik-PCR).
2. nach Erstellung von mehreren Totalsequenzen beider Isolate Untersuchungen auf genomischer Ebene.

5.1 Intratypische Differenzierung

5.1.1 Phänotypische Untersuchungen

5.1.1.1 ELISA

Mit Hilfe des ELISAs wurden beide Virusisolate hinsichtlich ihrer antigenen Eigenschaften untersucht. Der Test beruht auf kreuz-adsorbierten polyklonalen Antikörpern, die spezifisch entweder Impfvirus-ähnliche Viren (SL) oder Nicht-Impfvirus-ähnliche Viren (NSL) binden (Methode: Kapitel 4.2.1.1).

Die Ergebnisse der photometrischen Messungen sind in Tabelle 5-1 dargestellt.

Die Isolate 00-87 und 04-372 wiesen für den Quotienten NSL/SL Werte von über 2,5 auf (6,37 für 00-87 und 13,86 für 04-372). Gemäß den WHO-Kriterien zur Auswertung des Tests [WHO, 2004], wurden somit beide Isolate als NSL klassifiziert.

	Extinktionswerte				Auswertung	
	Anti-Total*	Anti-NSL*	Anti-SL*	NK*	SL/NSL*	NSL/SL*
Ko.NSL +**	1,8603	1,3461	0,1682	0,0447		
Ko.SL +**	1,4256	0,0900	1,3450	0,0454		
00-87	1,0449	0,6241	0,0979	0,0458	0,16	6,37
04-372	1,4814	1,1328	0,0817	0,0475	0,07	13,86

Tabelle 5-1: ELISA – gemessene Extinktionswerte und deren Auswertung.

* *Anti-Total = Poliovirus Serotyp 1-spezifisches Antiserum; Anti-NSL = Wildtyp- spezifisches Antiserum; Anti-SL = Sabin-spezifisches Antiserum; NK = Negativkontrolle; SL/NSL und NSL/SL = Quotienten der Extinktionswerte;*
 ** *Ko.NSL + = Wildtyp-Kontrolle (NSL); Ko.SL + = Sabin-Kontrolle (SL).*

5.1.1.2 rct-Marker-Test

Als weiterer phänotypischer Test für beide Isolate wurde der rct-Marker untersucht (Methode: Kapitel 4.2.1.2).

Beide Isolate wurden bei 37°C bzw. 40°C für 6 Tage auf L20B Zellen inkubiert. Anschließend wurden die TCID50-Werte bei beiden Inkubationstemperaturen bestimmt und deren Differenz ermittelt (= rct-Wert; Tabelle 5-2).

Beide Isolate zeigten rct-Werte von unter 2 (Tabelle 5-2) und wurden damit entsprechend den von Nakano et al. vorgeschlagenen Kriterien zur Interpretation des Tests als NSL eingestuft [Nakano et al., 1978].

	Titer 37°C	Titer 40°C	rct-Wert
Ko.NSL*	6,5	4,5	2
Ko.SL*	6,5	1,5	5
00-87	6,5	5,0	1,5
04-372	6,5	6,5	0

Tabelle 5-2: rct-Marker

Ermittelte TCID50 bei 37°C und 40°C und deren Differenz (rct-Wert) der Isolate 00-87 und 04-372 nach 6 Tagen Inkubation.

** Ko.NSL = NSL-Kontrolle; Ko.SL = SL-Kontrolle*

5.1.2 Genotypische Untersuchungen

5.1.2.1 Poliovirus-Diagnostik-PCR

Zur intratypischen Einordnung der Virusisolate auf genomischer Ebene wurde die Poliovirus-Diagnostik-PCR herangezogen (Methoden: Kapitel 4.2.2.1).

Die Gelelektrophorese nach PCR-Amplifikation mit Sabin-spezifischen Primern (Multiplex-PCR, Genomregion VP1) zeigte bei beiden Isolaten deutliche Banden in Höhe der Sabin Serotyp 1-Kontrollbande (97 bp, Abbildung 4-1).

Beide Isolate zeigten somit – im Gegensatz zu den phänotypischen Untersuchungen - SL Eigenschaften.

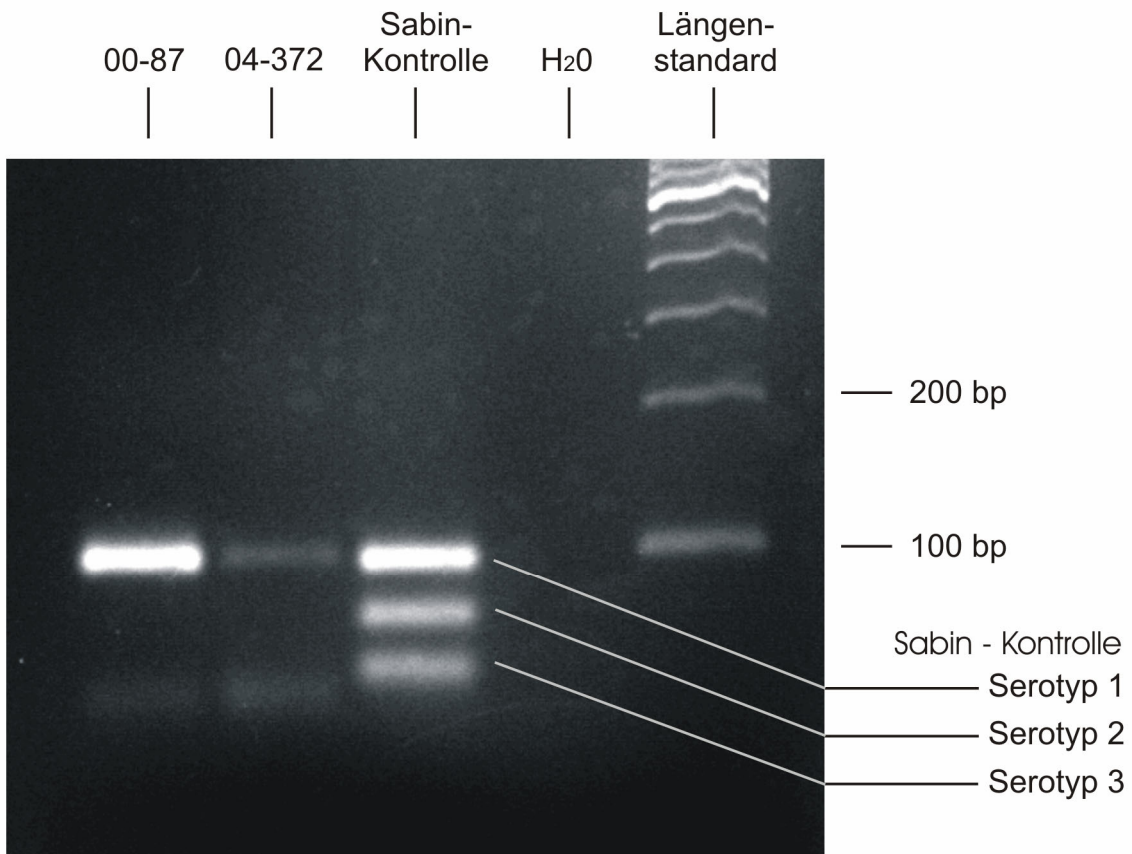


Abbildung 5-1: Poliovirus-Diagnostik-PCR (Sabin-spezifische Primer)
Signale der Isolate 00-87 und 04-372 in Höhe der Sabin Serotyp 1-Kontrollbande (97 bp).

5.2 Genomanalyse

Zur weiteren Feincharakterisierung der Isolate unter Einbeziehung der Erfassung der antigenen Drift im Verlauf der vier-jährigen intestinalen Replikation wurden Totalsequenzen aus beiden Isolaten erstellt (Methoden: Kapitel 4.3).

Die in dieser Arbeit ermittelten Nukleotidsequenzen sind in der internationalen Datenbank GenBank⁷ unter den Datenbanknummern DQ411554 bis DQ411569 sowie im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

5.2.1 Erstellung der Totalsequenzen

Da anzunehmen war, dass die Poliovirus-Isolate eine große genomische Variabilität aufweisen würden (Quasispezies-Population), sollte die Amplifikation der Virus-RNA in möglichst großen Teilstücken erfolgen. Eine geringe Kongruenz unter den Teilstücken im Hinblick auf das Gesamtgenom der Viren sollte so vermieden werden. Um eine möglichst spezifische Amplifikation zu gewährleisten, wurden die Lokalisationen der Primer innerhalb von bekannten konservierten Genomregionen der Sabin Serotyp 1-Sequenz gewählt [Nomoto et al., 1982]. Dabei wurde auf eine möglichst hohe Annealingtemperatur der Primer Wert gelegt.

Da die 5'NCR eine ausgeprägte stem-loop-Struktur aufweist, wurde die Lokalisation des 5'-terminellen sense-Primers so gewählt, dass die Primersequenz, insbesondere der 3'-Bereich, innerhalb einer loop-Struktur liegt. Die Lokalisationen der sense- und antisense- Primer im Genombereich VP3 bzw. 2A wurden auf der Basis von gering variablen Bereichen ausgewählt, die im Alignment von bereits bekannten Sabin Serotyp 1 – Sequenzen ermittelt wurden.

Es wurden zwei sich überlappende Teilstücke (TS1 und TS2) des Genoms amplifiziert. Die Länge der Überlappung betrug 223 bp (Abbildung 5-2).

Auf Grund der Lage und Länge des für die Amplifikation von TS2 verwendeten antisense-Primers NRZ 33 am 3'-Ende der Sabin Typ 1 - Sequenz konnte die Originalsequenz der Region 3'NCR durch die Sequenzierung der TS2-Klone nicht erfasst werden. Daher wurde nach einer erneuten Umschreibung von RNA mit Hilfe eines oligo-dT Primers (T11C) ein 167 nt langer DNA-Abschnitt der Region 3D-3'NCR (TS3) amplifiziert und anschließend direkt sequenziert.

⁷ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

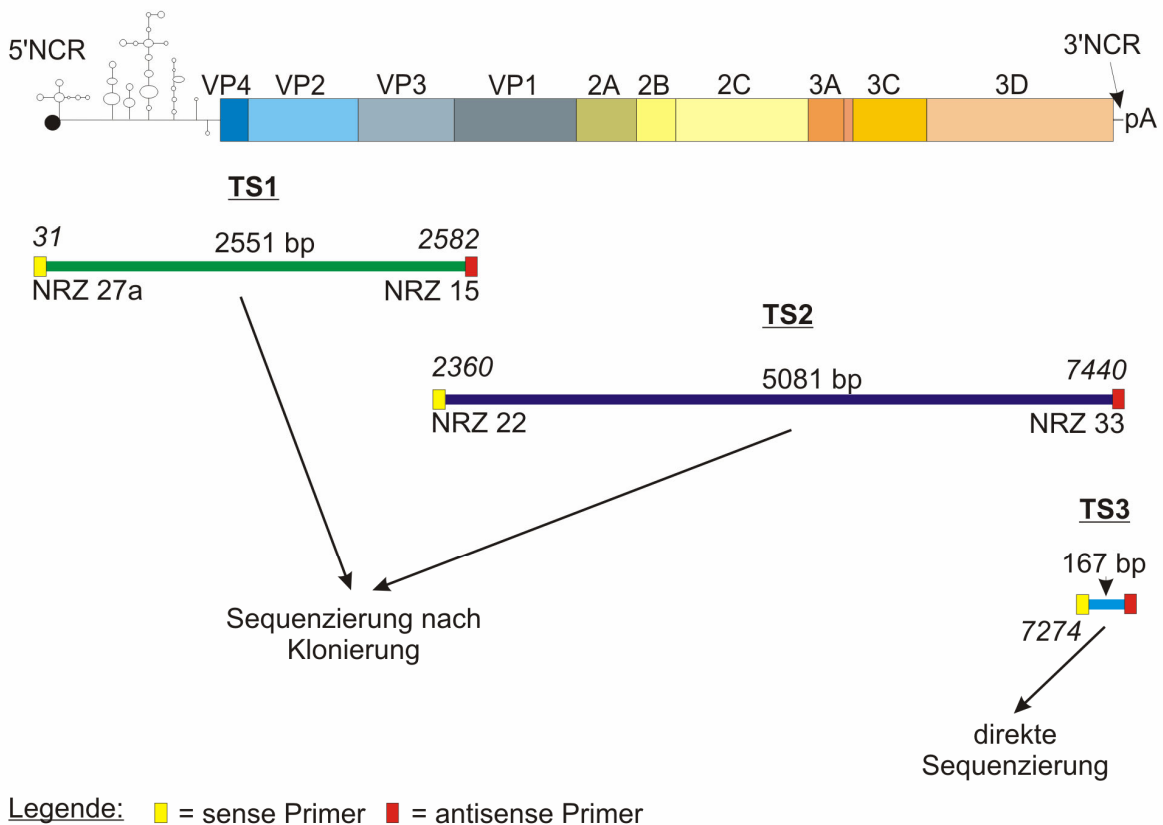
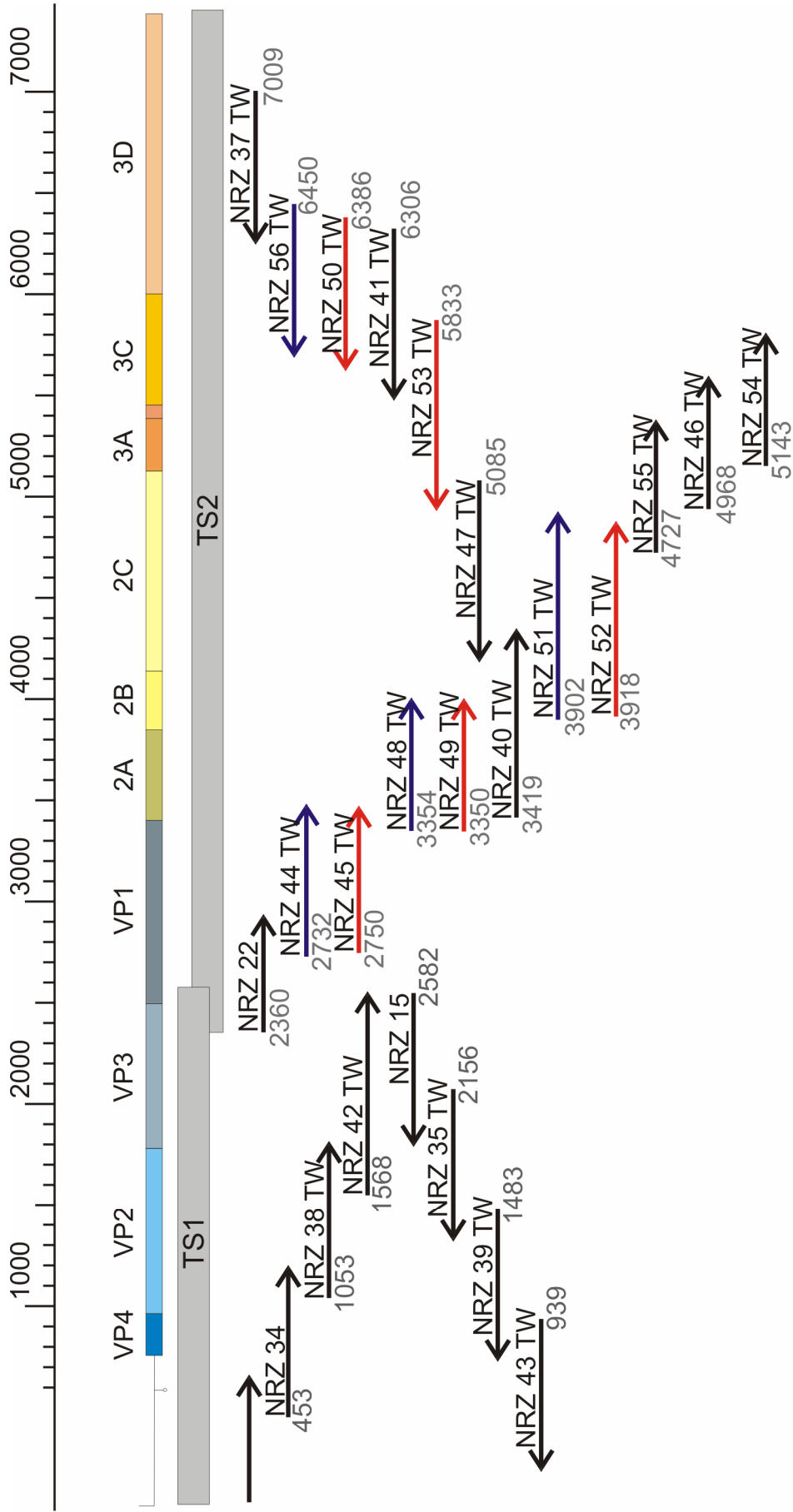


Abbildung 5-2: Schematische Darstellung der Erstellung der Totalsequenzen
Es wurden drei Teilstücke des Genoms amplifiziert: TS1, TS2, TS3. Die Länge der Überlappung zwischen TS1 und TS2 betrug 223 bp, zwischen TS2 und TS3 192 bp. Die kursiv angegebenen Koordinaten beziehen sich auf die Sabin Serotyp 1 - Sequenz (accession number V01150).

Die Bestimmung der Sequenzen von TS1 und TS2 erfolgte nach molekularer Klonierung der PCR-Amplifikate. Dazu wurden die PCR-Produkte in den TOPO-XL-Vektor inseriert und in kompetente Top10 E.coli - Zellen transformiert. Das Screening der Klone erfolgte mittels PCR-Amplifikation mit dem Vektor-Primerpaar (M13 rev / M13 forw) und einem Sabin Serotyp 1 - spezifischen Primer.

Von den Polio-positiv detektierten Klonen wurden für das Teilstück TS1 fünf Klone (Isolat 00-87) bzw. sechs Klone (Isolat 04-372) sequenziert; für das Teilstück TS2 drei (Isolat 00-87) bzw. vier Klone (Isolat 04-372).

Die Ansequenzierung des Inserts erfolgte mit Hilfe der Vektorprimer (M13 rev / M13 forw). Weitere Sequenzierungsprimer wurden durch "genome-walking" bestimmt (Abbildung 5-3). Dabei wird aus der ersten ermittelten Sequenz eine am 3'-Terminus gelegene Basenfolge als Lokalisation für den nächsten Primer ausgewählt. Durch fortschreitende Sequenzbestimmung des Genoms in sense und antisense Richtungen wurden die Totalsequenzen ermittelt.



→ sense, 00-87;
 → sense, 04-372;
 ← antisense, 00-87 + 04-372

Abbildung 5-3: Lokalisation der Sequenz-Fragmente von TS1 und TS2 im Bezug auf die Sabin Serotyp 1 - Sequenz

Insgesamt wurden durch die Sequenzen der Teilstücke TS1, TS2 und TS3 99,13% der Originalsequenzen ermittelt. Nicht erfasst wurden die proximalen 65 Basen.

Die gewonnenen Klonsequenzen wurden in einem Alignment mit der Sabin Typ 1 - Sequenz verglichen (Tabelle 5-3). Als Referenzsequenz für Sabin Serotyp 1 wurde hier wie auch im Folgenden die GenBank-Sequenz V01150 (als „Sabin Typ 1“ bezeichnet) verwendet.

Bei den Klonsequenzen TS1D und –E des Isolates 00-87 wurden Deletionen detektiert, die jeweils ausgedehnte Bereiche der Regionen VP3 (TS1D, Nt. 2074–2214) bzw. VP3-VP1 (TS1E, Nt. 2070-2581) umfassen. Diese Sequenzen wurden bei den folgenden Kalkulationen nicht berücksichtigt.

Die Sequenzen von TS3 wiesen im Alignment mit Sabin Typ 1 eine Deletion an Position 7441 auf.

	TS1	Länge (Nt.)	Besonderheiten	TS2	Länge (Nt.)
00-87-	-TS1-A	2550		-TS2-A	5081
	-TS1-B	2551	Insertion: Pos. 579	-TS2-B	5081
	-TS1-C	2551	Insertion: Pos. 579	-TS2-C	5081
	-TS1-D	2410	Insertion: Pos. 579 Deletion: 2074–2214*		
	-TS1-E	2039	Insertion: Pos. 579 Deletion: 2070-2581*		
04-372-	-TS1-A	2552	Insertion: Pos. 101	-TS2-A	5081
	bis F		Insertion: Pos. 579	bis D	

Tabelle 5-3: Charakteristika der Klonsequenzen im Vergleich mit Sabin Typ 1

5.2.2 Vergleich der Klonsequenzen mit Direktsequenzen

Die Klonsequenzen beider Isolate wurden zusätzlich mit Direktsequenzen in den Regionen 5'NCR und VP1 verglichen.

Innerhalb der Region 5'NCR zeigten sich die Direktsequenzen in hohem Maße identisch mit den Klonsequenzen. Die innerhalb von TS1 bei 04-372 bzw. 00-87 gefundenen Insertionen konnten innerhalb der Sequenzen aus Stuhlproben bestätigt werden.

Die Direktsequenzen innerhalb der Region VP1 aus Stuhlmaterial bzw. Zellkulturüberstand zeigten dagegen ein hohes Maß an Kompressionen. Die Nukleinsäurevariationen unter den Klonsequenzen entsprachen jedoch

weitestgehend den sich überlagernden Chromatogrammen der Direktsequenzen (Abbildung 5-4).

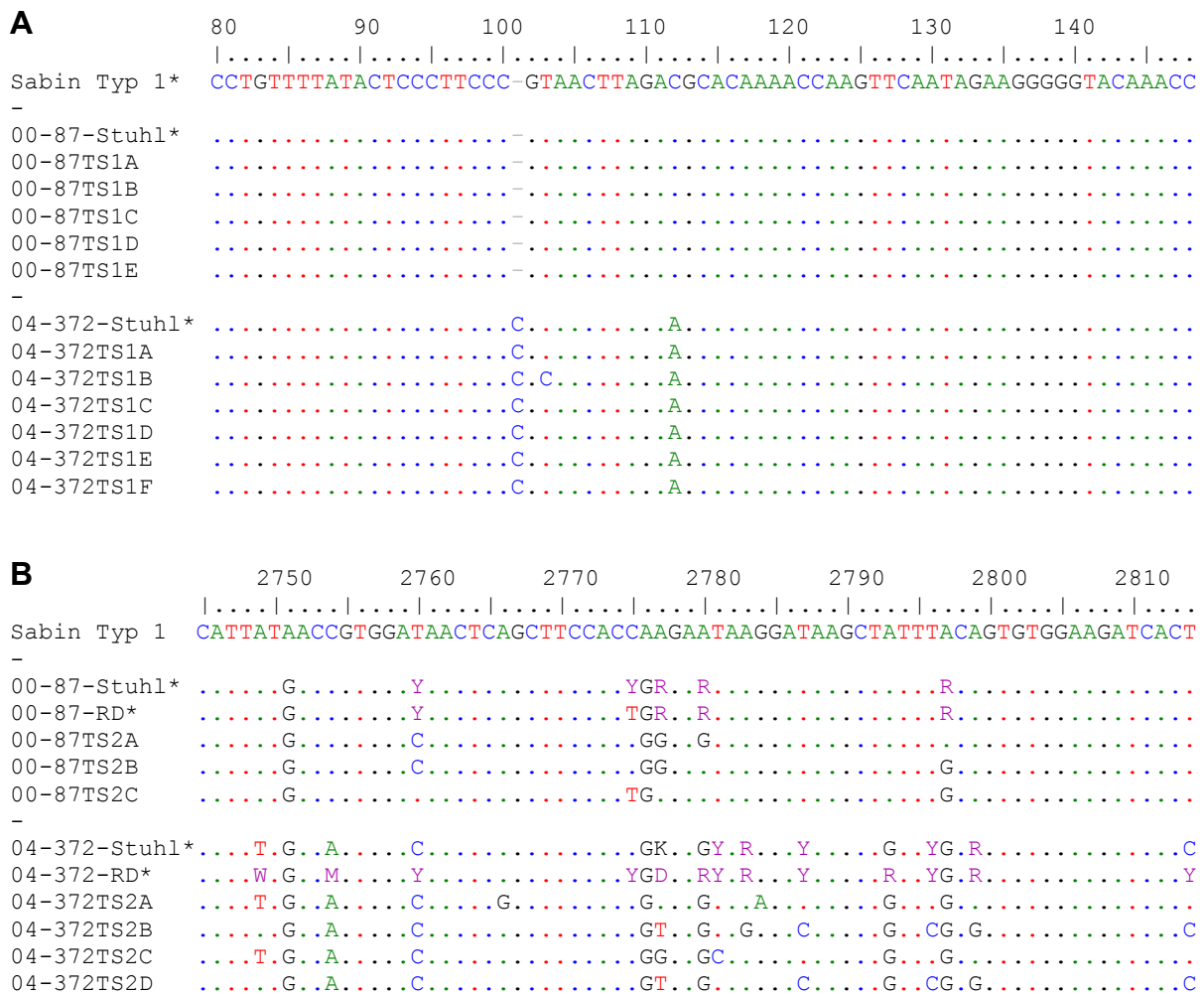


Abbildung 5-4: Alignment aus den Genomregionen 5'NCR (A) und VP1 (B)
 Die mit * gekennzeichneten Sequenzen wurden durch direkte Sequenzierung der PCR-Amplifikate aus der Stuhlprobe („-Stuhl“) bzw. Zellkulturüberstand („-RD“) erstellt. Mehrdeutigkeiten in den Chromatogrammen wurden gemäß der IUPAC-Kodierung bezeichnet.
 Die Koordinaten beziehen sich auf die Sabin Typ - Sequenz.

5.2.3 Molekulare Feincharakterisierung

Der Feincharakterisierung von Poliovirus-Isolaten gemäß den von der WHO empfohlenen Kriterien dient der paarweise Nukleinsäuresequenzvergleich mit der Sabin Typ 1-Sequenz im Genomabschnitt VP1.

Das Isolat 00-87 zeigte auf Nukleinsäure-Ebene eine durchschnittliche genetische Distanz von 3,9% zu der Sabin Typ 1-Sequenz, das Isolat 04-372 von im Durchschnitt 8,8%.

Isolat 00-87			Isolat 04-372		
	NS	AS		NS	AS
TS2A	4,4 %	6,0 %	TS2A	9,2 %	9,6 %
TS2B	3,8 %	7,8 %	TS2B	8,5 %	9,0 %
TS2C	3,5 %	7,8 %	TS2C	8,8 %	10,2 %
			TS2D	8,8 %	10,2 %

Tabelle 5-4: Paarweiser Sequenzvergleich der Klonsequenzen zu Sabin Typ 1 in der Region VP1 (% genetische Distanz);
NS = Nukleinsäure-Ebene, AS = Aminosäure-Ebene

Die ermittelten genetischen Distanzen lassen somit eine Klassifizierung beider Isolate als *iVDPV* zu.

5.2.4 Phylogenetische Einordnung

5.2.4.1 Region VP1-2A

Die phylogenetische Einordnung der Isolate 00-87 und 04-372 erfolgte zunächst im Vergleich mit bekannten Poliovirus Serotyp 1-Sequenzen, die in einem zeitlichen oder geographischen Zusammenhang mit dem hier untersuchten Fall auftraten. Die Einordnung erfolgte dabei an Hand eines 150 bp langen Abschnitts in der Region VP1-2A (Nt. 3296 - 3445). Dieser Abschnitt wurde für phylogenetische Analysen von Poliovirus-Isolaten vorgeschlagen [Rico-Hesse et al., 1987; Mulders et al., 1995]. Als Referenzsequenz für den Wildtyp „Mahoney“ wurde die GenBank-Sequenz V01149 verwendet [Kitamura et al., 1981].

In der phylogenetischen Analyse formierten die Klonsequenzen beider Isolate sequenziell angeordnete Cluster (Abbildung 5-5). Die Sequenzen des Isolates 00-87 wiesen dabei geringere genetischen Distanzen zur Sabin Typ 1-Sequenz (root-Sequenz) auf als die Klonsequenzen des Isolates 04-372.

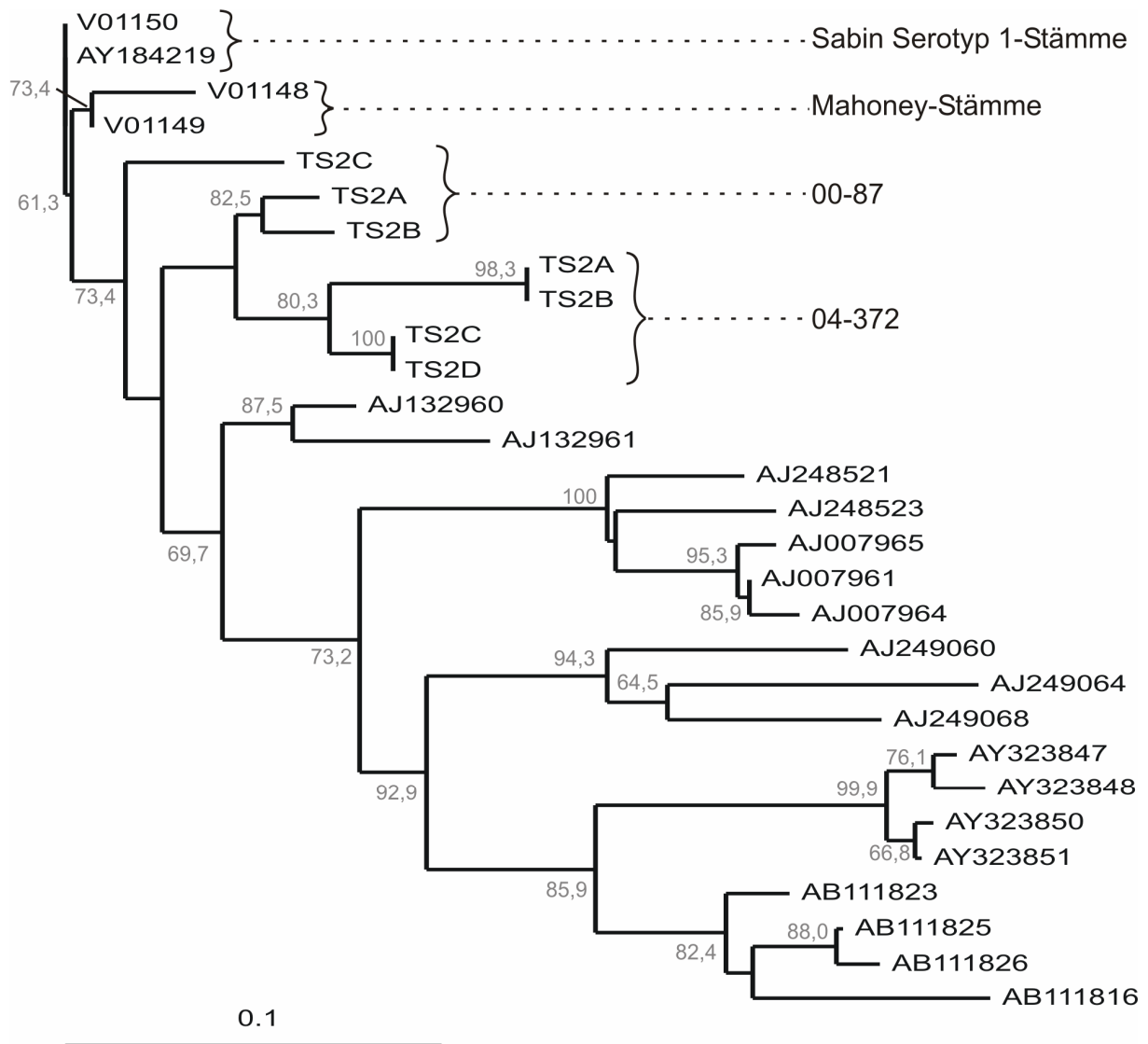


Abbildung 5-5: Phylogenetische Analyse in der Region VP1-2A (Nt. 3296 bis 3445)
Root-Sequenz: V01150; Die Bootstrap-Werte bei 1000 Replikaten sind an den Knotenpunkten in % angegeben (cut-off: 60%); die genetischen Distanzen pro Nukleotid und Position werden durch die horizontalen Linien verdeutlicht. Der angegebene Maßstab von 0,1 markiert eine genetische Distanz von 10%. Die Sequenz-Bezeichnungen entsprechen den GenBank-Codes.

Analog zur sequentiellen Clusterung im Dendrogramm wiesen die Klonsequenzen des Isolates 04-372 eine größere genetische Distanz zu Sabin Typ 1 auf, als die des Isolates 00-87 (Tabelle 5-5). Dabei zeigte das Isolat 00-87 auf Nukleinsäure(NS)-Ebene eine geringere genetische Distanz zur Impfvirus-Sequenz, während das Isolat 04-372 eine geringere Distanz zur Wildvirus-Sequenz aufwies. Auf Aminosäure(AS)-Ebene konnte dagegen keine Unterschiede zwischen den Distanzen zu den Referenzsequenzen ermittelt werden.

TS2	NS		00-87 – TS2			04-372 – TS2				
	AS	S1*	M**	A	B	C	A	B	C	D
	S1*		99,3%	94,0%	93,3%	94,6%	87,3%	87,3%	90,6%	90,6%
	M**	100%		93,3%	92,6%	94,0%	88,0%	88,0%	91,3%	91,3%
00-87 – TS2	A	100%	100%		96,6%	92,6%	90,6%	90,6%	93,3%	93,3%
	B	96,4%	96,4%	96,4%		92,0%	90,0%	90,0%	94,0%	94,0%
	C	92,6%	92,6%	92,6%	88,8%		87,3%	87,3%	90,6%	90,6%
04-372 – TS2	A	96,4%	96,4%	96,4%	92,6%	96,4%		100%	93,3%	93,3%
	B	96,4%	96,4%	96,4%	92,6%	96,4%	100%		93,3%	93,3%
	C	96,4%	96,4%	96,4%	92,6%	96,4%	100%	100%		100%
	D	96,4%	96,4%	96,4%	92,6%	96,4%	100%	100%	100%	

Tabelle 5-5: Paarweiser Sequenzvergleich in der Region VP1-2A (Nt. 3296 - 3445) auf NS- und AS-Ebene (% Identität)

5.2.4.2 TS1 und TS2

Die weitere phylogenetische Beschreibung der Isolate erfolgte anhand der kompletten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der Teilstücke TS1 und TS2 (Abbildung 5-6, Tabelle 5-6 und Tabelle 5-7).

In Analogie zum Stammbaum in der Region VP1-2A zeigten die Klonsequenzen beider Isolate in beiden Teilstücken eine sequentielle Clusterung. Die Anordnung der Klonsequenzen zeigte sich auf NS- und auf AS-Ebene weitgehend konform.

Die Sequenzen beider Isolate wiesen im Teilstück TS1 sowohl auf NS- als auch auf AS-Ebene eine geringere genetische Distanz zur Sabin Typ 1-Sequenz auf, als zur Mahoney-Sequenz. Im Teilstück TS2 zeigte sich ein ähnliches Ergebnis auf NS-Ebene; Auf AS-Ebene wiesen die Klonsequenzen dagegen geringere genetische Distanzen zur Mahoney Wildtyp-Sequenz auf.

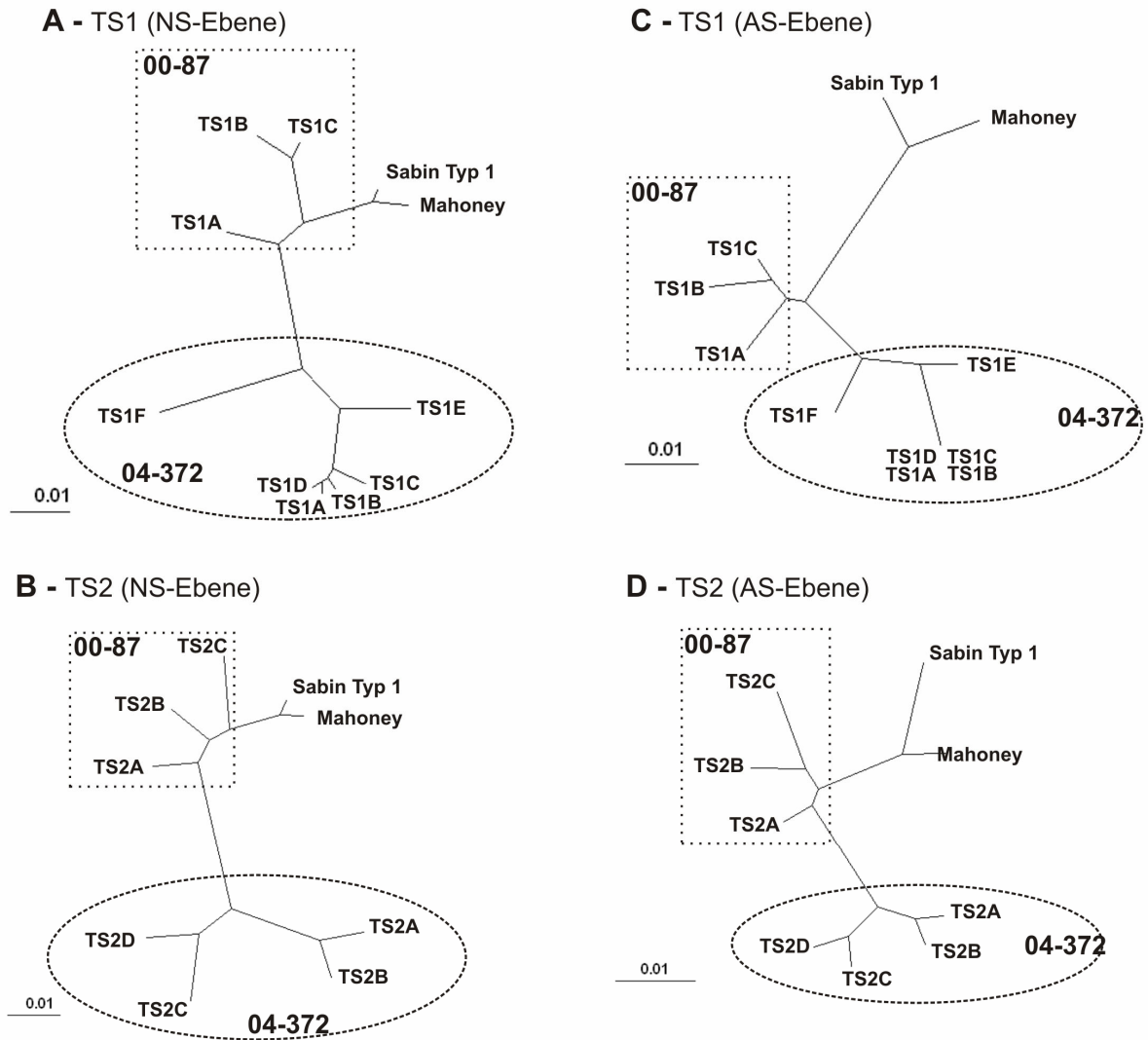


Abbildung 5-6: Phylogenetische Analyse der Teilstücke TS1 und TS2 beider Isolate
 Stammbäume auf NS- (A + B) und AS-Ebene (C + D) der ermittelten
 Sequenzen mit den Sequenzen für Sabin Typ 1 und Mahoney.

TS1	NS AS			00-87-TS1			04-372-TS1					
		S1*	M**	A	B	C	A	B	C	D	E	F
	S1*		99,2	97,1	96,9	97,1	93,8	93,7	93,8	93,6	93,0	93,5
	M**	99,0		96,6	96,3	96,6	93,4	93,5	93,5	93,3	92,7	93,2
00-87-TS1	A	97,2	97,0		96,9	97,2	94,7	94,7	94,7	94,6	94,1	94,5
	B	97,5	97,3	98,6		99,0	93,5	93,4	93,3	93,4	92,7	93,2
	C	97,5	97,3	99,3	99,3		93,9	93,8	93,8	93,7	93,1	93,6
04-372-TS1	A	96,5	96,4	97,5	97,2	97,5		99,4	98,8	99,5	97,2	94,9
	B	96,4	96,2	97,3	97,0	97,3	99,8		99,0	99,4	97,2	94,9
	C	96,5	96,4	97,5	97,2	97,5	100	99,8		98,7	97,0	94,9
	D	96,4	96,2	97,3	97,0	97,3	99,8	99,6	99,8		97,4	94,7
	E	96,5	96,4	97,7	97,5	97,8	99,0	98,8	99,0	98,8		96,3
	F	96,9	96,7	98,2	98,5	98,5	98,3	98,2	98,3	98,2	99,0	

Tabelle 5-6: Paarweiser Sequenzvergleich auf NS- und AS-Ebene von TS1 (% Identität)
 * S1 = Sabin Typ 1-Sequenz, ** M = Mahoney-Sequenz

TS2	NS AS			00-87 – TS2			04-372 – TS2			
		S1*	M**	A	B	C	A	B	C	D
	S1*		99,2	97,0	97,3	97,3	92,6	92,7	93,0	93,3
	M**	98,9		96,9	97,1	97,1	92,6	92,7	93,1	93,3
00-87-TS1	A	98,3	98,5		97,9	96,6	93,6	93,8	94,3	94,6
	B	97,9	98,3	99,1		97,4	93,0	93,2	93,7	94,0
	C	97,9	98,3	98,8	99,0		92,3	92,6	92,9	93,3
04-372-TS1	A	97,0	97,3	98,2	97,8	97,7		98,3	95,6	95,2
	B	97,1	97,4	98,3	97,9	97,7	99,5		95,4	95,6
	C	97,0	97,2	98,3	97,9	97,7	98,9	98,6		97,7
	D	96,8	97,1	98,2	97,8	97,6	98,9	98,9	99,4	

Tabelle 5-7: Paarweiser Sequenzvergleich auf NS- und AS-Ebene von TS2 (% Identität)
 * S1 = Sabin Typ 1-Sequenz, ** M = Mahoney-Sequenz

Beide Isolate zeigten auf NS-Ebene in TS1 und TS2 große genetische Distanzen unter den Klonsequenzen mit einer deutlichen Zunahme beim Isolat 04-372 (Abbildung 5-7): innerhalb des Isolates 00-87 betrug die maximale genetische Distanz 3,4%, beim Isolat 04-372 5,1%. Auf AS-Ebene zeigte sich eine geringere Zunahme (1,4% zu 1,8%). Im Bezug auf die Referenzsequenzen kam es ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme der genetischen Distanzen, die Variationsbreite unter den Klonsequenzen fiel jedoch deutlich kleiner aus (max. 1,2%).

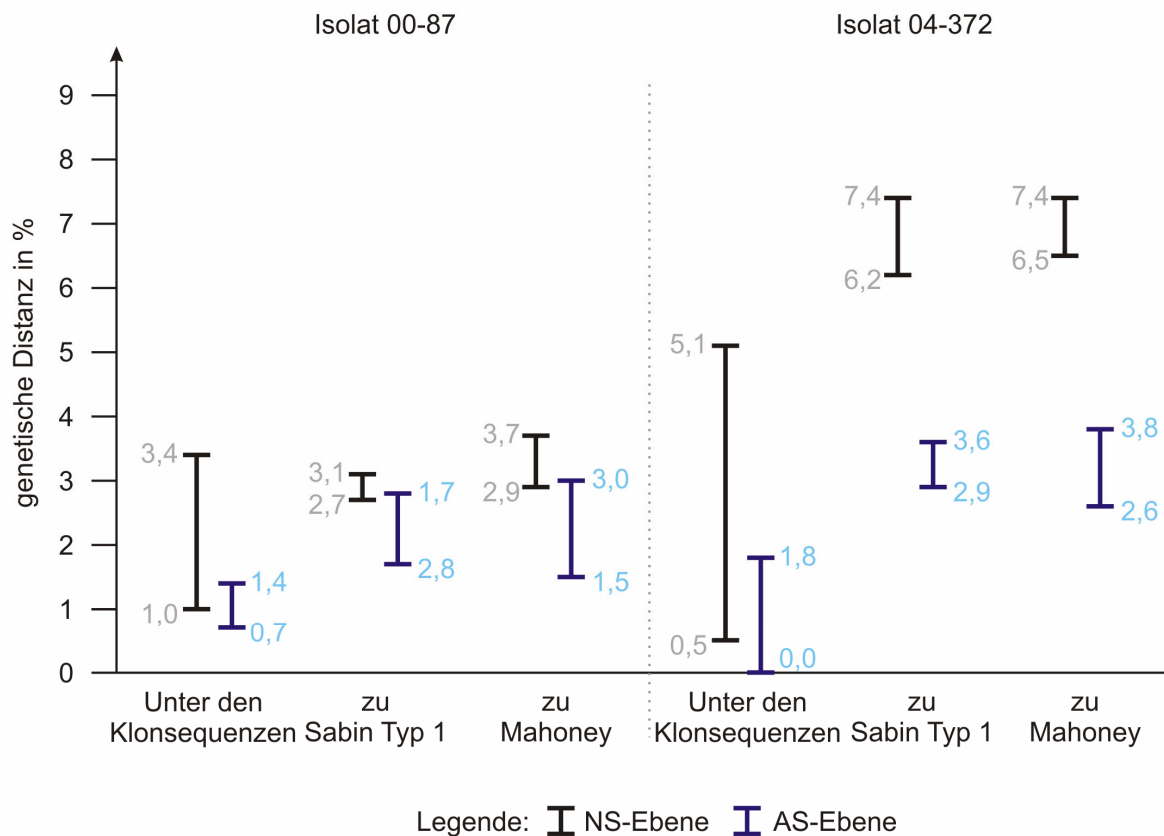


Abbildung 5-7: Spannbreiten der ermittelten genetischen Distanzen auf NS- und AS-Ebene

5.2.5 Mutationen zur Sabin Typ 1-Sequenz

5.2.5.1 Verteilung

Die Analyse hinsichtlich der Verteilung von Mutationen auf NS- und AS-Ebene erfolgte mit Hilfe von Alignments der Klonsequenzen mit der Sabin Typ 1-Sequenz. Da die Region VP1 im Teilstück TS1 nicht vollständig erfasst wurde, erfolgte die Analyse dieser Region aus den Sequenzen von TS2.

Die Analysen der Nukleinsäuresequenzen im Bezug zur Sabin Typ 1-Sequenz ergaben für die Klonsequenzen des Isolates 00-87 eine durchschnittliche Anzahl von 204 Mutationen; beim Isolat 04-372 wurden durchschnittlich 499 Mutationen ermittelt. Beide Isolate differierten untereinander im Durchschnitt an 465 Positionen. Die höchste Frequenz von Nukleotidsubstitutionen bei 00-87 im Vergleich zu Sabin Typ 1 wurde in den Kapsidregionen VP3, VP1 sowie bei 2A festgestellt; bei 04-372 wiesen die Regionen VP1, 2A, 2B die höchste Variabilität auf (Tabelle 5-8, Abbildung 5-8). Hinsichtlich der Aminosäuresequenz wurden bei den Sequenzen des Isolates 00-87

durchschnittlich 43 Mutationen im Vergleich zur Sabin Typ 1-Sequenz, beim Isolat 04-372 durchschnittlich 66 und zwischen beiden Isolaten 57 Mutationen ermittelt. Der größte Anteil von missense-Mutationen im Bezug auf Sabin Typ 1 wurde beim Isolat 00-87 in den Regionen VP1 bis 2B, beim Isolat 04-372 in den Regionen VP3 bis 2B festgestellt. Die Aminosäuresequenzen der Regionen VP4, 3A, 3B, 3C waren hingegen hochgradig konserviert.

Region	Länge in NS	Nukleinsäuren			Länge in AS	Aminosäuren		
		S1* vs. 00-87	S1* vs. 04-372	00-87 vs. 04-372		S1* vs. 00-87	S1* vs. 04-372	00-87 vs. 04-372
5'NCR	677	2,84 (n=19)	4,87 (n=33)	3,99 (n=27)				
VP4	207	1,55 (n=3)	4,91 (n=10)	6,54 (n=14)	69	0 (n=0)	0 (n=0)	0 (n=0)
VP2	816	3,06 (n=25)	6,84 (n=56)	6,78 (n=55)	272	2,28 (n=6)	2,45 (n=7)	3,01 (n=8)
VP3	714	3,41 (n=24)	7,96 (n=57)	6,06 (n=43)	238	1,93 (n=5)	5,18 (n=12)	5,69 (n=14)
VP1	906	3,83 (n=35)	8,75 (n=79)	7,78 (n=70)	302	4,30 (n=13)	5,71 (n=17)	4,08 (n=12)
2A	447	3,65 (n=16)	8,84 (n=40)	8,97 (n=40)	149	4,25 (n=6)	4,53 (n=7)	3,00 (n=4)
2B	291	3,09 (n=9)	8,85 (n=26)	7,12 (n=21)	97	3,09 (n=3)	5,15 (n=5)	2,10 (n=2)
2C	984	2,27 (n=22)	6,91 (n=68)	6,87 (n=68)	328	0,46 (n=2)	1,98 (n=7)	1,90 (n=6)
3A	264	2,15 (n=6)	4,55 (n=12)	5,60 (n=15)	88	0 (n=0)	0 (n=0)	0 (n=0)
3B	66	2,53 (n=2)	4,92 (n=3)	5,48 (n=4)	22	0 (n=0)	1,14 (n=0,25)	1,15 (n=0,25)
3C	549	2,37 (n=13)	6,42 (n=35)	5,81 (n=32)	183	0,55 (n=1)	0,14 (n=0,25)	0,34 (n=1)
3D	1383	2,15 (n=30)	5,73 (n=79)	5,56 (n=77)	461	1,52 (n=7)	2,44 (n=11)	1,82 (n=8)
3'NCR	72	2,7 (n=2)	4,16 (n=3)	1,5 (n=1)				

Tabelle 5-8: Anteil der mutierten Positionen je Genomregion (%)

* Sabin Typ 1-Sequenz; Die Längen der Genomregionen beziehen sich auf die Sabin Typ 1-Sequenz. Die absoluten Zahlen in den Klammern geben die durchschnittliche Anzahl von Mutationen in den Klonsequenzen an.

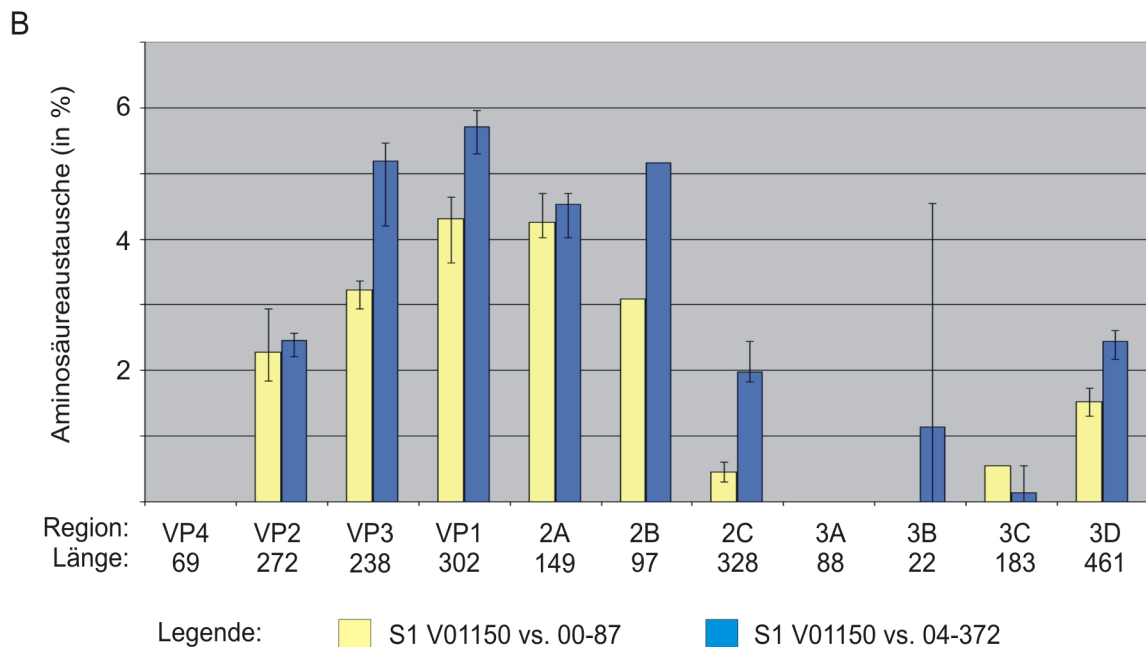
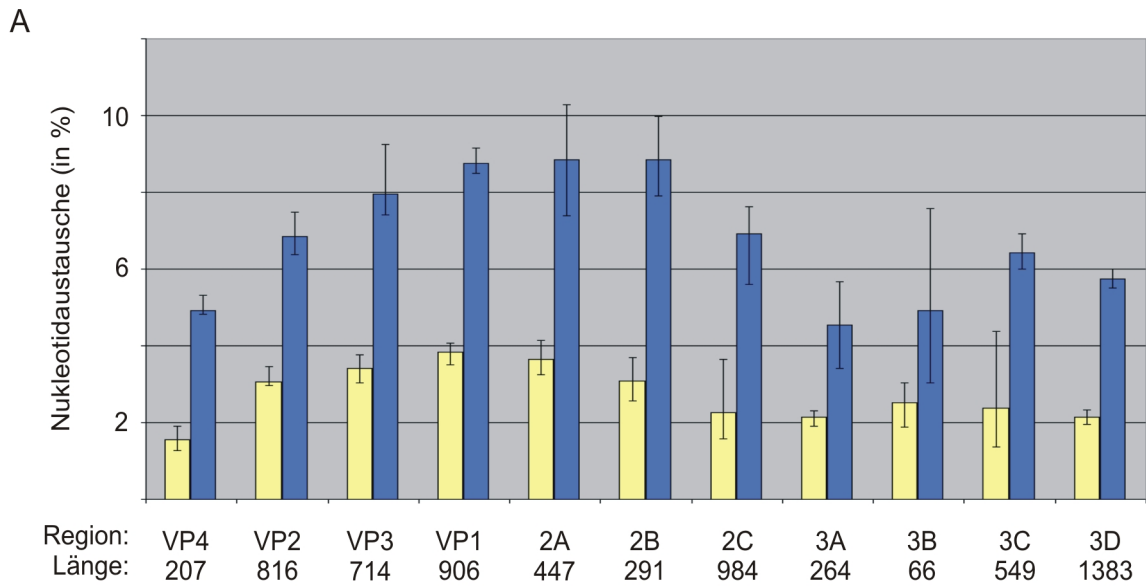


Abbildung 5-8: Verteilung der NS- und AS-Mutationen im Bezug zu Sabin Typ 1 in den Regionen P1 bis P3 (Nt. 743 bis 7369)
Prozentualer Anteile der Nukleotid- bzw. Aminosäuremutationen bezogen auf die Länge der Genomabschnitte. Die farbigen Balken geben die über allen Klonsequenzen gemittelten Werte an; zusätzlich sind die Minima und Maxima angegeben.

5.2.5.2 5'NCR

Die Positionen der ermittelten Mutationen bei 00-87 und 04-372 wurden in dem putativen Sekundärstrukturmodell der 5'NCR eingeordnet (Abbildung 5-9).

Der größte Teil der Variationen (beim Isolat 00-87 ca. 80% der Mutationen innerhalb der 5'NCR, bei 04-372 ca. 73% der Mutationen) wurde in Abschnitten detektiert, die im Bereich der Domains I bis VII einzelsträngig konfiguriert sind, und in einem Abschnitt von 100 Basen zwischen der Domain VII und dem Start-Codon, der keine Sekundärstrukturformationen aufweist.

An Position 574 wurde bei beiden Isolaten eine Insertion (U) festgestellt, eine weitere nur beim Isolat 04-372 (Position 110, C). Beide lagen im einzelsträngigen Bereich zwischen den stem-loop-Strukturen.

Von den Mutationen, die innerhalb von stem-Strukturen detektiert wurden, führten beim Isolat 00-87 6 zu zusätzlichen Basenpaarungen. Bei 04-372 konnten 8 Mutationen mit einem stabilisierenden Effekt auf die stem-Strukturen beobachtet werden. An Position 527 kam es bei 04-372 zu einem Austausch von C gegen U, was zum Auflösen der bei 00-87 und bei Sabin Typ 1 vorhandenen Basenpaarung führte. Zwischen den Nukleotiden 481 und 526 kam es bei beiden Isolaten zur Etablierung einer Basenpaarung, die das Strukturmodell von Sabin Typ 1 nicht aufweist. Diese stellt eine Reversion zur Strukturformation von Mahoney dar. Eine weitere Reversion zum Sekundärstrukturmodell von Mahoney wurde an den Positionen 329 – 356 detektiert.

denen Sabin Typ 1 und Mahoney differieren, wurden Reversionen zur Mahoney-Sequenz registriert.

Region	AS	sek.-str.*	Sabin Typ 1	00-87-					04-372-					
				TS1A	B	C	D	E	TS1A	B	C	D	E	F
VP2	14	beta	L	-	M	-	M	M	-	-	-	-	-	-
	33	einzel	V	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	39	einzel	P	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
	43	einzel	R	-	-	-	-	-	K	K	K	K	K	K
	57	alpha	D	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
	67	beta	D	-	-	-	-	-	E	E	E	E	E	E
	141	einzel	M	T	-	T	T	-	-	-	-	-	-	-
	142	einzel	H	Y	Y	Y	Y	Y	-	-	-	-	-	Y
	153	einzel	K	R	-	R	-	R	R	R	R	R	R	R
	165	einzel	D	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	187	alpha	L	V	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-
	232	beta	L	I	-	-	-	-	I	I	I	I	-	-
	241	einzel	S	N	N	N	N	N	-	-	-	-	N	N
	VP3	56	einzel	D	-	N	N			N	N	N	N	N
60		einzel	K	T	T	T			T	T	T	T	T	T
62		einzel	K	-	-	-			R	R	R	R	-	-
66		einzel	E	D	D	D			D	D	D	D	D	D
71		beta	R	Q	Q	Q			Q	Q	Q	Q	Q	Q
79		einzel	D	-	-	-			-	-	-	-	E	E
86		beta	S	-	-	-			T	T	T	T	-	-
143		einzel	K	-	-	-			R	R	R	R	R	-
158		beta	I	L	L	L			V	V	V	V	V	V
178		einzel	Q	-	-	-			H	H	H	H	H	H
192		beta	V	I	I	I			I	I	I	I	I	I
197		einzel	R	-	-	-			K	K	K	K	K	-
198		einzel	I	V	V	V			V	V	V	V	V	V
225		einzel	M	L	L	L			L	L	L	L	L	L

Tabelle 5-9: AS-Mutationen zwischen Sabin Typ 1 und beiden Isolaten (TS1) in den Regionen VP2 und VP3

* Sekundärstruktur: a=alpha-Helix; b=beta-Faltblatt; e=einzelsträngig;
Reversionen zur Mahoney-Sequenz sind fettgedruckt.

Region	AS	sek.- str.	Sabin Typ 1	00-87-			04-372-			
				TS2A	B	C	TS2A	B	C	D
VP1	8	einzel	S	-	-	-	G	G	-	-
	21	einzel	A	-	-	-	T	T	T	T
	24	einzel	R	-	G	-	-	-	-	-
	26	einzel	A	-	-	-	T	-	T	T
	56	einzel	V	-	-	-	I	I	I	I
	61	einzel	V	-	-	M	-	-	-	-
	67	einzel	V	I	I	I	I	I	I	I
	88	beta	A	T	T	T	T	T	T	T
	90	beta	I	M	M	M	L	L	M	M
	99	einzel	K	G	G	E	E	V	G	V
	100	einzel	N	S	-	-	S	S	S	S
	101	einzel	K	-	-	-	-	R	-	-
	106	beta	T	-	A	A	A	A	A	A
	134	beta	F	-	L	L	-	-	-	-
	138	beta	V	-	-	-	I	-	I	I
	168	einzel	E	K	K	K	Q	Q	Q	Q
	169	alpha	K	E	E	-	-	-	-	-
	196	beta	V	I	I	I	I	I	I	I
	215	einzel	V	I	I	I	I	I	I	I
	221	einzel	S	T	T	T	A	A	T	T
	239	beta	I	-	-	V	-	-	M	M
	266	beta	I	-	-	-	-	-	M	M
	276	einzel	A	-	T	-	-	-	-	-
	278	einzel	A	-	-	S	S	S	S	S
	295	einzel	S	P	P	P	P	P	P	P

Tabelle 5-10: AS-Mutationen zwischen Sabin Typ 1 und beiden Isolaten (TS2) in der Region VP1

* Sekundärstruktur: alpha=alpha-Helix; beta=beta-Faltblatt;
 einzel=einzelsträngig;
 Reversionen zur Mahoney-Sequenz sind fettgedruckt.

An den Positionen VP3-60 (T), VP3-225 (L), VP1-88 (T) zeigten alle Klonsequenzen beider Isolate Reversionen zur Wildtyp-Sequenz. Reversionen an der Position VP1-106 erfolgten bei 2 der Klonsequenzen von 00-87 und bei allen Klonsequenzen von 04-372. Dagegen zeigte an Position VP1-134 lediglich die Sequenz 00-87-TS2A eine

Reversion zum Wildtyp, während alle anderen Sequenzen dieses Isolates, sowie alle Sequenzen des Isolates 04-372 die Sabin Typ 1 spezifische AS tragen.

Die Mutation an Position VP1-196 (V → I) ist in einer hydrophoben Tasche am Boden des Canyons lokalisiert, die ein Sphingosin enthält. Die hier detektierte Mutation führte nicht zu einer Veränderung der Hydrophobizität in der Region.

Beide Isolate zeigten Veränderungen an den Positionen VP1-99, -100, -106 die am Nord-Rand des Canyons und in der Nähe der 5-fach-Achse des Ikosaeders lokalisiert sind (C-Strang, EF-loop). Diese bilden Teile der NAg 1 (NAg = neutralisierende, antigene Determinante). Ebenso sind die Mutationen am Süd-Rand des Canyons (VP1-221, VP3-56,-60,-62,-71, VP2-165) in den antigenen Determinanten 2 und 3 lokalisiert.

NAg	VP2			VP3			VP1			
	3b	2	2	3a	3a	3b	1	2	3a	
Pos.	71	164	269	56	70		95	221	287	
Sabin1	WTK	DDNQTSPARR	PRL	DLSAKKK	VRLSDKPHTD		SASTKKNKDKLFT	SAALGD	KDTILT	
MahoneyN.....T..		P...T.....A	T.....	
00-87-	TS1A	...V.....T..	.Q.....	TS2A	...GS.....	T.....	
	B	...V.....	...	N...T..	.Q.....	B	...G.....A	T.....	
	C	...V.....	...	N...T..	.Q.....	C	...E.....A	T.....	
	D	...V.....	...							
	E	...V.....	...							
04-372-	TS1A	...V.....	...	N...T.R	.Q.....	TS2A	...ES.....A	A.....	
	B	...V.....	...	N...T.R	.Q.....	B	...VSR.....A	A.....	
	C	...V.....	...	N...T.R	.Q.....	C	...GS.....A	T.....	
	D	...V.....	...	N...T.R	.Q.....	D	...VS.....A	T.....	
	E	...V.....	...	N...T..	.Q.....	E				
	F	...V.....	...	N...T..	.Q.....	E				

Abbildung 5-10: Aminosäuresubstitutionen an den putativen neutralisierenden, antigenen Determinanten (NAg 1, 2, 3a, 3b)

5.2.5.4 P2 und P3

Missense-Mutationen wurden ebenfalls in den Nicht-Kapsidregionen P2 und P3 detektiert, wobei sich jedoch die Region 3A komplett konserviert zeigte, die Regionen 3B und 3C lediglich bei einer Klonsequenz eine Aminosäuresubstitution aufwies. Von 10 Positionen mit differenter AS-Besetzung bei Sabin Typ 1 und Mahoney wiesen bei den Klonsequenzen 6 Reversionen zur Mahoney-Sequenz auf (Tabelle 4-11).

Innerhalb der Region 2A wurden an 3 Positionen Mutationen detektiert, die alle Klonsequenzen beider Isolate aufwiesen. Die Mutation an Position 134 stellte eine Reversion zur Mahoney-Sequenz dar. Weitere alterierte Positionen zeigten eine ungleichmäßige Verteilung in den Klonsequenzen. In der Region 2B wurden an 3

Positionen einheitliche Veränderungen bei allen Klonsequenzen detektiert. 2 weitere Positionen zeigten bei allen Klonsequenzen des Isolates 04-372 die gleichen Veränderungen. Die Mutation an 2B-75 konnte dabei innerhalb einer Transmembrandomäne lokalisiert werden [Barco et al., 1998], führte jedoch nicht zu einer Veränderung der Hydrophobizität (A → I). Innerhalb des Proteins 2C zeigten lediglich die Positionen 2C-51 (R → K bei 04-372) und 2C-252 (N → S bei 00-87 und 04-372) eine hohe Homologie unter den Klonsequenzen. Die anderen detektierten Mutationen waren diffus über den Klonsequenzen verteilt und führten zu keiner Veränderung in der Hydrophobizität der Primärstrukturen.

Innerhalb der 3D-Region wiesen fünf Positionen gleiche Veränderungen bei beiden Isolaten auf. An weiteren 4 Positionen zeigten die Klonsequenzen des Isolates 04-372 einheitliche AS-Veränderungen. Die Vergleich der variablen Positionen mit dem Tertiärstrukturmodell von Hansen et al. [Hansen et al., 1997] ergab, dass 4 variable Positionen innerhalb von alpha-Helizes bzw. beta-Faltblätter lokalisiert waren (3D-73, -250, -388, -441). Die übrigen Mutationen wurden in einzelsträngigen Bereichen lokalisiert.

Region	AS	Sabin 1	00-87-			04-372-			
			-TS2A	B	C	-TS2A	B	C	D
2A	4	H	-	-	P	-	-	-	-
	36	N	D	D	D	D	D	D	D
	41	V	-	-	-	I	I	-	-
	45	R	-	K	K	-	-	-	-
	46	A	S	-	-	S	S	S	S
	58	N	-	K	K	-	-	-	-
	59	A	T	-	-	T	T	T	T
	77	G	-	-	-	-	-	D	-
	87	N	D	D	D	D	D	D	D
	116	H	R	Q	Q	R	R	R	R
	134	T	S	S	S	S	S	S	S
2B	30	N	-	-	-	S	S	S	S
	75	A	I	I	I	I	I	I	I
	82	R	K	K	K	K	K	K	K
	88	V	-	-	-	I	I	I	I
	95	T	I	I	I	I	I	I	I

Region	AS	Sabin 1	00-87-			04-372-			
			-TS2A	B	C	-TS2A	B	C	D
2C	7	K	-	-	-	-	-	-	R
	27	K	-	-	-	R	R	-	-
	51	R	-	-	-	K	K	K	K
	103	K	-	-	-	R	R	-	R
	239	A	-	V	-	-	-	S	S
	246	M	-	-	-	V	V	-	-
	252	N	-	S	S	S	S	S	S
	256	R	-	-	-	-	-	K	K
	297	S	-	-	-	-	-	-	T
	303	I	-	-	-	V	V	-	-
	311	I	-	-	-	-	-	V	V
3B	14	P	-	-	-	-	-	S	-
3C	137	M	-	-	-	X	-	-	-
	182	S	-	-	N	-	-	-	-
3D	7	R	-	-	-	K	K	K	K
	8	P	-	-	-	S	S	S	S
	52	T	-	-	-	V	V	V	V
	53	N	D	D	D	D	D	D	D
	73	H	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	143	K	-	-	-	R	R	R	R
	166	T	-	S	-	A	A	A	A
	170	Q	M	M	-	A	V	A	A
	205	I	V	V	V	V	V	V	V
	250	E	K	K	K	K	K	K	K
	362	I	T	T	T	T	T	T	T
	388	I	-	-	-	V	V	V	V
441	I	-	-	-	-	L	-	L	

Tabelle 5-11: AS-Mutationen zwischen Sabin Typ 1 und beiden Isolaten in den Regionen P2 und P3

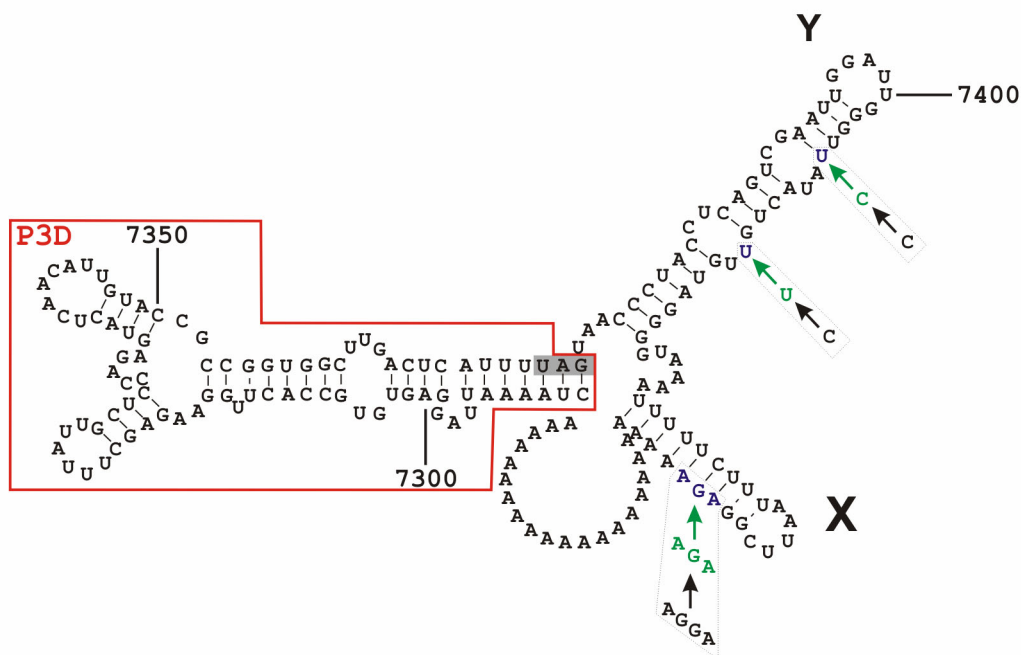
Reversionen zur Mahoney-Sequenz sind fettgedruckt.

5.2.5.5 3'NCR

Die Analyse der Region 3'NCR wurde an Hand der Direktsequenzen von TS3 vorgenommen. Eine Beschreibung von Heterogenitäten innerhalb der Isolate war daher nicht möglich. Die in diesem Abschnitt gewonnenen Sequenzchromatogramme zeigten jedoch an keiner NS-Position Ambiguitäten, so dass für diesen Sequenzabschnitt bei sonst recht heterogener Viruspopulation von einer relativ geringen Sequenzvariabilität im Ausgangsmaterial auszugehen war.

Im Vergleich zu Sabin Typ 1 ergaben sich für die Isolate 00-87 und 04-372 eine Deletion an Nukleotidposition 7443, sowie eine Mutation an Position 7412 (C→T). Beide Mutationen sind direkte Reversionen zur Mahoney-Sequenz. Die Direktsequenz des Isolates 04-372 zeigte eine weitere Mutation an Position 7405 (C→T).

Die Abbildung 5-11 stellt die detektierten Mutationen bezüglich ihrer Lokalisation im Sekundärstrukturprofil der Region 3'NCR des Isolates 04-372 dar.



Legende: NS-Substitutionen bei Sabin Typ 1 00-87 04-372

Abbildung 5-11: Mutationen im kalkulierten Sekundärstrukturprofil der Region 3D/3'NCR des Isolates 04-372 (Nt.7289 – 7464 + 24 Adenin-Reste im 3'poly-A-Trakt) Angegeben sind die Veränderungen zwischen den Sequenzen Sabin Typ 1 (schwarz), 00-87 (grün) und 04-372 (blau). Rot eingrahmt ist der 3D-Abschnitt. Das erste Stop-Codon ist grau hinterlegt. Die bekannten stem-loop-Formationen X und Y sind bezeichnet.

6 Diskussion

Die weltweite OPV-Anwendung hat wesentlich dazu beigetragen, die globalen Poliomyelitis-Fallzahlen innerhalb von wenigen Jahrzehnten auf ein Minimum zu reduzieren. Die Poliomyelitis-Eradikation wird voraussichtlich innerhalb weniger Jahre abgeschlossen sein.

Verlängerte intestinale Replikationen von VDPVs stellen mit ca. 30 detektierten Fällen eine seltene Komplikation der OPV-Anwendung dar. Da diese VDPVs jedoch eine Persistenz von potentiell neuropathogenen Polioviren ermöglichen könnten, erfahren Dauerausscheider von VDPVs eine besondere Aufmerksamkeit im Rahmen der globalen Eradikationsbemühungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden phänotypische und molekulargenetische Untersuchungen an zwei sequentiellen Poliovirus Serotyp 1 - Isolaten vorgenommen, die von einem in Deutschland lebenden, immundefizienten Poliovirus-Dauerausscheider stammten. Ziel der Arbeit war es, Aussagen über die Poliovirusvariabilität zu erhalten. Eine über mehrere Jahre anhaltende intestinale Replikation wurde durch regelmäßige Poliovirusnachweise im Stuhl dokumentiert. Der hier erfasste Zeitraum zwischen den Asservierungen der Isolate 00-87 und 04-372 beträgt ca. 4 Jahre.

Bisher veröffentlichte, detaillierte Untersuchungen an Poliovirus-Isolaten von Dauerausscheidern wurden von Kew et al. (1998), Bellmunt et al. (1999), Martín et al. (2000, 2004, 2006), Buttinelli et al. (2003), Yang et al. (2005) vorgestellt.

Die Untersuchungen ließen sich in zwei Phasen einteilen: (i) die intratypische Differenzierung sowie (ii) die Untersuchung des Genoms nach Erstellung von mehreren Totalsequenzen.

6.1 Intratypische Differenzierung

Die intratypische Differenzierung der Isolate 00-87 und 04-372 erfolgte mit Hilfe von international angewandten Methoden. Gemäß der WHO-Empfehlung zur intratypischen Differenzierung wurden die Untersuchungen sowohl auf phänotypischer als auch auf genotypischer Ebene durchgeführt [WHO, 2004].

Die Untersuchungen auf phänotypischer Ebene wurden zum einen mit dem RIVM-ELISA zum anderen mit dem rct-Marker-Test durchgeführt. Erniedrigte rct-Werte bei Impfvirus-Isolaten gehen darüber hinaus mit einem erhöhten Läsions-Score im

transgenen Maus- bzw. Affen-Neurovirulenztest einher [Kawamura et al., 1989; Christodoulou et al., 1990]. Ein Neurovirulenztest der Poliovirus-Isolate wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Die intratypische Differenzierung auf genomischer Ebene erfolgte auf der Basis der Poliovirus-Diagnostik-PCR, die Sequenzdifferenzen zwischen NSL- und SL-Viren in einem Teil der Genomregion VP1 erfasst.

Sowohl das Isolat 00-87 als auch 04-372 zeigten in den phänotypischen Untersuchungen NSL-Charakteristika. Auf genomischer Ebene konnten dagegen beide Isolate als SL eingeordnet werden.

Es ist bekannt, dass VDPV-Isolate diskordante Ergebnisse in der intratypischen Differenzierung zeigen können. So wurde mehrfach beschrieben, dass Sabin-Impfviren nach kurzer intestinaler Replikation ein NSL-spezifisches Antigenprofil aufweisen [Nakano et al., 1963; Blondel et al., 1986]. Auch Reversionen im rct-Marker wurden mehrfach bei Impfvirus-Isolaten nach intestinaler Replikation nachgewiesen [Sabin, 1958; Christodoulou et al., 1990; Yang et al., 2005]. Dabei können insbesondere solche VDPV-Isolate mit einer erhöhten Neurovirulenz einhergehen [WHO, 2004].

Da beide Isolate in der intratypischen Differenzierung diskordante Ergebnisse zeigten, sollten zur genaueren Charakterisierung weitere Untersuchungen anhand ihrer Genomsequenzen vorgenommen werden.

6.2 Genomanalyse

6.2.1 Erstellung der Totalsequenzen

Auf Grund der bekannten unterschiedlichen Nukleotidsubstitutionsraten in verschiedenen Teilbereichen des Genoms ist eine detaillierte molekulargenetische Analyse beider Isolate nur durch die Erstellung von Totalsequenzen möglich [Bellmunt et al., 1999; Gavrillin et al., 2000; Martin et al., 2004]. Da die zu erwartende Sequenz-Mikroheterogenität innerhalb der Isolate eine eindeutige Auswertung der Sequenzinformationen gefährden würde, wurden PCR-Amplifikationen an zwei großen Teilstücken (TS1 und TS2) des Genoms vorgenommen. Die Amplifikate wurden anschließend über die molekulare Klonierung vereinzelt, um so eine Überlagerung von verschiedenen Sequenzchromatogrammen zu vermeiden. Die

hohe Konservierung im 3'-terminalen Sequenzabschnitt erlaubte hier die direkte Sequenzierung (TS3).

Durch die molekulare Klonierung wurde zudem die Untersuchung der genetischen Diversität innerhalb der Isolate möglich. Zu diesem Zweck wurden je nach Amplifikat 3 bis 6 Klone komplett sequenziert und analysiert. Dieser Ansatz stellt ein Novum in der Untersuchung von Poliovirus-Isolaten von Dauerausscheidern dar.

Die hier angewandten Methoden, wie Anzucht, RT-PCR, Klonierung und Sequenzierung, sind in der Untersuchung von Virusisolaten üblich. Eine zufällige Selektion einzelner Quasispezies-Varianten durch diese Methoden kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden. Der Vergleich mit aus dem Stuhl und Zellkulturüberstand ermittelten Direktsequenzen verifizierte jedoch die erhaltenen Klonsequenzen in Bezug auf die Konsensussequenz.

6.2.2 Molekulare Feincharakterisierung und phylogenetische Analyse

Die molekulare Feincharakterisierung erfolgte anhand des paarweisen Sequenzvergleichs mit der Sabin Typ 1-Sequenz in der Genomregion VP1 [WHO, 2004]. Die ermittelten genetischen Distanzen zur Sabin Typ 1-Sequenz von durchschnittlich 3,9% bei dem Isolat 00-87 und 8,8% bei 04-372 ließen eine Klassifikation beider Isolate als iVDPV zu (genetische Distanz 1 - 15% laut WHO-Definition, Auftreten bei immundefizienten Patienten).

Diese Einordnung wurde durch Ergebnisse der phylogenetischen Analysen in der Region VP1-2A unterstützt. In dieser Region werden Genotypisierungen von Poliovirus-Isolaten üblicherweise durchgeführt [Rico-Hesse et al., 1987; Mulders et al., 1995]. Hier zeigten beide Isolate deutlich geringere genetische Distanzen zur Sabin Typ 1-Sequenz als zu anderen Poliovirus-Sequenzen. Eine leichtgradig geringere genetische Distanz des Isolates 04-372 zur Mahoney-Sequenz wies dabei auf Reversionen zu der Vorläufer-Sequenz von Sabin Typ 1 hin. Ein ähnliches Ergebnis ergab sich bei der Analyse über der gesamten Amplifikatsequenz von TS2 auf AS-Ebene: beide Isolate zeigten hier leichtgradig geringere genetische Distanzen zur Mahoney-Sequenz als zur Sabin Typ 1-Sequenz. Dies korrelierte mit den bei TS2 ermittelten AS-Mutationen, die an 12 Positionen die Mahoney-Sequenz wiederherstellten.

6.2.3 Genetische Heterogenität

Der paarweise Sequenzvergleich der Klonsequenzen untereinander auf NS- und AS-Ebene ergab eine deutlich höhere Rate an synonymen Mutationen als nicht-synonyme Mutationen. Die großen genetischen Distanzen innerhalb der Isolate (bei 00-87 3,4% bzw. 5,1% bei 04-372) lassen dabei auf eine hohe genetische Heterogenität innerhalb der Viruspopulation schließen [Domingo et al., 1997].

Interessanterweise zeigten die Klonsequenzen der Isolate mit zunehmender Distanz zur Sabin Typ 1-Sequenz eine zunehmende genetische Diversität untereinander. Inwieweit diese Zunahme der Klonsequenzheterogenität den realen Verhältnissen in den Viruspopulationen entspricht, läßt sich wegen der geringen Anzahl an untersuchten Klonsequenzen nicht sagen. Es ist allerdings bekannt, dass der Evolutionsprozess des Poliovirus weniger durch positive bzw. negative Selektion aufrechterhalten wird, als vielmehr durch Founder-Effekte und Bottleneck-Phänomene [Crainic et al., 1993; Gavrillin et al., 2000]. Im Rahmen von fäkal-oralen Transmissionen bzw. bei der Applikation von OPV führen diese Effekte zu einer Verringerung des Genpools in der Viruspopulation. Resultierend steigt insbesondere bei langer Replikationszeit der Einfluss von genetischer Drift auf die Heterogenität der wachsenden Viruspopulation. Dies kann zu einer Akkumulation von v.a. (fast) neutralen und evtl. auch schädlichen Mutationen führen, wie es bei dem Vesicular-Stomatitis Virus und dem Foot-and-Mouth-Disease Virus gezeigt werden konnte [Clarke et al., 1993; Escarmis et al., 1999]. Eine zunehmende genetische Divergenz innerhalb der Polioviruspopulation wäre somit die Folge.

Eine hohe genetische Heterogenität scheint ein Charakteristikum von VDPV-Isolaten von Poliovirus-Dauerausscheidern zu sein. So konnte schon in früheren Studien gezeigt werden, dass Poliovirus-Isolate von immundefizienten Dauerausscheidern eine Mixtur aus genetischen Varianten enthalten [Hara et al., 1981; Kew et al., 1998; Martin et al., 2000; Yang et al., 2005]. Im Gegensatz dazu weisen Wildtyp-Poliovirus-Isolate von nicht-immundefizienten Ausscheidern eine deutlich geringere genetische Diversität auf [Fiore et al., 1998; Liu et al., 2000]. Dies ist wahrscheinlich durch die kürzere Replikationszeit sowie durch die wiederholten Transmissionen von kleinen Virusmengen bedingt. Auch cVDPV-Isolate, die im Rahmen von Ausbrüchen asserviert wurden, wiesen eine nur geringe genetische Diversität auf [Kew et al., 2002; Rousset et al., 2003; Yang et al., 2003; Shimizu et al., 2004].

6.2.4 Mutationen zur Sabin Typ 1 - Sequenz

6.2.4.1 Verteilung

Der Vergleich der Klonsequenzen mit der Sabin Typ 1-Sequenz ergab eine ungleichmäßige Verteilung der Mutationsereignisse. Foki mit deutlich vermehrten Substitutionen waren die Bereiche von VP3 bis 2B. Dagegen wiesen die Bereiche VP4 und 3A bis 3C nur wenige Substitutionen auf bzw. waren auf AS-Ebene z.T. vollständig konserviert.

Die Ursache der unterschiedlichen Variabilität ist bislang nicht bekannt [Gavrilin et al., 2000]. Auf AS-Ebene werden verminderte Substitutionsraten im Allgemeinen durch die funktionellen und strukturellen Konformationen der Proteine ausreichend erklärt. Die hier gezeigte, auffällige Kongruenz zwischen NS- und AS-Substitutionsraten insbesondere im Bereich VP4 bis 3A deuten jedoch darauf hin, dass die Variabilität auch durch Faktoren auf NS-Ebene eingeschränkt wird.

Insbesondere essentielle NS-Sekundärstrukturformationen führen zu niedrigen NS-Substitutionsraten. So zeigten sowohl die 5'NCR als auch die 3'NCR bei den hier untersuchten Klonsequenzen deutlich erniedrigte Substitutionsraten in den gepaarten Sequenzabschnitten. Eine geringe Variabilität in der Region 2C war zudem durch das in diesem Abschnitt gelegene cre-Signal bedingt [Paul et al., 2003]: diese RNA-Sekundärstrukturformation, die bei der RNA-Synthese von Bedeutung ist, zeigte bei den Klonsequenzen keine variablen Positionen. Auch einzelsträngige RNA-Abschnitte, die Funktionen im Rahmen der Virusreplikation aufweisen, zeigten ebenfalls eine geringe Variabilität. So waren die Positionen 335-337, die die Interaktion mit dem PCBP vermitteln, sowie das GNRA-Signal in der Domain V (Positionen 344-347), welches RNA-RNA- und RNA-Protein-Interaktionen beeinflusst, konserviert [Gamarnik et al., 2000; Ehrenfeld et al., 2002]. Die Ausdehnung dieser Bereiche reicht jedoch nicht aus, um die niedrigen NS-Substitutionsraten in den Regionen VP4 und 3A zu erklären.

Auffällig war die hochgradige Konservierung der Region VP4 auf AS-Ebene bei allen Klonsequenzen. Ein ähnliches Ergebnis von anderen Isolaten ist nicht bekannt. Im Gegenteil, Bellmut et al. wiesen bei den Isolaten IS1 und IS2 die höchste Akkumulationsrate von AS-Substitutionen in der Region VP4 nach [Bellmunt et al., 1999]. Des Weiteren wurden in der gleichen Studie niedrigere Substitutionsraten in der Region 2B detektiert, während in der vorliegenden Arbeit eine hohe Anzahl an variablen Positionen in dieser Genomregion ermittelt wurde. Unterschiedlich lange

Replikationszeiten kommen daher als Ursache nicht in Betracht. Der von Bellmunt et al. erfasste Zeitraum prolongierter Replikation war um 1,5 Jahre länger, als in dieser Arbeit. Weitere differente Ergebnisse zu anderen Isolaten von Dauerausscheidern wurden in den Regionen VP1 und 3D ermittelt [Gavrilin et al., 2000].

Die unterschiedlichen Substitutionsraten bei verschiedenen Poliovirus-Isolaten und in verschiedenen Teilbereichen des Genoms könnte auf eine zufällige Akkumulation von weitgehend neutralen Mutationen hinweisen. Eine Klärung dieses Phänomens bleibt aber weiteren Untersuchungen vorbehalten.

6.2.4.2 Mutationen in den putativen attenuierenden Determinanten

Das Sabin-Genom differiert an 57 NS- und an 21 AS-Positionen von der Mahoney-Sequenz [Nomoto et al., 1982]. In verschiedenen Studien konnten putative attenuierende Determinanten in verschiedenen Bereichen des Genoms lokalisiert werden [Agol et al., 1984; Agol et al., 1985; Kohara et al., 1985; Omata et al., 1986; Kawamura et al., 1989; Christodoulou et al., 1990; McGoldrick et al., 1995]. Die Isolierung von Viren, die experimentell als neurovirulent eingestuft wurden, aus dem Stuhl gesunder Personen zeigt jedoch, dass neben den viralen Faktoren auch Wirtsfaktoren die klinische Präsentation einer Poliovirusinfektion bestimmen [Contreras et al., 1992]. Des Weiteren ist anzumerken, dass die im Stuhl asservierten Virusisolate nicht mit den im Gehirn oder Liquor auftretenden Viren identisch sein müssen [Georgescu et al., 1994].

Ein entscheidender Marker im Hinblick auf die Attenuierung des Sabin-Impfvirus ist in der Domain V lokalisiert. Die Mahoney-Sequenz weist hier zwischen den Basen 480(A) und 525(U) eine Paarung auf, die bei der Sabin Typ 1 - Sequenz (G / U) nicht vorliegt. Reversionen an diesen Positionen mit Etablierung einer Basenpaarung gehen regelmäßig mit einer Steigerung der Neurovirulenz des Virus einher [Kawamura et al., 1989; Christodoulou et al., 1990]. Dabei können Impfvirus-Varianten, die eine bestehende Basenpaarung zwischen den Positionen 480 und 525 aufweisen, schon wenige Tage nach OPV-Exposition im Stuhl nachgewiesen werden [Minor et al., 1988]. Es wird dabei angenommen, dass diese Mutation die Translationseffizienz der Viren steigert und somit schon früh während der intestinalen Replikation positiv selektioniert wird [Christodoulou et al., 1990; Georgescu et al., 1994]. Diese Annahme konnte durch die hier ermittelten Ergebnisse bestätigt werden, da alle Klonsequenzen beider Isolate an Position 526 eine Mutation

aufwiesen (U → C, Position in der Sequenz von 04-372), die die Mahoney-typische Basenpaarung reetabliert.

Eine weitere putative attenuierende Determinante ist die AS-Position 3D-73, die hier bei beiden Isolaten die Mahoney-typische Besetzung aufwies [Omata et al., 1986; Toyoda et al., 1987; Christodoulou et al., 1990]. Auch eine Assoziation mit dem temperatursensitiven Phänotyp des Impfvirus ist beschrieben worden [Georgescu et al., 1995]. Die Position liegt in der Nähe der Interface-Region der 3D-Polymerase, über die die Oligomerisierung des Enzyms während der Replikation erfolgt [Hansen et al., 1997]. Es wird angenommen, dass die Mutation an Position 3D-73 die Enzym-Enzym-Bindung schwächt und somit zu der Attenuierung des Sabin-Impfvirus führt [Paul et al., 2000]. Da eine Reversion zu einer gesteigerten Replikationseffizienz führen würde, ist anzunehmen, dass auch diese Reversion während der intestinalen Replikation positiv selektioniert wird. Auch Reversionen an dieser Position werden häufig bei VDPV-Isolaten detektiert, die eine erhöhte Neurovirulenz aufweisen. [Tardy-Panit et al., 1993; Bouchard et al., 1995; McGoldrick et al., 1995; Paul et al., 2000].

Des Weiteren wiesen beide Isolate eine Deletion an Position 7441 auf, die die Mahoney-Sequenz wiederherstellte (die Sabin Typ 1-Sequenz besitzt hier ein weiteres G vor dem poly-A-Rest). Auch bei dieser Position konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine Reversion zur Mahoney-Sequenz mit einer erhöhten Neurovirulenz und mit einer reduzierten Temperatursensitivität von Impfviren einhergeht [Sarnow, 1989; Christodoulou et al., 1990; Georgescu et al., 1995; Georgescu et al., 1997]. Da die Sekundärstrukturformation der 3'NCR bei der Initiation der Negativstrangsynthese von Bedeutung ist, wurde angenommen, dass die Mahoney-spezifische Besetzung mit einer Steigerung der Replikationseffizienz einhergeht. Eine frühe positive Selektion dieser Mutation wäre somit wahrscheinlich. Diese These wird durch die hier ermittelten Ergebnisse unterstützt, da alle Klonsequenzen beider Isoalte diese Reversion aufwiesen. Auch bei anderen iVDPV-Isolaten und VAPP-Isolaten wurde diese Reversion regelmäßig detektiert [Cammack et al., 1988; Bellmunt et al., 1999; Yang et al., 2005].

Weitere Positionen, die mit einer Beeinflussung der Neurovirulenz oder dem temperatursensitiven Phänotyp assoziiert sind, sind die NS-Positionen: VP4-935, VP3-2438, VP1-2741, 2795, die alle zu AS-Veränderungen führen [Christodoulou et al., 1990; Bouchard et al., 1995]. Die hier untersuchten Klonsequenzen wiesen nur

an den Positionen VP3-2438 (AS VP3-225) und VP1-2741 (AS VP-88) die Mahoney-typische Besetzung einheitlich auf. Dagegen zeigten die Positionen VP1-2795 und VP4-935 ein uneinheitliches Besetzungsmuster bei den Klonsequenzen bzw. waren vollständig konserviert. Dabei steht die Konservierung der Position VP4-935 im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bouchard et al., der diese Position als entscheidend bei der Ausbildung des temperatursensitiven Phänotyps sah. Jedoch ist zu bemerken, dass das phänotypische Profil des Virus nicht nur durch einzelne AS-Positionen determiniert ist, sondern auch durch die Kombination von verschiedenen Positionen beeinflusst wird.

6.2.4.3 Alterationen an den neutralisierenden antigenen Determinanten

Innerhalb der Region P1 konnte eine Clusterung von AS-Substitutionen an den neutralisierenden antigenen Determinanten (NAgs) detektiert werden. Alterationen an diesen Stellen sind bei VDPV-Isolaten schon mehrfach beschrieben worden. Die Betonung der NAg 1, insbesondere die hohe Variabilität an Position VP1-99 deckte sich dabei mit den Befunden von anderen iVDPV-Isolaten [Bellmunt et al., 1999; Yang et al., 2005]. Da bei der hier beschriebenen Patientin eine effektive AK-Produktion nicht möglich ist, erscheint ein Immundruck auf diese Positionen als Ursache wenig wahrscheinlich. Zwei bekannte T-Zell-Epitope umfassen die NAgs nicht und erwiesen sich hier als konserviert bzw. wiesen nur konservative Mutationen auf [Pallansch et al., 1996]. Allerdings ist anzumerken, dass der Einfluss der T-Zell-Immunität bei der Poliomyelitis noch nicht detailliert genug untersucht worden ist [Racaniello, 2007].

Die Aminosäuren der NAgs II, IIIa und IIIb sind zudem mit der Rezeptor-Interaktion assoziiert [He et al., 2003]. Somit könnten die in diesen Bereichen detektierten Alterationen durch positive Selektion als Anpassung an die zellulären Gegebenheiten im Wirt entstanden sein. In Konkordanz dazu wurden an oder in der Nähe von weiteren Positionen, die mit dem Poliovirusrezeptor interagieren, ebenfalls AS-Alterationen detektiert (VP1-168, 169, 215).

6.2.4.4 Weitere Alterationen

Interessanterweise wurden innerhalb der 5'NCR zwei Insertionen registriert, die im einzelsträngigen Bereich lokalisiert werden konnten. Es liegt nur eine Studie vor, in der von einer Insertion innerhalb der 5'NCR berichtet worden ist [Bellmunt et al.,

1999]. Auch diese wurde in einem einzelsträngigen Bereich innerhalb der Domain II (Position 115) lokalisiert. Ein direkter Einfluss auf die Konformation der Sekundärstruktur ist daher nicht anzunehmen. Auffällig ist allerdings, dass die hier nachgewiesenen Insertionen bei allen Klonsequenzen der Isolate auftraten. Ein positive Selektion scheint daher möglich. Ein Grund dafür könnte in vergrößerten Freiheitsgraden zwischen den Domains liegen, die zu einer effektiveren Interaktion mit Zell- und Virusproteinen führen könnte.

Bei den hier untersuchten Isolaten war ein Fokus vermehrter AS-Mutationen die Kapsidregionen VP1, 2 und 3, in denen insgesamt 51 variable Positionen detektiert wurden. Der größte Teil dieser Positionen konnte im Tertiärstruktur-Modell von Hogle et al. in einzelsträngigen Bereichen der Kapsidproteine lokalisiert werden (72% aller variablen Positionen). 74% dieser Positionen waren konservativ mutiert. Auch von den variablen Positionen, die innerhalb von beta-Faltblättern oder alpha-Helices detektiert wurden, waren 88% konservativ mutiert.

Innerhalb der Genombereiche P2 und P3 wies der größte Teil der variablen Positionen konservative Mutationen auf (78%). Alle bekannten funktionellen Motifs der P2-Proteine waren zudem konserviert: die katalytische Triade der 2A-Protease, die Transmembrandomänen von 2B, NTP-Bindungsstellen von 2C [Teterina et al., 1997; Barco et al., 1998; Seipelt et al., 1999]. Auch funktionell entscheidende Positionen der 3D-Polymerase wie 3D-12 bis -25 (=active cleft), 3D-228 bis 235 und 3D-328 bis 329 (binden katalytisch essentielles Metallion) und 3D-237 bis 240 (diskriminiert zwischen dNTPs und NTPs) zeigten keine AS-Veränderungen [Hansen et al., 1997].

Die Charakteristika und die Verteilung der meisten, hier detektierten Mutationen lassen in Zusammenschau die Einschätzung zu, dass ihr Einfluss auf den Virusphänotyp gering ist. Dies unterstützt die oben genannte Vermutung, dass die Variabilität des Poliovirusgenoms vornehmlich durch neutrale Mutationen bestimmt wird. Wesentliche Ausnahmen stellen dabei die bei allen Klonsequenzen vorgefundenen Mutationen insbesondere an den putativen attenuierenden Positionen sowie an den NAGs dar, die auf eine positive Selektion derselben schliessen lassen. In wieweit die hier dargestellten Mutationen der Verteilung innerhalb der gesamten Viruspopulation entspricht, lässt sich jedoch wegen der geringen Anzahl an untersuchten Klonsequenzen nicht sagen und muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, R., Chonmaitree, T., McCombs, J., et al. (1993). Rapid detection of poliovirus by reverse transcription and polymerase chain amplification: application for differentiation between poliovirus and nonpoliovirus enteroviruses. *J Clin Microbiol.* volume 31(2): pages 395-399.
- Agol, V.I. (2002). Picornavirus genome: an overview. In: Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses.* volume 1: pages 127-148.
- Agol, V.I., Drozdov, S.G., Grachev, V.P., et al. (1985). Recombinants between attenuated and virulent strains of poliovirus type 1: derivation and characterization of recombinants with centrally located crossover points. *Virology.* volume 143(2): pages 467-477.
- Agol, V.I., Grachev, V.P., Drozdov, S.G., et al. (1984). Construction and properties of intertypic poliovirus recombinants: first approximation mapping of the major determinants of neurovirulence. *Virology.* volume 136(1): pages 41-55.
- Alexander, J.P., Jr., Gary, H.E., Jr. und Pallansch, M.A. (1997). Duration of poliovirus excretion and its implications for acute flaccid paralysis surveillance: a review of the literature. *J Infect Dis.* volume 175 Suppl 1: pages S176-182.
- Andino, R., Rieckhof, G.E. und Baltimore, D. (1990). A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell.* volume 63(2): pages 369-380.
- Avalos Redon, I., Mas Lago, P.J., Sarmiento Perez, L.R., et al. (1998). [The intratypic characterization of the poliovirus by the polymerase chain reaction technic]. *Rev Cubana Med Trop.* volume 50(2): pages 100-104.
- Barco, A. und Carrasco, L. (1998). Identification of regions of poliovirus 2BC protein that are involved in cytotoxicity. *J Virol.* volume 72(5): pages 3560-3570.
- Baumeister, H.G. (1996). Poliomyelitisviren. In *Diagnostische Bibliothek: Bd.1 Virusdiagnostik.* Porstmann, T. (Ed.). Wien. volume 1: pages 407-424. Blackwell Wissenschaftsverlag Berlin. 1st edition.
- Bellmunt, A., May, G., Zell, R., et al. (1999). Evolution of poliovirus type I during 5.5 years of prolonged enteral replication in an immunodeficient patient. *Virology.* volume 265(2): pages 178-184.
- Belnap, D.M., McDermott, B.M., Jr., Filman, D.J., et al. (2000). Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* volume 97(1): pages 73-78.
- Bienz, K., Egger, D., Troxler, M., et al. (1990). Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol.* volume 64(3): pages 1156-1163.

- Blondel, B., Crainic, R., Fichot, O., et al. (1986). Mutations conferring resistance to neutralization with monoclonal antibodies in type 1 poliovirus can be located outside or inside the antibody-binding site. *J Virol.* volume 57(1): pages 81-90.
- Bodian, D. (1949). Neutralization of three immunological types of poliomyelitis virus by human gamma globulin. *Proc Soc Exp Biol Med.* volume 72(1): pages 259-261.
- Bouchard, M.J., Lam, D.H.und Racaniello, V.R. (1995). Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin vaccine. *J Virol.* volume 69(8): pages 4972-4978.
- Brown, D.M., Cornell, C.T., Tran, G.P., et al. (2005). An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol.* volume 79(18): pages 11962-11973.
- Buttinelli, G., Donati, V., Fiore, S., et al. (2003). Nucleotide variation in Sabin type 2 poliovirus from an immunodeficient patient with poliomyelitis. *J Gen Virol.* volume 84(Pt 5): pages 1215-1221.
- Cammack, N., Phillips, A., Dunn, G., et al. (1988). Intertypic genomic rearrangements of poliovirus strains in vaccinees. *Virology.* volume 167(2): pages 507-514.
- Castigli, E.und Geha, R.S. (2006). Molecular basis of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* volume 117(4): pages 740-746; quiz 747.
- CDC (2006). Resurgence of wild poliovirus type 1 transmission and consequences of importation--21 countries, 2002-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* volume 55(6): pages 145-150.
- Cherkasova, E.A., Korotkova, E.A., Yakovenko, M.L., et al. (2002). Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J Virol.* volume 76(13): pages 6791-6799.
- Cho, M.W., Teterina, N., Egger, D., et al. (1994). Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology.* volume 202(1): pages 129-145.
- Christodoulou, C., Colbere-Garapin, F., Macadam, A., et al. (1990). Mapping of mutations associated with neurovirulence in monkeys infected with Sabin 1 poliovirus revertants selected at high temperature. *J Virol.* volume 64(10): pages 4922-4929.
- Clark, M.E., Hammerle, T., Wimmer, E., et al. (1991). Poliovirus proteinase 3C converts an active form of transcription factor IIIc to an inactive form: a mechanism for inhibition of host cell polymerase III transcription by poliovirus. *Embo J.* volume 10(10): pages 2941-2947.
- Clarke, D.K., Duarte, E.A., Moya, A., et al. (1993). Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *J Virol.* volume 67(1): pages 222-228.
- Cohen, J.I. (2001). Enteroviruses and Reoviruses. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Braunwald, E., Fauci, A., Kasper, D.L., Hauser, S., Longo, D.L.und

- Jameson, J.L. (Ed.). New York. volume 1: pages 1138-1143. McGraw-Hill. 15th edition.
- Cono, J. und Alexander, L.N. (2002). X Poliomyelitis. In *Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases*. Wharton, M., Hughes, H., Reily, M. (Ed.). Atlanta, USA. volume 10: pages 10-11 - 10-12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 3rd edition.
- Contreras, G., Dimock, K., Furesz, J., et al. (1992). Genetic characterization of Sabin types 1 and 3 poliovaccine virus following serial passage in the human intestinal tract. *Biologicals*. volume 20(1): pages 15-26.
- Cooper, M.D. und Schroeder, H.W. (2001). Primary Immune Deficiency Diseases. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Braunwald, E., Fauci, A., Kasper, D.L., Hauser, S., Longo, D.L. und Jameson, J.L. (Ed.). New York. volume 2: pages 1843-1851. McGraw-Hill. 15th edition.
- Crainic, R. und Kew, O. (1993). Evolution and polymorphism of poliovirus genomes. *Biologicals*. volume 21(4): pages 379-384.
- De, L., Nottay, B., Yang, C.F., et al. (1995). Identification of vaccine-related polioviruses by hybridization with specific RNA probes. *J Clin Microbiol*. volume 33(3): pages 562-571.
- Domingo, E. (2007). Virus Evolution. In *Fields Virology*. Knipe, D.M. und Howley, P.M. volume 1: pages 390-421. Lippincott Williams & Wilkins. 5th edition.
- Domingo, E. und Holland, J.J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. volume 51: pages 151-178.
- Domok, I., Molnar, E. und Jancso, A. (1961). Virus excretion after mass vaccination with attenuated polioviruses in Hungary. *Br Med J*. volume 1(5237): pages 1410-1417.
- Domok, I., Molnar, E., Jancso, A., et al. (1962). Enterovirus survey in children after mass vaccination with live attenuated polioviruses. *Br Med J*. volume 1(5280): pages 743-746.
- Dowdle, W.R., De Gourville, E., Kew, O.M., et al. (2003). Polio eradication: the OPV paradox. *Rev Med Virol*. volume 13(5): pages 277-291.
- Drake, J.W. (1999). The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes. *Ann N Y Acad Sci*. volume 870: pages 100-107.
- Drake, J.W. und Holland, J.J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. volume 96(24): pages 13910-13913.
- Dubes, G.R. und Wenner, H.A. (1957). Virulence of polioviruses in relation to variant characteristics distinguishable on cells in vitro. *Virology*. volume 4(2): pages 275-296.
- Ehrenfeld, E. und Teterina, N.L. (2002). Initiation of Translation of Picornavirus RNAs: Structure and Function of Internal Ribosome Entry Site. In *Molecular Biology of Picornaviruses*. Semler, B.L. und Wimmer, E. (Ed.). Washington, DC. volume 1: pages 159-169. ASM Press. 1st edition.

- Escarmis, C., Davila, M. und Domingo, E. (1999). Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. *J Mol Biol.* volume 285(2): pages 495-505.
- Esteves, K. (1988). Safety of Oral Poliomyelitis vaccine: results of a WHO enquiry. *Bull World Health Organ.* volume 66(6): pages 739-746.
- Fanconi, G. (1952). Poliomyelitis und verwandte neurotrope Viruskrankheiten. In *Handbuch der Inneren Medizin.* Bergmann, G.v., Frey, W. und Schwiegk, H. (Ed.). Berlin. volume: pages 514-537. Springer-Verlag. edition.
- Fiore, L., Genovese, D., Diamanti, E., et al. (1998). Antigenic and molecular characterization of wild type 1 poliovirus causing outbreaks of poliomyelitis in Albania and neighboring countries in 1996. *J Clin Microbiol.* volume 36(7): pages 1912-1918.
- Fox, J. und Hall, C. (1980). Experimental studies with vaccine strains of polioviruses. *In: Viruses and Families.* volume (7): pages 152-195.
- Furione, M., Guillot, S., Otelea, D., et al. (1993). Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology.* volume 196(1): pages 199-208.
- Gamarnik, A.V. und Andino, R. (2000). Interactions of viral protein 3CD and poly(rC) binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome. *J Virol.* volume 74(5): pages 2219-2226.
- Gavrilin, G.V., Cherkasova, E.A., Lipskaya, G.Y., et al. (2000). Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J Virol.* volume 74(16): pages 7381-7390.
- Gelfand, H.M., Leblanc, D.R., Fox, J.P., et al. (1957). Studies on the development of natural immunity to poliomyelitis in Louisiana. II. Description and analysis of episodes of infection observed in study group households. *Am J Hyg.* volume 65(3): pages 367-385.
- Georgescu, M.M., Balanant, J., Macadam, A., et al. (1997). Evolution of the Sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol.* volume 71(10): pages 7758-7768.
- Georgescu, M.M., Delpeyroux, F., Tardy-Panit, M., et al. (1994). High diversity of poliovirus strains isolated from the central nervous system from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol.* volume 68(12): pages 8089-8101.
- Georgescu, M.M., Tardy-Panit, M., Guillot, S., et al. (1995). Mapping of mutations contributing to the temperature sensitivity of the Sabin 1 vaccine strain of poliovirus. *J Virol.* volume 69(9): pages 5278-5286.
- Goodfellow, I.G., Kerrigan, D. und Evans, D.J. (2003). Structure and function analysis of the poliovirus cis-acting replication element (CRE). *Rna.* volume 9(1): pages 124-137.

- Gouandjika-Vasilache, I., Akoua-Koffi, C., Begaud, E., et al. (2005). No evidence of prolonged enterovirus excretion in HIV-seropositive patients. *Trop Med Int Health*. volume 10(8): pages 743-747.
- Halsey, N.A., Pinto, J., Espinosa-Rosales, F., et al. (2004). Search for poliovirus carriers among people with primary immune deficiency diseases in the United States, Mexico, Brazil, and the United Kingdom. *Bull World Health Organ*. volume 82(1): pages 3-8.
- Hansen, J.L., Long, A.M.und Schultz, S.C. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure*. volume 5(8): pages 1109-1122.
- Hara, M., Saito, Y., Komatsu, T., et al. (1981). Antigenic analysis of polioviruses isolated from a child with agammaglobulinemia and paralytic poliomyelitis after Sabin vaccine administration. *Microbiol Immunol*. volume 25(9): pages 905-913.
- He, Y., Bowman, V.D., Mueller, S., et al. (2000). Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. volume 97(1): pages 79-84.
- He, Y., Mueller, S., Chipman, P.R., et al. (2003). Complexes of poliovirus serotypes with their common cellular receptor, CD155. *J Virol*. volume 77(8): pages 4827-4835.
- Hellen, C.U., Facke, M., Krausslich, H.G., et al. (1991). Characterization of poliovirus 2A proteinase by mutational analysis: residues required for autocatalytic activity are essential for induction of cleavage of eukaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J Virol*. volume 65(8): pages 4226-4231.
- Hogle, J.M., Chow, M.und Filman, D.J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*. volume 229(4720): pages 1358-1365.
- Hogle, J.M.und Filman, D.J. (1989). The antigenic structure of poliovirus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. volume 323(1217): pages 467-478.
- Hovi, T., Lindholm, N., Savolainen, C., et al. (2004). Evolution of wild-type 1 poliovirus in two healthy siblings excreting the virus over a period of 6 months. *J Gen Virol*. volume 85(Pt 2): pages 369-377.
- Jacobson, S.J., Konings, D.A.und Sarnow, P. (1993). Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol*. volume 67(6): pages 2961-2971.
- Jochmann, G. (1914). Epidemische Kinderlähmung. In *Lehrbuch der Infektionskrankheiten*. Jochmann, G. (Ed.). Berlin. pages 609-632. Verlag von Julius Springer.
- Kawamura, N., Kohara, M., Abe, S., et al. (1989). Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. *J Virol*. volume 63(3): pages 1302-1309.

- Kew, O., Morris-Glasgow, V., Landaverde, M., et al. (2002). Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science*. volume 296(5566): pages 356-359.
- Kew, O.M., Sutter, R.W., Nottay, B.K., et al. (1998). Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J Clin Microbiol*. volume 36(10): pages 2893-2899.
- Kew, O.M., Wright, P.F., Agol, V.I., et al. (2004). Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bull World Health Organ*. volume 82(1): pages 16-23.
- Khetsuriani, N., Prevots, D.R., Quick, L., et al. (2003). Persistence of vaccine-derived polioviruses among immunodeficient persons with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Infect Dis*. volume 188(12): pages 1845-1852.
- Kilpatrick, D.R., Nottay, B., Yang, C.F., et al. (1998). Serotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. *J Clin Microbiol*. volume 36(2): pages 352-357.
- Kilpatrick, D.R., Nottay, B., Yang, C.F., et al. (1996). Group-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residue at positions of codon degeneracy. *J Clin Microbiol*. volume 34(12): pages 2990-2996.
- Kirschstein, R., Baron, S., Borman, G.S., et al. (1960). Neurovirulence of attenuated type 1 poliovirus vaccine strains after intramuscular inoculation of rhesus monkeys. *Virology*. volume 11: pages 300-302.
- Kitamura, N., Semler, B.L., Rothberg, P.G., et al. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*. volume 291(5816): pages 547-553.
- Kohara, M., Omata, T., Kameda, A., et al. (1985). In vitro phenotypic markers of a poliovirus recombinant constructed from infectious cDNA clones of the neurovirulent Mahoney strain and the attenuated Sabin 1 strain. *J Virol*. volume 53(3): pages 786-792.
- Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Toyoda, H., et al. (1987). Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J Virol*. volume 61(9): pages 2711-2718.
- Landsteiner, K. und Popper, E. (1909). Übertragung der Poliomyelitis acuta auf Affen. *Z. Immunitätsforsch*. volume 2: pages 377-390.
- Lawson, M.A. und Semler, B.L. (1992). Alternate poliovirus nonstructural protein processing cascades generated by primary sites of 3C proteinase cleavage. *Virology*. volume 191(1): pages 309-320.
- Lee, Y.F., Nomoto, A., Detjen, B.M., et al. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. volume 74(1): pages 59-63.

- Li, J., Zhang, L.B., Yoneyama, T., et al. (1996). Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients. *Arch Virol.* volume 141(6): pages 1047-1054.
- Liu, H.M., Zheng, D.P., Zhang, L.B., et al. (2000). Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China. *J Virol.* volume 74(23): pages 11153-11161.
- Macadam, A.J., Arnold, C., Howlett, J., et al. (1989). Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology.* volume 172(2): pages 408-414.
- MacCallum, F.O. (1971). Hypogammaglobulinaemia in the United Kingdom. Chapter VII. The role of humoral antibodies in protection against and recovery from bacterial and virus infections in hypogammaglobulinaemia. *Spec Rep Ser Med Res Counc (G B).* volume 310: pages 72-85.
- MacLennan, C., Dunn, G., Huissoon, A.P., et al. (2004). Failure to clear persistent vaccine-derived neurovirulent poliovirus infection in an immunodeficient man. *Lancet.* volume 363(9420): pages 1509-1513.
- Martin, J. (2006). Vaccine-derived poliovirus from long term excretors and the end game of polio eradication. *Biologicals.* volume 34(2): pages 117-122.
- Martin, J., Dunn, G., Hull, R., et al. (2000). Evolution of the Sabin strain of type 3 poliovirus in an immunodeficient patient during the entire 637-day period of virus excretion. *J Virol.* volume 74(7): pages 3001-3010.
- Martin, J., Odoom, K., Tuite, G., et al. (2004). Long-term excretion of vaccine-derived poliovirus by a healthy child. *J Virol.* volume 78(24): pages 13839-13847.
- Mas Lago, P., Caceres, V.M., Galindo, M.A., et al. (2001). Persistence of vaccine-derived poliovirus following a mass vaccination campaign in Cuba: implications for stopping polio vaccination after global eradication. *Int J Epidemiol.* volume 30(5): pages 1029-1034.
- McGoldrick, A., Macadam, A.J., Dunn, G., et al. (1995). Role of mutations G-480 and C-6203 in the attenuation phenotype of Sabin type 1 poliovirus. *J Virol.* volume 69(12): pages 7601-7605.
- Meyer, J.A. (1990). A practical mechanical respirator, 1929: the "iron lung". *Ann Thorac Surg.* volume 50(3): pages 490-493.
- Minor, P. (2001). Characteristics of poliovirus strains from long-term excretors with primary immunodeficiencies. *Dev Biol (Basel).* volume 105: pages 75-80.
- Minor, P.D. (1990). Antigenic structure of picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* volume 161: pages 121-154.
- Minor, P.D. (1992). The molecular biology of poliovaccines. *J Gen Virol.* volume 73 (Pt 12): pages 3065-3077.
- Minor, P.D.und Dunn, G. (1988). The effect of sequences in the 5' non-coding region on the replication of polioviruses in the human gut. *J Gen Virol.* volume 69 (Pt 5): pages 1091-1096.

- Misbah, S.A., Lawrence, P.A., Kurtz, J.B., et al. (1991). Prolonged faecal excretion of poliovirus in a nurse with common variable hypogammaglobulinaemia. *Postgrad Med J.* volume 67(785): pages 301-303.
- Mueller, S., Wimmer, E.und Cello, J. (2005). Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Res.* volume 111(2): pages 175-193.
- Mulders, M.N., Lipskaya, G.Y., van der Avoort, H.G., et al. (1995). Molecular epidemiology of wild poliovirus type 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J Infect Dis.* volume 171(6): pages 1399-1405.
- Nakano, J.H., Gelfand, H.M.und Cole, J.T. (1963). The Use Of A Modified Wecker Technique For Serodifferentiation Of Type 1 Polioviruses Related And Unrelated To Sabin's Vaccine Strain. li. Antigenic Segregation Of Isolates From Specimens Collected In Field Studies. *Am J Hyg.* volume 78: pages 214-226.
- Nakano, J.H., Hatch, M.H., Thieme, M.L., et al. (1978). Parameters for differentiating vaccine-derived and wild poliovirus strains. *Prog Med Virol.* volume 24: pages 178-206.
- Nibbeling, R., Reimerink, J.H., Agboatwala, M., et al. (1994). A poliovirus type-specific IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid diagnosis of poliomyelitis. *Clin Diagn Virol.* volume 2(2): pages 113-126.
- Nomoto, A., Omata, T., Toyoda, H., et al. (1982). Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin 1 strain genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* volume 79(19): pages 5793-5797.
- Ogra, P.L. (1984). Mucosal immune response to poliovirus vaccines in childhood. *Rev Infect Dis.* volume 6 Suppl 2: pages S361-368.
- Okuda, B., Uetani, E.und Okamoto, K. (2006). Vaccine-associated paralytic poliomyelitis caused by contact infection. *Intern Med.* volume 45(6): pages 373-375.
- Omata, T., Kohara, M., Kuge, S., et al. (1986). Genetic analysis of the attenuation phenotype of poliovirus type 1. *J Virol.* volume 58(2): pages 348-358.
- Onorato, I.M., Modlin, J.F., McBean, A.M., et al. (1991). Mucosal immunity induced by enhance-potency inactivated and oral polio vaccines. *J Infect Dis.* volume 163(1): pages 1-6.
- Osterhaus, A.D., van Wezel, A.L., Hazendonk, T.G., et al. (1983). Monoclonal antibodies to polioviruses. Comparison of intratypic strain differentiation of poliovirus type 1 using monoclonal antibodies versus cross-absorbed antisera. *Intervirology.* volume 20(2-3): pages 129-136.
- Osterhaus, A.D., van Wezel, A.L., Stegmann, A.J., et al. (1984). Strain differentiation of polioviruses with monoclonal antibodies. *Dev Biol Stand.* volume 57: pages 135-139.

- Pallansch, M.A. und Roos, R.P. (1996). Enteroviruses: Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus and newer Enteroviruses. In *Fields Virology*. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Monath, T.P., Melnick, J.L., Roizman, B. und Straus, S.E. volume 1: pages 723-770. Lippincott Williams & Wilkins. 3rd edition.
- Paul, A.V., Mugavero, J., Yin, J., et al. (2000). Studies on the attenuation phenotype of polio vaccines: poliovirus RNA polymerase derived from Sabin type 1 sequence is temperature sensitive in the uridylylation of VPg. *Virology*. volume 272(1): pages 72-84.
- Paul, A.V., Yin, J., Mugavero, J., et al. (2003). A "slide-back" mechanism for the initiation of protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *J Biol Chem*. volume 278(45): pages 43951-43960.
- Paul, J.R. (1992). The clinical epidemiology of poliomyelitis. 1941. *Medicine (Baltimore)*. volume 71(5): pages 303-311; discussion 320-303.
- Pavlov, D.N., Van Zyl, W.B., Kruger, M., et al. (2006). Poliovirus vaccine strains detected in stool specimens of immunodeficient children in South Africa. *Diagn Microbiol Infect Dis*. volume 54(1): pages 23-30.
- Pelletier, J., Kaplan, G., Racaniello, V.R., et al. (1988). Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol Cell Biol*. volume 8(3): pages 1103-1112.
- Pilipenko, E.V., Maslova, S.V., Sinyakov, A.N., et al. (1992). Towards identification of cis-acting elements involved in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs: a proposal for the existence of tRNA-like terminal structures. *Nucleic Acids Res*. volume 20(7): pages 1739-1745.
- Pliaka, V., Dedepsidis, E., Kyriakopoulou, Z., et al. (2007). Use of mutational pattern in 5'-NCR and VP1 regions of polioviruses for molecular diagnosis. *Mol Cell Probes*. volume 21(4): pages 267-275.
- Racaniello, V.R. (2007). Picornaviridae: The Virus and Their Replication. In *Fields Virology*. Knipe, D.M. und Howley, P.M. volume 2: pages 796-839. Lippincott Williams & Wilkins. 5th edition.
- Rasch, G., Schreier, E., Kiehl, W., et al. (2001). [Worldwide eradication of poliomyelitis]. *Wien Klin Wochenschr*. volume 113(20-21): pages 839-845.
- Ren, R.B., Costantini, F., Gorgacz, E.J., et al. (1990). Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell*. volume 63(2): pages 353-362.
- Rezapkin, G.V., Alexander, W., Dragunsky, E., et al. (1998). Genetic stability of Sabin 1 strain of poliovirus: implications for quality control of oral poliovirus vaccine. *Virology*. volume 245(2): pages 183-187.
- Richards, O.C. und Ehrenfeld, E. (1998). Effects of poliovirus 3AB protein on 3D polymerase-catalyzed reaction. *J Biol Chem*. volume 273(21): pages 12832-12840.

- Rico-Hesse, R., Pallansch, M.A., Nottay, B.K., et al. (1987). Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology*. volume 160(2): pages 311-322.
- RKI, (Robert Koch Institut) (2000). Poliomyelitis: Endphase der Eradikation hat begonnen. *Epidemiologisches Bulletin*. volume 43: pages 341-343.
- Roberts, L. (2007). Infectious disease. Vaccine-related polio outbreak in Nigeria raises concerns. *Science*. volume 317(5846): pages 1842.
- Rosen, F.S., Cooper, M.D. und Wedgwood, R.J. (1995). The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med*. volume 333(7): pages 431-440.
- Rotbart, H.A., Ahmed, A., Hickey, S., et al. (1997). Diagnosis of enterovirus infection by polymerase chain reaction of multiple specimen types. *Pediatr Infect Dis J*. volume 16(4): pages 409-411.
- Rousset, D., Rakoto-Andrianarivelo, M., Razafindratsimandresy, R., et al. (2003). Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg Infect Dis*. volume 9(7): pages 885-887.
- Sabin, A.B. (1985). Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *J Infect Dis*. volume 151(3): pages 420-436.
- Sabin, A.B., Ramos-Alvarez, M., Alvarez-Amezquita, J., et al. (1960). Live, orally given poliovirus vaccine. Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses. *Jama*. volume 173: pages 1521-1526.
- Sabin, A.B.a.A.L. (1958). Relation between reproductive capacity of polioviruses at different temperatures in tissue culture and neurovirulence. *Science*. volume 129: pages 1287-1288.
- Salk, J.E., Krech, U., Youngner, J.S., et al. (1954). Formaldehyde treatment and safety testing of experimental poliomyelitis vaccines. *Am J Public Health Nations Health*. volume 44(5): pages 563-570.
- Sarnow, P. (1989). Role of 3'-end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made in vitro. *J Virol*. volume 63(1): pages 467-470.
- Savilahti, E., Klemola, T., Carlsson, B., et al. (1988). Inadequacy of mucosal IgM antibodies in selective IgA deficiency: excretion of attenuated polio viruses is prolonged. *J Clin Immunol*. volume 8(2): pages 89-94.
- Schweiger, B., Schreier, E., Bothig, B., et al. (1994). Differentiation of vaccine and wild-type polioviruses using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Arch Virol*. volume 134(1-2): pages 39-50.
- Seipelt, J., Guarne, A., Bergmann, E., et al. (1999). The structures of picornaviral proteinases. *Virus Res*. volume 62(2): pages 159-168.
- Shimizu, H., Thorley, B., Paladin, F.J., et al. (2004). Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J Virol*. volume 78(24): pages 13512-13521.

- Skinner, M.A., Racaniello, V.R., Dunn, G., et al. (1989). New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J Mol Biol.* volume 207(2): pages 379-392.
- Sonenberg, N. (1987). Regulation of translation by poliovirus. *Adv Virus Res.* volume 33: pages 175-204.
- Strauss, D.M., Glustrom, L.W.und Wuttke, D.S. (2003). Towards an understanding of the poliovirus replication complex: the solution structure of the soluble domain of the poliovirus 3A protein. *J Mol Biol.* volume 330(2): pages 225-234.
- Sutter, R.und Prevots, D.R. (1994). Vaccine-associated paralytic poliomyelitis among immunodeficient persons. *Infections in Medicine.* volume 11(6): pages 426-438.
- Tardy-Panit, M., Blondel, B., Martin, A., et al. (1993). A mutation in the RNA polymerase of poliovirus type 1 contributes to attenuation in mice. *J Virol.* volume 67(8): pages 4630-4638.
- Teterina, N.L., Gorbalenya, A.E., Egger, D., et al. (1997). Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J Virol.* volume 71(12): pages 8962-8972.
- Towner, J.S., Ho, T.V.und Semler, B.L. (1996). Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J Biol Chem.* volume 271(43): pages 26810-26818.
- Toyoda, H., Kohara, M., Kataoka, Y., et al. (1984). Complete nucleotide sequences of all three poliovirus serotype genomes. Implication for genetic relationship, gene function and antigenic determinants. *J Mol Biol.* volume 174(4): pages 561-585.
- Toyoda, H., Yang, C.F., Takeda, N., et al. (1987). Analysis of RNA synthesis of type 1 poliovirus by using an in vitro molecular genetic approach. *J Virol.* volume 61(9): pages 2816-2822.
- van der Avoort, H.G., Hull, B.P., Hovi, T., et al. (1995). Comparative study of five methods for intratypic differentiation of polioviruses. *J Clin Microbiol.* volume 33(10): pages 2562-2566.
- Weller, T.H., Robbins, F.C.und Enders, J.F. (1949). Cultivation of poliomyelitis virus in cultures of human foreskin and embryonic tissues. *Proc Soc Exp Biol Med.* volume 72(1): pages 153-155.
- Westendorf, W. (1992). *Erwachen der Heilkunst. Die Medizin im alten Ägypten.* Munich, Germany, Artemis & Winkler.
- WHO (1976). The relation between acute persisting spinal paralysis and poliomyelitis vaccine (oral): results of a WHO enquiry. *Bull World Health Organ.* volume 53(4): pages 319-331.
- WHO (1997). Report of the second meeting of the Global Commission for the Certification of the Eradication of Poliomyelitis.In. (Ed.). Geneva, Switzerland. volume: pages., World Health Organization, WHO/EPI/GEN/98.03. edition.

- WHO (2003). Introduction of inactivated poliovirus vaccine into oral poliovirus vaccine-using countries. WHO position paper. *Weekly epidemiological record*. volume 78(28): pages 241-250.
- WHO (2004). *Polio Laboratory Manual*. Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- WHO (2006). *Global Polio Eradication Initiative: Annual Report 2006*. Geneva, Switzerland, World Health Organization, WHO/POLIO/07.02.
- WHO (2007). *Global Polio Eradication Initiative: Wild Poliovirus Weekly Update (11th July 2007)*. Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- WHO, Consultative Group (1982). The relation between acute persisting spinal paralysis and poliomyelitis vaccine--results of a ten-year enquiry. *Bull World Health Organ*. volume 60(2): pages 231-242.
- WHO, Technical Consultation Group (1998). *Global Eradication of Poliomyelitis. Report of the Second Meeting of the Technical Consultation Group for Global Eradication of Poliomyelitis*. Geneva, Switzerland, World Health Organization; WHO/EPI/GEN 98.04.
- WHO, Technical Consultative Group (2002). "Endgame" issues for the global polio eradication initiative. *Clin Infect Dis*. volume 34(1): pages 72-77.
- Wimmer, E., Hellen, C.U.und Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet*. volume 27: pages 353-436.
- Wood, D.J.und Hull, B. (1999). L20B cells simplify culture of polioviruses from clinical samples. *J Med Virol*. volume 58(2): pages 188-192.
- Wood, D.J., Sutter, R.W.und Dowdle, W.R. (2000). Stopping poliovirus vaccination after eradication: issues and challenges. *Bull World Health Organ*. volume 78(3): pages 347-357.
- Yalamanchili, P., Harris, K., Wimmer, E., et al. (1996). Inhibition of basal transcription by poliovirus: a virus- encoded protease (3Cpro) inhibits formation of TBP-TATA box complex in vitro. *J Virol*. volume 70(5): pages 2922-2929.
- Yang, C.F., Chen, H.Y., Jorba, J., et al. (2005). Intratypic recombination among lineages of type 1 vaccine-derived poliovirus emerging during chronic infection of an immunodeficient patient. *J Virol*. volume 79(20): pages 12623-12634.
- Yang, C.F., De, L., Holloway, B.P., et al. (1991). Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction. *Virus Res*. volume 20(2): pages 159-179.
- Yang, C.F., Naguib, T., Yang, S.J., et al. (2003). Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J Virol*. volume 77(15): pages 8366-8377.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. volume 31(13): pages 3406-3415.

8 Anhang

8.1 Alignments

Dargestellt sind die Alignments der ermittelten Klonsequenzen (TS1, TS2, TS3) der Isolate 00-87 und 04-372 inclusive der Datenbanksequenzen für Sabin Typ 1 und Mahoney. Die angegebenen Koordinaten beziehen sich auf die Sequenz des Isolates 04-372.

8.1.1 TS1

```

                                40         50         60         70         80
Sabin Typ 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mahoney      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
00-87TS1A    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
00-87TS1B    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
00-87TS1C    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
00-87TS1D    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
00-87TS1E    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1A    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1B    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1C    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1D    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1E    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1F    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
                                90         100        110        120        130
Sabin Typ 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mahoney      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
00-87TS1A    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
00-87TS1B    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
00-87TS1C    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
00-87TS1D    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
00-87TS1E    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1A    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1B    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1C    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1D    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1E    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
04-372TS1F    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

140 150 160 170 180

Sabin Typ 1 TAGAAGGGGGTACAAACCAGTACCACCACGAACAAGCACCTTCTGTTTCCC
 Mahoney
 00-87TS1A
 00-87TS1B
 00-87TS1C
 00-87TS1D
 00-87TS1E C
 04-372TS1A
 04-372TS1B
 04-372TS1C
 04-372TS1D
 04-372TS1E
 04-372TS1F

190 200 210 220 230

Sabin Typ 1 CGGTGATGTTGTATAGACTGCTTGCGTGGTTGAAAGCGACGGATCCGTTA
 Mahoney C
 00-87TS1A C
 00-87TS1B C C T
 00-87TS1C C C
 00-87TS1D C C
 00-87TS1E C C
 04-372TS1A C C
 04-372TS1B C C
 04-372TS1C C C
 04-372TS1D C C
 04-372TS1E C C
 04-372TS1F C C

240 250 260 270 280

Sabin Typ 1 TCCGTTATGTACTTCGAGAAGCCAGTACCACCTCGGAATCTTCGATGC
 Mahoney
 00-87TS1A
 00-87TS1B T T
 00-87TS1C T T
 00-87TS1D T T
 00-87TS1E T T
 04-372TS1A T
 04-372TS1B T
 04-372TS1C T
 04-372TS1D T
 04-372TS1E T
 04-372TS1F T

```

                290          300          310          320          330
Sabin Typ 1  G.TT.GCG.CT.CAG.CACT.CA.ACCCC.AG.AGT.GT.AG.CTT.AGG.CTG.ATG.AGT.C.TGG
Mahoney
00-87TS1A
00-87TS1B      .G.      .G.
00-87TS1C      .G.      .G.
00-87TS1D      .G.      .G.
00-87TS1E      .G.      .G.
04-372TS1A
04-372TS1B
04-372TS1C
04-372TS1D
04-372TS1E
04-372TS1F

```

```

                340          350          360          370          380
Sabin Typ 1  A.CAT.CCC.CT.CACC.GGT.GAC.GGT.GGT.CT.AGG.CTG.CGT.TGG.CGG.CCT.ACC.TAT
Mahoney
00-87TS1A      .C.      .C.      .C.
00-87TS1B      .T.      .C.      .C.
00-87TS1C      .C.      .C.
00-87TS1D      .C.      .C.
00-87TS1E      .C.      .C.
04-372TS1A      .G.      .C.      .C.      .C.
04-372TS1B      .G.      .C.      .C.      .C.
04-372TS1C      .G.      .C.      .C.      .C.
04-372TS1D      .G.      .C.      .C.      .C.
04-372TS1E      .G.      .C.      .C.      .C.
04-372TS1F      .G.      .C.      .C.      .C.

```

```

                390          400          410          420          430
Sabin Typ 1  GG.CT.AAC.GCCA.TGGG.ACG.CT.AGT.TTG.TGA.ACA.AGG.TGT.GA.AG.AGC.CT.A.TTG
Mahoney
00-87TS1A      .G.
00-87TS1B      .A.
00-87TS1C      .A.
00-87TS1D      .A.
00-87TS1E      .A.
04-372TS1A
04-372TS1B
04-372TS1C
04-372TS1D
04-372TS1E
04-372TS1F

```



```

          590          600          610          620          630
Sabin Typ 1 GCTGCTTATGGTGACAATCACAGATTGTTATCATAAAGCGAATTGGATTG
Mahoney
00-87TS1A
00-87TS1B
00-87TS1C
00-87TS1D
00-87TS1E
04-372TS1A
04-372TS1B
04-372TS1C
04-372TS1D
04-372TS1E
04-372TS1F

```

```

          640          650          660          670          680
Sabin Typ 1 GCCATCCGGTGAAAGTGAGATTTCATTATCTATCTGTTTGCTGGATTCGCT
Mahoney
00-87TS1A
00-87TS1B
00-87TS1C
00-87TS1D
00-87TS1E
04-372TS1A
04-372TS1B
04-372TS1C
04-372TS1D
04-372TS1E
04-372TS1F

```

```

          690          700          710          720          730
Sabin Typ 1 CCATTGAGTGTGTTTACTCTAAGTACAATTTCAACAGTTATTTCAATCAG
Mahoney
00-87TS1A
00-87TS1B
00-87TS1C
00-87TS1D
00-87TS1E
04-372TS1A
04-372TS1B
04-372TS1C
04-372TS1D
04-372TS1E
04-372TS1F

```



```

          1040      1050      1060      1070      1080
Sabin Typ 1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mahoney      AGGC GGCTAAATTCAGTAGTCGCTTATGGGCGTTGGCCTGAATATCTGAGG
00-87TS1A   .....C.....A.....A.....
00-87TS1B   .....A.....C.....A.....
00-87TS1C   .....A.....A.....
00-87TS1D   .....A.....C.....A.....
00-87TS1E   .....A.....C.....A.....
04-372TS1A  .....GA.....A.....A.....
04-372TS1B  .....GA.....T.A.....A.....
04-372TS1C  .A.....GA.....A.....A.....
04-372TS1D  .....GA.....A.....A.....
04-372TS1E  .....GA.....A.....T..AA
04-372TS1F  .....GA.....A.....T..AA

```

```

          1090      1100      1110      1120      1130
Sabin Typ 1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mahoney      GACAGCGAAGCCAATCCAGTGGACCAGCCGACAGAACCAGACGTCGCTGC
00-87TS1A   .....A.A.....
00-87TS1B   .....A.G.....T.....
00-87TS1C   .....A.....
00-87TS1D   .....A.G.....T.....
00-87TS1E   .....A.G.....T.....
04-372TS1A  .....C.....A.....
04-372TS1B  .....C.....A.....
04-372TS1C  .....C.....
04-372TS1D  .....C.....A.....-.....
04-372TS1E  .....T.....C.....A.....
04-372TS1F  .....T.....C.....A.....

```

```

          1140      1150      1160      1170      1180
Sabin Typ 1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mahoney      ATGCAGGTTTTATACGCTAGACACCGTGTCTTGGACGAAAGAGTCGCGAG
00-87TS1A   .....A.....
00-87TS1B   .....A.....
00-87TS1C   .....A.G.....
00-87TS1D   .....A.....
00-87TS1E   .....A.....
04-372TS1A  .....T.....A.....A.....
04-372TS1B  .....T.....A.....A.....
04-372TS1C  .....T.....A.....A.....
04-372TS1D  .....T.....A.....A.....
04-372TS1E  .....T.....A.....A.....A.....
04-372TS1F  .....C.T.....A.....A.....

```

```

          1190      1200      1210      1220      1230
Sabin Typ 1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mahoney      .....A.....G
00-87TS1A   .....G.....
00-87TS1B   .....G.....
00-87TS1C   .....
00-87TS1D   .....G.....
00-87TS1E   .....G.....
04-372TS1A  .....A.....G.....G.....T
04-372TS1B  .....G.....G.....T
04-372TS1C  .....G.....G.....
04-372TS1D  .....G.....G.....T
04-372TS1E  .....G.....G.....
04-372TS1F  .A.....T.....

```

```

          1240      1250      1260      1270      1280
Sabin Typ 1  CAAAATATGTACTACCACTACCTAGGTAGGTCCGGGTACACCGTGCAATGT
Mahoney      .....
00-87TS1A   .....
00-87TS1B   .....
00-87TS1C   .....
00-87TS1D   .....
00-87TS1E   .....
04-372TS1A  .....C.....T.....G.....T.....
04-372TS1B  .....C.....T.....G.....T.....
04-372TS1C  .....C.....T.....G.....T.....
04-372TS1D  .....C.....T.....G.....T.....
04-372TS1E  .....C.....T.....G.....T.....
04-372TS1F  .....A.....C.....

```

```

          1290      1300      1310      1320      1330
Sabin Typ 1  ACAGTGTAAACGCCGCCAAATTCACCCAGGGGGCACTAGGGGTATTCCCGC
Mahoney      .....
00-87TS1A   .....
00-87TS1B   .....T.....T.....
00-87TS1C   G.....
00-87TS1D   .....T.....
00-87TS1E   .....T.....
04-372TS1A  G.....G.....T.....
04-372TS1B  G.....G.....T.....
04-372TS1C  G.....G.....T.....
04-372TS1D  G.....G.....T.....
04-372TS1E  G.....G.....T.....
04-372TS1F  G.....T.....

```

```

                1340      1350      1360      1370      1380
Sabin Typ 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mahoney      TACCAGAGATGTGTCTGGCCGGGGATAGCAACACCAC TACCATGCACACC
00-87TS1A   .....A.....T.C.T.....
00-87TS1B   .....T.....T.....
00-87TS1C   .....T.C.T.....
00-87TS1D   .....T.C.T.....
00-87TS1E   .....T.....T.....T.....
04-372TS1A  .....T.....A.....C.....C.....
04-372TS1B  .....A.....C.....C.....
04-372TS1C  .....A.....C.....C.....
04-372TS1D  .....A.....C.....C.....
04-372TS1E  .....A.....C.....
04-372TS1F  .....G.....A.....T.....T.....

```

```

                1390      1400      1410      1420      1430
Sabin Typ 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mahoney      AGCTATCAAAATGCCAATCCTGGCGAGAAAGGAGGCAC TTTCACGGGTAC
00-87TS1A   .....G.....C.....
00-87TS1B   .....C.....
00-87TS1C   .....G.....A.....
00-87TS1D   .....
00-87TS1E   .....G.....
04-372TS1A  .....G.....
04-372TS1B  .....G.....
04-372TS1C  .....G.....
04-372TS1D  .....G.....
04-372TS1E  .....G.....
04-372TS1F  .....G.....T.....C.....

```

```

                1440      1450      1460      1470      1480
Sabin Typ 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mahoney      GTTCACTCCTGACGACAACCAGACATCACCTGCCCCTAGGTTCTGCCCGG
00-87TS1A   .....A.....C.....
00-87TS1B   .....T.....C.....
00-87TS1C   .....T.T.....
00-87TS1D   .....T.T.....
00-87TS1E   .....T.T.....
04-372TS1A  .....C.C.....TT.T.....C.....
04-372TS1B  .....C.C.....TT.T.....C.....
04-372TS1C  .....C.....TT.T.....C.T.....
04-372TS1D  .....C.C.....TT.T.....C.....
04-372TS1E  .....C.....TT.T.....C.T.....
04-372TS1F  .....T.C.....T.....C.....A.....

```

```

          1490      1500      1510      1520      1530
    Sabin Typ 1  TGGATTACCTCTTTGGAAATGGCACGTTATTGGGGAATGCCTTTGTGTTTC
Mahoney
00-87TS1A      .....C.....G.....
00-87TS1B      .....A...G.....G.....
00-87TS1C      .....T.....
00-87TS1D      .....T.....
00-87TS1E      .....T.....
04-372TS1A     .....A...G.....A..G.....C.....
04-372TS1B     .....A...G.....A..G.....C.....
04-372TS1C     .....T..A...G.....A..G.....C.....
04-372TS1D     .....A...G.....A..G.....C.....
04-372TS1E     .....A...G.....T...GA...T.....
04-372TS1F     .....A...G.....T..AC..G.....

```

```

          1540      1550      1560      1570      1580
    Sabin Typ 1  CCGCACCAGATAATAAACCTACGGACCAACAACGTGTGCTACACTGGTACT
Mahoney
00-87TS1A     .....T.....G.....
00-87TS1B     .....G.....
00-87TS1C     .....G.....
00-87TS1D     .....G.....
00-87TS1E     .....G.....
04-372TS1A     .....C.....G.....
04-372TS1B     .....C.....G.....
04-372TS1C     .....C.....G.....
04-372TS1D     .....C.....G.....
04-372TS1E     ..A.....G.....G.....
04-372TS1F     .....T.....C.....G.....

```

```

          1590      1600      1610      1620      1630
    Sabin Typ 1  CCCTTACGTGAACCTCCCTCTCGATAGATAGTATGGTAAAGCACAATAATT
Mahoney
00-87TS1A     T.....
00-87TS1B     T.....T.....
00-87TS1C     T.....T.....
00-87TS1D     T.....T.....
00-87TS1E     T.....T.....
04-372TS1A     T.....A.....T..C.....
04-372TS1B     T.....A.....T..C.....
04-372TS1C     T.....A.....T..C.....
04-372TS1D     T.....A.....T..C.....
04-372TS1E     T.....T.....A.....C.....
04-372TS1F     T..C.....T.....A.....C.....

```

```

          1640      1650      1660      1670      1680
Sabin Typ 1  GGGGAATTGCAATATTACCAATGGCCCCATTAAATTTTGCTAGTGAGTCC
Mahoney
00-87TS1A   .....A.....A.....
00-87TS1B   .....A.....
00-87TS1C   .....A.....
00-87TS1D   .....A.....
00-87TS1E   .....A.....
04-372TS1A  .....A.....
04-372TS1B  .....A.....
04-372TS1C  .....A.....
04-372TS1D  .....A.....
04-372TS1E  ...G.....A.....C.A.....
04-372TS1F  ...G.....A.....C.A.....

```

```

          1690      1700      1710      1720      1730
Sabin Typ 1  TCCCCAGAGATTCCAATCACCTTGACCATAGCCCCATATGTGCTGTGAGTT
Mahoney
00-87TS1A   .....A.....C.....
00-87TS1B   .....
00-87TS1C   .....
00-87TS1D   .....
00-87TS1E   .....
04-372TS1A  .....G...AC...T...T...C...
04-372TS1B  .....G...AC...T...T...C...
04-372TS1C  .....G...AC...T...T...C...
04-372TS1D  .....G...AC...T...T...C...
04-372TS1E  ...G.A...A...A...T...C...A...
04-372TS1F  ...G.A...G...T...A...

```

```

          1740      1750      1760      1770      1780
Sabin Typ 1  CAATGGATTAAAGAAACATTACCCTGCCACGCTTACAGGGCCTGCCGGTCA
Mahoney
00-87TS1A   .....C.....G.....
00-87TS1B   .....T.....G.....
00-87TS1C   .....T.....G.....
00-87TS1D   .....T.....G.....
00-87TS1E   .....T.....G.....
04-372TS1A  .....C...T...G...A...
04-372TS1B  .....C...T...G...A...
04-372TS1C  .....C...T...G...A...
04-372TS1D  .....C...T...G...A...
04-372TS1E  .....C...C...G...T...A...
04-372TS1F  .....C...C...G...T...A...

```

```

          1790      1800      1810      1820      1830
Sabin Typ 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mahoney      TGAACACCCCTGGTAGCAATCAATATCTTACTGCAGACAACCTCCAGTCA
00-87TS1A   .....T.....C.....G.....
00-87TS1B   .....T.....C.....
00-87TS1C   .....T.....C.....
00-87TS1D   .....T.....C.....
00-87TS1E   .....T.....C.....
04-372TS1A  .....T.....C.....G.....C.....T.....A.....
04-372TS1B  .....T.....C.....G.....C.....T.....A.....
04-372TS1C  .....T.....C.....G.....C.....
04-372TS1D  .....T.....C.....G.....C.....T.....A.....
04-372TS1E  .....T.....C.....G.....C.....T.....A.....
04-372TS1F  .....T.T.....C.T.....G.....T.....

```

```

          1840      1850      1860      1870      1880
Sabin Typ 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mahoney      CCGTGTGCGCTGCCTGAATTTGATGTGACCCACCTATTGACATACCCGG
00-87TS1A   .....
00-87TS1B   .....C.....
00-87TS1C   .....A.....C.....
00-87TS1D   .....C.....
00-87TS1E   .....A.....C.....
04-372TS1A  .....C.....
04-372TS1B  .....G.....C.....
04-372TS1C  .....A.A.....C.....
04-372TS1D  .....G.....C.....
04-372TS1E  .....G.....C.....
04-372TS1F  .....A.....C.....

```

```

          1890      1900      1910      1920      1930
Sabin Typ 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mahoney      TGAAGTTAAGAACATGATGGAAATGGCAGAAATCGACACCATGATTCCCT
00-87TS1A   .....A.....
00-87TS1B   .....
00-87TS1C   .....
00-87TS1D   .....
00-87TS1E   .....
04-372TS1A  .....C.....
04-372TS1B  .....C.....
04-372TS1C  .....C.....
04-372TS1D  .....C.....C.....
04-372TS1E  .....G.....T.....T.....
04-372TS1F  C..G.....T.....T.....

```

1940 1950 1960 1970 1980

Sabin Typ 1|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

Mahoney TTTGACTTAAGTGCAAAAAAAAAAGAACCCATGGAAATGTATAGGGTTTCGG

00-87TS1AC.C.....T.....A.

00-87TS1B ..A.....C.....T.....A.

00-87TS1C ..A.....C.....T.....A.

00-87TS1D ..A.....C.....T.....A.

00-87TS1E ..A.....C.....T.....A.

04-372TS1A .CA.....C.....G.....T.....A.

04-372TS1B .CA.....C.....G.....T.....A.

04-372TS1C .CA.....C.....G.....T.....A.

04-372TS1D .CA.....C.....G..T.....T.....A.

04-372TS1E ..A.T..G.....C.....C.....A.

04-372TS1F ..A.T..G.....C.....C.....A.

1990 2000 2010 2020 2030

Sabin Typ 1|.....|.....|.....|.....|.....|

Mahoney TTAAGTGACAAAACACATACAGACGATCCCATACTCTGCCTGTCACTCTC

00-87TS1AT.....

00-87TS1BT.....

00-87TS1CT.....

00-87TS1DT.....

00-87TS1ET.....

04-372TS1AA.....

04-372TS1BA.....

04-372TS1CA.....

04-372TS1DA.....

04-372TS1E ..G.....G.....A.....

04-372TS1F ..G.....G.....A.....

2040 2050 2060 2070 2080

Sabin Typ 1|.....|.....|.....|.....|.....|

Mahoney TCCAGCTTCAGATCCTAGGTTGTCACATACTATGCTTGGAGAAATCCTAA

00-87TS1AA.....C.....

00-87TS1B C.....T.....G.

00-87TS1C C.....T.....G.

00-87TS1D C.....T.....

00-87TS1E C.....T.....G.TG.A..G.-----

04-372TS1AA.....C.C.....T.....

04-372TS1BA.....C.C.....T.....

04-372TS1CA.....C.C.....T.....

04-372TS1DA.....C.C.....T.....

04-372TS1EC.....G.C.G.....G.T.....

04-372TS1FC.....C.G.....G.G.T.....

2240 2250 2260 2270 2280

Sabin Typ 1|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTGGGACATAGGACTGCAGTCCTCATGTACTATGGTAGTGCCATGGATT

Mahoney
00-87TS1AT.....C.....G.....
00-87TS1BT.....T.....
00-87TS1CT.....T.....
00-87TS1D
00-87TS1E -----

04-372TS1A .T.....TG.G..T..A.....G.....
04-372TS1B .T.....TG.G..T..A.....G.....
04-372TS1C .T.....TG.G..T..A.....G.....
04-372TS1D .T.....TG.G..T..A.....G.....G.....
04-372TS1E .T.....TG.G..T..A.....G.....G.....
04-372TS1FTG.....T..A.....

2290 2300 2310 2320 2330

Sabin Typ 1|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGCAACACCACGTATCGGCCAAACCATAGATGATAGTTTCACCGAAGGCCG

Mahoney
00-87TS1A
00-87TS1BT.....
00-87TS1CT.....
00-87TS1DT.....
00-87TS1E -----

04-372TS1AA.....C.....
04-372TS1BA.....C.....
04-372TS1CA.....C.....
04-372TS1DA.....C.....
04-372TS1EA.....C.....
04-372TS1FC.....C.....T.....C.....

2340 2350 2360 2370 2380

Sabin Typ 1|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATACATCAGCGTCTTCTACCAAACCAGAAATAGTCGTCCCTCTTTCGACAC

Mahoney
00-87TS1AT.....
00-87TS1AA.....G.....
00-87TS1BA.....G.....
00-87TS1CA.....G.....
00-87TS1DA.....G.....
00-87TS1E -----

04-372TS1A G.....A.....A.G.....C.....A.....
04-372TS1B G..T.....A.....A.G.....C.....A.....
04-372TS1C G..T.....A.T.....A.G.....C.....A.....
04-372TS1D G.....A.....A.G.....C.....A.....
04-372TS1E G.....A.....A.G.....C.....A.....
04-372TS1FA.....G.....A.....

```

                2390      2400      2410      2420      2430
Sabin Typ 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mahoney
00-87TS1A    ...G.....C.....C.....
00-87TS1B    ...G.....T.....C.....
00-87TS1C    ...G.....T.....C.....
00-87TS1D    ...G.....T.....C.....
00-87TS1E    -----
04-372TS1A   ...G.....C.....A.....
04-372TS1B   ...G.....C.....A.....
04-372TS1C   .T..G.....C.....A.....T
04-372TS1D   ...G.....C.....A.....T
04-372TS1E   ...G.....C.....A.....T
04-372TS1F   ...G.....A..C.....T.....

```

```

                2440      2450      2460      2470      2480
Sabin Typ 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mahoney
00-87TS1A    .....T.....C.....G.....
00-87TS1B    .....T.....T.....
00-87TS1C    .....T.....T.....
00-87TS1D    .....T.....T.....
00-87TS1E    -----
04-372TS1A   .....T.....C.....T..C.....A.....
04-372TS1B   .....T.....C.....T..C.....A.....
04-372TS1C   .....T.A.....C..T..T..C.....A.....
04-372TS1D   .....T.....C.....T..C.....A.....
04-372TS1E   .....T.....C.....T..C.....A.....
04-372TS1F   .....AT.....G..C.....

```

```

                2490      2500      2510      2520      2530
Sabin Typ 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mahoney
00-87TS1A    .....C.....T.....
00-87TS1B    .....C.....
00-87TS1C    .....C.....
00-87TS1D    .....C.....
00-87TS1E    -----
04-372TS1A   .....G..C.....G.....T.....
04-372TS1B   .....G..C.....G.....T.....
04-372TS1C   .....G..C.....G.....T.....T.....
04-372TS1D   .....G..C.....G.....T.....T.....
04-372TS1E   .....G..C.....G.....T.....T.....
04-372TS1F   ....C.G..A.....

```

```

                2540      2550      2560      2570      2580
                |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sabin Typ 1 CGGTGGGGGCGGCAACGTC TAGAGACGCTCTCCCAAACACTGAAGCCAGT
Mahoney      .....A.....
00-87TS1A    ...T...A.....
00-87TS1B    .....T.....A.....
00-87TS1C    .....
00-87TS1D    .....
00-87TS1E    -----
04-372TS1A   .T..T...AA.....
04-372TS1B   .T..T...AA...A.....
04-372TS1C   .T..T...AA...A.....
04-372TS1D   .T..T...AA.....T.....
04-372TS1E   .T..T...AA...A.....
04-372TS1F   ...T.A..A...A.....A.....

```

```

..
Sabin Typ 1 GG
Mahoney ..
00-87TS1A ..
00-87TS1B ..
00-87TS1C ..
00-87TS1D ..
00-87TS1E --
04-372TS1A ..
04-372TS1B ..
04-372TS1C ..
04-372TS1D ..
04-372TS1E ..
04-372TS1F ..

```

8.1.2 TS2

```

                2370      2380      2390      2400      2410
                |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sabin Typ 1 GTCGTCCTCTTTTCGACACCCAGAGAGATGGACATCCTTGGTTTTGTGTC
Mahoney      .....
00-87TS2A    .....G.....C.....
00-87TS2B    .....G.....T.....
00-87TS2C    .....G.....T.....
04-372TS2A    .....G.....C.....
04-372TS2B    .....G.....C.....
04-372TS2C    .....G.....
04-372TS2D    .....G.....

```

2420 2430 2440 2450 2460

Sabin Typ 1 AGCGTGTAAATGACTTCAGCGTGCCTTGATGCGAGATACCACACATATAG
 MahoneyT.....
 00-87TS2AC.....T.....C.....
 00-87TS2BC.....T.....T.....
 00-87TS2CC.....T.....T.....
 04-372TS2AA.....T.....T.....C.....T.....C.....
 04-372TS2BA.....T.....C.....T.....C.....
 04-372TS2CA..C.....T.....AT.....G..C.....
 04-372TS2DC.....T.....AT.....G..C.....

2470 2480 2490 2500 2510

Sabin Typ 1 AGCAAAAAGCGCTAGCACAGGGGTTAGGTCAGATGCTTGAAAGCATGATT
 Mahoney
 00-87TS2AC.....
 00-87TS2BC.....
 00-87TS2CC.....
 04-372TS2AA.....G..C.....G.....
 04-372TS2BA.....G..C.....G.....
 04-372TS2CC..G..A.....
 04-372TS2DC..G..A.....

2520 2530 2540 2550 2560

Sabin Typ 1 GACAAACACAGTCCGTGAAACGGTGGGGCGGCAACGTCCTAGAGACGCTCT
 MahoneyA.....
 00-87TS2AT.....A..T.....A.....
 00-87TS2BG.....
 00-87TS2C
 04-372TS2AT.....T.....A..A.....A.....
 04-372TS2BT.....T..T.....AA.....
 04-372TS2CT.....A..A..A.....A.....
 04-372TS2DT.....T.....A..A.....A.....

2570 2580 2590 2600 2610

Sabin Typ 1 CCCAAACACTGAAGCCAGTGGACCAGCACACTCCAAGGAAATCCGGCAC
 MahoneyA.....
 00-87TS2AC..G.....
 00-87TS2BC..G.....
 00-87TS2C
 04-372TS2AT.....G.....T.....A.....
 04-372TS2BT.....G.....C.....
 04-372TS2CT.....G.....T.....A.....
 04-372TS2DT.....G.....T.....A.....

```

                2620      2630      2640      2650      2660
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TCACCGCAGTGGAAACTGGGGCCACAAATCCACTAGTCCCTTCTGATACA
00-87TS2A   .....T.....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .T.....
04-372TS2A  .....G...G..TA..
04-372TS2B  .....GA..
04-372TS2C  .....G..TA..
04-372TS2D  .....G..TA..

```

```

                2670      2680      2690      2700      2710
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      GTGCAAACCAGACATGTTGTACAACATAGGTCAAGGTCAGAGTCTAGCAT
00-87TS2A   .....A.....
00-87TS2B   .....A.....
00-87TS2C   A.....A.....
04-372TS2A  .....CA.....A..G.....T..
04-372TS2B  .....CA.....
04-372TS2C  .....A.....A..G.....
04-372TS2D  .....CA.....

```

```

                2720      2730      2740      2750      2760
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AGAGTCTTTCCTTCGCGCGGGGTGCATGCGTGGCCATTATAACCGTGGATA
00-87TS2A   .....A.....G.....
00-87TS2B   ..A.....A.....A.....G.....C..
00-87TS2C   .....C..A.....A.....G.....
04-372TS2A  ..A.....A.....T...A.....T..G..A.....C..
04-372TS2B  ..A..C.....A..A.....T...A.....G..A.....C..
04-372TS2C  ..A.....A.....T...A.....T..G..A.....C..
04-372TS2D  ..A..C.....A..A.....T...A.....G..A.....C..

```

```

                2770      2780      2790      2800      2810
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ACTCAGCTTCCACCAAGAAATAAGGATAAGCTATTTACAGTGTGGAAGATC
00-87TS2A   ..C.....C.....G.....
00-87TS2B   .....GG..G.....
00-87TS2C   .....GG.....G.....
00-87TS2C   .....TG.....G.....
04-372TS2A  ..G.....G..G..A.....G..G.....
04-372TS2B  .....GT..G..G..C.....G..CG..G.....
04-372TS2C  .....GG..GC.....G..G.....
04-372TS2D  .....GT..G.....C.....G..CG..G.....

```

```

                2820      2830      2840      2850      2860
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      A C T T A T A A A G A T A C T G T C C A G T T A C G G A G G A A A T T G G A G T T C T T C A C C T A
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....G.....
04-372TS2A  .....C.A.T..C...A.....T.....
04-372TS2B  ..C.....C.....A.....
04-372TS2C  .....C.A.T..C...A.....T.....
04-372TS2D  ..C.....C...T.....T.....

```

```

                2870      2880      2890      2900      2910
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      T T C T A G A T T T G A T A T G G A A T T T A C C T T T G T G G T T A C T G C A A A T T T C A C T G
00-87TS2A   .....C.....
00-87TS2B   ..C...C.C.....
00-87TS2C   ..C.....C.....
04-372TS2A  ..C...C.C.....A.....
04-372TS2B  C..C...C.C.....T.....
04-372TS2C  C..C...C.C.....T.....A.....
04-372TS2D  C..C...C.C.....T.....A.....

```

```

                2920      2930      2940      2950      2960
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      A G A C T A A C A A T G G G C A T G C C T T A A A T C A A G T G T A C C A A A T T A T G T A C G T A
00-87TS2A   .....G.....
00-87TS2B   .....G.....
00-87TS2C   .....G.....
04-372TS2A  .A.....C.....C.....G.....
04-372TS2B  .....C.....G.....
04-372TS2C  .A.....C.....C.....G.....
04-372TS2D  .A.....C.....C.....G.....

```

```

                2970      2980      2990      3000      3010
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      C C A C C A G G C G C T C C A G T G C C C G A G A A A T G G G A C G A C T A C A C A T G G C A A A C
00-87TS2A   ..G.....A.G.....
00-87TS2B   .....A.G.....
00-87TS2C   .....G.....A.....
04-372TS2A  ..G.....C.....
04-372TS2B  ..G.....C.....
04-372TS2C  .....C.....T.....
04-372TS2D  .....C.....T.....

```

```

          3020      3030      3040      3050      3060
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      C T C A T C A A A T C C A T C A A T C T T T T A C A C C T A C G G A A C A G C T C C A G C C C G G A
00-87TS2A    .....
00-87TS2B    .....
00-87TS2C    .....
04-372TS2A   .....
04-372TS2B   .....
04-372TS2C   ..... T . G .
04-372TS2D   ..... T . G .

```

```

          3070      3080      3090      3100      3110
Sabin Typ 1  T C T C G G T A C C G T A T G T T G G T A T T T C G A A C G C C T A T T C A C A C T T T T A C G A C
Mahoney      .....
00-87TS2A    ..... A .....
00-87TS2B    ..... A ..... T .....
00-87TS2C    T . . A . . . . . C . . . . .
04-372TS2A   . . . A A . . . . . T . . . . . C . . . . T . . . .
04-372TS2B   . . . A A . . . . . T . . . . . C . . . . T . . . .
04-372TS2C   T . . A A . . . . . T . . . . . C . . . .
04-372TS2D   T . . A A . . . . . T . . . . . C . . . .

```

```

          3120      3130      3140      3150      3160
Sabin Typ 1  G G T T T T T C C A A A G T A C C A C T G A A G G A C C A G T C G G C A G C A C T A G G T G A C T C
Mahoney      .....
00-87TS2A    . . . C . . . . A . . . . . A . . . . .
00-87TS2B    . . . C . . . . A . . . . . A . . . . .
00-87TS2C    . . . . . A . . . . . A . . . . .
04-372TS2A   . . . C . . . . A . . . . . T . A G . A . . . . . G . C . . . .
04-372TS2B   . . . C . . . . A . . . . . T . A G . A . . . . . G . C . . . .
04-372TS2C   . . C . C . . . . A . . . . . A A . . . . . C . . . .
04-372TS2D   . . C . C . . . . A . . . . . A A . . . . . C . . . .

```

```

          3170      3180      3190      3200      3210
Sabin Typ 1  C C T C T A T G G T G C A G C A T C T C T A A A T G A C T T C G G T A T T T T G G C T G T T A G A G
Mahoney      . . . T . . . . .
00-87TS2A    .....
00-87TS2B    .....
00-87TS2C    ..... G .....
04-372TS2A   ..... C . C .....
04-372TS2B   ..... C . C .....
04-372TS2C   ..... C . G .....
04-372TS2D   ..... C . G .....

```



```

          3220      3230      3240      3250      3260
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TAGTCAATGATCACAACCCGACCAAGGTCACTCCAAAAATCAGAGTGAT
00-87TS2A    .....T.....C.....T.....
00-87TS2B    .....T.....
00-87TS2C    .....T.....
04-372TS2A   .....C.....A.....T.....
04-372TS2B   .....C.....A.....T.....
04-372TS2C   .....C.....A.....T.....
04-372TS2D   .....C.....A.....T.....

```

```

          3270      3280      3290      3300      3310
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CTAAAACCCAAACACATCAGAGTCTGGTGCCCGCTCCACCGAGGGCAGT
00-87TS2A    .....G.....A.....
00-87TS2B    .....G.....A...A...
00-87TS2C    .....T.....A.....
04-372TS2A   .....T.....A...A...
04-372TS2B   .....T.....A...A...
04-372TS2C   .....G.....G.....A.....
04-372TS2D   .....G.....G.....A.....

```

```

          3320      3330      3340      3350      3360
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      GGCGTACTACGGCCCTGGAGTGGATTACAAGGATGGTACGCTTACACCCC
00-87TS2A    .....T.....
00-87TS2B    .....T.....C.....
00-87TS2C    .T.....C.....
04-372TS2A   .T.A..T...T...A.....T...
04-372TS2B   .T.A..T...T...A.....T...
04-372TS2C   .T.A...T..A.....C.....
04-372TS2D   .T.A...T..A.....C.....

```

```

          3370      3380      3390      3400      3410
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TCTCCACCAAGGATCTGACCACATATGGATTTCGGACACCAAAACAAAGCG
00-87TS2A    .TC...T...A...G.....G...
00-87TS2B    .TC...T...A...G.....G...
00-87TS2C    .C...T...C.....C.....
04-372TS2A   .TC...T..A...T...T...G...G..A
04-372TS2B   .TC...T..A...T...T...G...G..A
04-372TS2C   .TC...T...T...T...G...G..A
04-372TS2D   .TC...T...T...T...G...G..A

```

```

          3420      3430      3440      3450      3460
Sabin Typ 1  G T G T A C A C T G C A G G T T A C A A A A T T T G C A A C T A C C A T T T G G C C A C T C A G G A
Mahoney      .....C.....
00-87TS2A   .....T.....
00-87TS2B   .....C.....T.....
00-87TS2C   .....G.....
04-372TS2A  .....C.....T.....C.....C.....
04-372TS2B  .....C.....T.....C.....C.....
04-372TS2C  .....T.....C.....C.....
04-372TS2D  .....T.....C.....C.....

```

```

          3470      3480      3490      3500      3510
Sabin Typ 1  A G A T T T G C A A A A C G C A G T G A A C G T C A T G T G G A A T A G A G A C C T C T T A G T C A
Mahoney      T.....G.....
00-87TS2A   .....G.....T.....G.....
00-87TS2B   .....G.....
00-87TS2C   .....G.....
04-372TS2A  G..C.A.....T.....T.....G.C.....T..GA..
04-372TS2B  G..C.A.....T.....T.....G.C.....T..GA..
04-372TS2C  G...A.....T.....G.C.....T..G...
04-372TS2D  G...A.....T.....G.C.....T..G...

```

```

          3520      3530      3540      3550      3560
Sabin Typ 1  C A G A A T C A A G A G C C C A G G G C A C C G A T T C A A T C G C A A G G T G C A A T T G C A A C
Mahoney      .....
00-87TS2A   .....T.....T.....G.....
00-87TS2B   .....A.....T.....A.....
00-87TS2C   .....A.....T.....A.....
04-372TS2A  ...G.....T.....C.G.....G.....
04-372TS2B  ...G.....T.....C.G.....G.....
04-372TS2C  ...G.....T.....T.C.G.....G.....
04-372TS2D  ...G.....T.....T.C.G.....G.....

```

```

          3570      3580      3590      3600      3610
Sabin Typ 1  G C A G G G G T G T A C T A C T G C G A G T C T A G A A G G A A A T A C T A C C C A G T A T C C T T
Mahoney      .....
00-87TS2A  A...A...T.....
00-87TS2B  .....
00-87TS2C  .....
04-372TS2A  A...A.A...T.....G.....G.T...
04-372TS2B  A...A.A...T.....G.....G.T...
04-372TS2C  A...A.A...T.....G.....G.....
04-372TS2D  A...A...T.....G.T.....G.....

```

```

          3620      3630      3640      3650      3660
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CGTTGGCCCAACGTTCCAGTACATGGAGGCTAATAACTATTACCCAGCTA
00-87TS2A   ...C... ..G.T.C...
00-87TS2B   ...T... ..G.T...
00-87TS2C   ...T... ..G.T...
04-372TS2A  ...C... ..G.T...T...
04-372TS2B  ...G.T...T...
04-372TS2C  ...A...T... ..G.T...
04-372TS2D  ...G.T...

```

```

          3670      3680      3690      3700      3710
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      GGTACCAGTCCCATATGCTCATTGGCCATGGATTTCGCATCTCCAGGGGAT
00-87TS2A   ...
00-87TS2B   ...
00-87TS2C   ...
04-372TS2A  .A... ..C... ..G...C
04-372TS2B  .A... ..C... ..G...C
04-372TS2C  ...T.A... ..
04-372TS2D  ...C... ..C...

```

```

          3720      3730      3740      3750      3760
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TGTGGTGGCATACTCAGATGTCACCACGGGGTGATAGGGATCATTACTGC
00-87TS2A   ...G...
00-87TS2B   ...G... ..C...
00-87TS2C   ...G... ..C...
04-372TS2A  ...G...T... ..A...
04-372TS2B  ...G...T... ..A...
04-372TS2C  ...G...A...
04-372TS2D  ...G...A...

```

```

          3770      3780      3790      3800      3810
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TGGTGGAGAAGGGTTGGTTGCATTTACAGACATTAGAGACTTGTATGCC
00-87TS2A   ...C... ..T...
00-87TS2B   C... ..T... ..C...
00-87TS2C   ...T...T...
04-372TS2A  ...T... ..C... ..T...
04-372TS2B  ...T... ..C... ..T...
04-372TS2C  ...T...
04-372TS2D  ...T... ..C...

```

```

          3820      3830      3840      3850      3860
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ACGAAGAAGAAGCCATGGAAACAAGGCATCACCAATTACATAGAGTCACCTT
00-87TS2A   .....A.G.
00-87TS2B   .....G.
00-87TS2C   .....G.
04-372TS2A  ...G.....G.....T.....C.....A.G.
04-372TS2B  ...G.....G.....T.....C.....A.G.
04-372TS2C  .....C.....A.G.
04-372TS2D  .....T.....C.....A.G.

```

```

          3870      3880      3890      3900      3910
Sabin Typ 1  GGGGCCGCATTTGGAAGTGGAATTACTCAGCAGATTGGAGACAAAATAAC
Mahoney      .....A.C.
00-87TS2A   .....T.
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  .....G.....C.....T.
04-372TS2B  .....G.....C.....T.
04-372TS2C  .....G.....C.....G.T.
04-372TS2D  .....C.

```

```

          3920      3930      3940      3950      3960
Sabin Typ 1  AGAGTTGACTAATATGGTGACCAGTACCATCACTGAAAAGCTACTTAAGA
Mahoney      .....C.
00-87TS2A   .....C.....C.
00-87TS2B   .....C.
00-87TS2C   .....C.
04-372TS2A  .....C.GC.....G.A.....C.
04-372TS2B  .....C.GC.....G.A.....C.
04-372TS2C  .....C.GC.....A.....C.
04-372TS2D  .....C.GC.....A.....C.

```

```

          3970      3980      3990      4000      4010
Sabin Typ 1  ACTTGATCAAGATCATATCCTCAGTTATTATAACTAGGAATTATGAA
Mahoney      .....C.
00-87TS2A   .....A.
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  .....A.....C.....C.
04-372TS2B  .....A.T.....C.....C.
04-372TS2C  .T.....A.....C.....C.....A.....C.G
04-372TS2D  .....A.....A.....C.

```

```

          4020          4030          4040          4050          4060
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      GACACCACAACAGTGTCTCGCTACCCCTGGCCCTTCTTGGGTGTGATGCTTC
00-87TS2A    .....C.....AT...
00-87TS2B    .....C.....AT...
00-87TS2C    .....C.....AT...
04-372TS2A   .....A..C..AT...
04-372TS2B   .....A..C..CAT...
04-372TS2C   .....C.....T..A...AT...
04-372TS2D   .....C.....T..A...AT...

```

```

          4070          4080          4090          4100          4110
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ACCATGGCAGTGGCTTAGAAAGAAAGCATGCCATGTTCTGGAGATACCTT
00-87TS2A    G.....A.....
00-87TS2B    .....A.....
00-87TS2C    .....A.....
04-372TS2A   .....AG.....CA...
04-372TS2B   .....A.....CA...
04-372TS2C   .....A.....T..A...
04-372TS2D   .....A.....T..A...

```

```

          4120          4130          4140          4150          4160
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ATGTCACCAAGCAAGGTGACAGTTGGTTGAAGAAGTTTACTGAAGCATGC
00-87TS2A    .....T.....C...
00-87TS2B    .....T.T.....C...
00-87TS2C    .....T.T.....
04-372TS2A   .....T.....C..C...C...
04-372TS2B   .....T.....C...C...
04-372TS2C   .....T.T.....C...
04-372TS2D   .....T.T.....C...G...

```

```

          4170          4180          4190          4200          4210
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AACGCAGCTAAGGGACTGGAGTGGGTGTCAAACAAAATCTCAAAATTCAT
00-87TS2A    .....A.....T...
00-87TS2B    .....A.....
00-87TS2C    .....A.....
04-372TS2A   T.....A..A.....T...GG...
04-372TS2B   T.....A..A.....T...GG...
04-372TS2C   .....C.....A...A...T...
04-372TS2D   .....C.....A.....T...

```

```

                4220      4230      4240      4250      4260
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TGA TTGGCTCAAGGAGAAAA TTATCCCAAGCTAGAGATAAGTTGGAA T
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....T.....
00-87TS2C   .....T.....
04-372TS2A  .....C.....G.....G.
04-372TS2B  .....C.....G.....G.
04-372TS2C  .....C.....
04-372TS2D  .....C.....

```

```

                4270      4280      4290      4300      4310
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TTGTAACAAAACCTTAGACAAC TAGAAATGCTGGAAAACCAAATCTCAACT
00-87TS2A   .....G.....T.....
00-87TS2B   .....G.....T.....T.....
00-87TS2C   .....T.....
04-372TS2A  .....A.....T.....
04-372TS2B  .....A.....T.....
04-372TS2C  .....AG.....T.....
04-372TS2D  .....AG.....T.....

```

```

                4320      4330      4340      4350      4360
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ATACACCAATCATGCCCTAGTCAGGAACACCAGGAAATTCATTCAATAA
00-87TS2A   .....A.....
00-87TS2B   .....A.....
00-87TS2C   .....A.....
04-372TS2A  .....A.G.....A.....C.
04-372TS2B  .....A.G.....A.....C.
04-372TS2C  ..T.....G..T.....C.....T.....G..T.G.....
04-372TS2D  ..T.T.....G..T.....T.....G..T.G.....

```

```

                4370      4380      4390      4400      4410
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TGT CAGATGGTTATCCATCCAGTCTAAGAGGTTTGCCCTCTTTACGCAG
00-87TS2A   C.....
00-87TS2B   C.....
00-87TS2C   C.....
04-372TS2A  C.....G.....T.A.C.A.....C.
04-372TS2B  C.....G.....T.A.C.A.....C.
04-372TS2C  C.....G.....T.....C.....A.....T.....
04-372TS2D  C.....G.....T.....C.....A.....T.....

```

```

          4420      4430      4440      4450      4460
Sabin Typ 1  TGGAAAGCCAAAAGAAATACAGAAACTAGAGCATACCATTAACCAACTACATA
Mahoney      .....T.....
00-87TS2A   .....T.....
00-87TS2B   .....T.....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  .....T.....G..T..C..C.....
04-372TS2B  .....T.....G..T..C..C.....
04-372TS2C  .....T.G.....T..C..A..C.....
04-372TS2D  .....G.....GG..T..C.....

```

```

          4470      4480      4490      4500      4510
Sabin Typ 1  CAGTTCAAGAGCAAACACCGTATTGAACCAGTATGTTTGCTAGTACATGG
Mahoney      .....
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  .....C..AT.....
04-372TS2B  .....C..AT.....
04-372TS2C  .....C..AT.....
04-372TS2D  .....C.....

```

```

          4520      4530      4540      4550      4560
Sabin Typ 1  CAGCCCCGGAACAGGTAAATCTGTAGCAACCAACCTGATTGCTAGAGCCA
Mahoney      .....
00-87TS2A   .....T.....
00-87TS2B   .....T.....G.....
00-87TS2C   .....T..C.....
04-372TS2A  T...T...C.....T.....
04-372TS2B  T...T...C.....T.....
04-372TS2C  T...T.....T.....
04-372TS2D  T.....

```

```

          4570      4580      4590      4600      4610
Sabin Typ 1  TAGCTGAAAGAGAAAACACGTCCACGTACTCGCTACCCCCGGATCCATCA
Mahoney      .....
00-87TS2A   .....C...G
00-87TS2B   .....C...G
00-87TS2C   .....C...G
04-372TS2A  .....G
04-372TS2B  .....C...G
04-372TS2C  .....A.....C...G
04-372TS2D  .....T...C...G

```

```

          4620      4630      4640      4650      4660
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CACTTCGACGGATACAAACAACAGGGAGTGGTGTATTATGGACGACCTGAA
00-87TS2A    .....
00-87TS2B    .....
00-87TS2C    .....G.....
04-372TS2A   .....T.....G.....A.....A.....
04-372TS2B   .....T.....G.....
04-372TS2C   .....T.....G..T.....
04-372TS2D   .....G.....G.....

```

```

          4670      4680      4690      4700      4710
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TCAAACCCAGATGGTGC GGACATGAAGCTGTTCTGTCAGATGGTATCAA
00-87TS2A    .....T.....C.....
00-87TS2B    .....C.....C.....
00-87TS2C    .....T.....C.....C.....
04-372TS2A   .....A..T.....C.....
04-372TS2B   .....A..T.....T..C.....
04-372TS2C   .....A..T.....C..A.....G.....
04-372TS2D   .....A..T.....T..C.....

```

```

          4720      4730      4740      4750      4760
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CAGTGGAGTTTATACCACCCATGGCATCCCTGGAGGAGAAAGGAATCCCTG
00-87TS2A    .....
00-87TS2B    .....T..A.....
00-87TS2C    .....
04-372TS2A   .....A..C.....A..G.....
04-372TS2B   .....A..C.....A..G.....
04-372TS2C   .....A.....T.....
04-372TS2D   .....A..C.....A..G.....

```

```

          4770      4780      4790      4800      4810
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TTTACTTCAAATTACGTTCTAGCATCCACGAACTCAAGCAGAAATTTCCCC
00-87TS2A    .....A.....
00-87TS2B    .....C.....T.....
00-87TS2C    .....T.....
04-372TS2A   ..C.....C..T..T.....T.....T.....C.....
04-372TS2B   ..C.....C..T..T.....T.....T.....C.....
04-372TS2C   ..C.....C.....T..A.....T.....C.....
04-372TS2D   ..C.....C.....T..A.....C.....

```



```

          4820      4830      4840      4850      4860
    Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney         CCCCAC TGTGGC ACACAG TGA TGCATT AGCCAG GCGCTT TGC GTTCGACA
00-87TS2A      .....
00-87TS2B      ..... T .....
00-87TS2C      .. T ..... A .....
04-372TS2A     ..... C ..... C ..... G ..... A ..... T ..... G
04-372TS2B     ..... C ..... T ..... G ..... A ..... T ..... G
04-372TS2C     .. T ..... C ..... T ..... T .....
04-372TS2D     .. T ..... C ..... T ..... T .....

```

```

          4870      4880      4890      4900      4910
    Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney         TGGACATT CAGGTC ATGAAT GAGTATT C TAGAGAT GGGAAAT TGAACATG
00-87TS2A      ..... C ..... G .....
00-87TS2B      ..... G ..... G .....
00-87TS2C      ..... G ..... C ..... G .....
04-372TS2A     ..... C ..... G ..... G .....
04-372TS2B     .. T ..... C ..... G ..... A ..... G .....
04-372TS2C     ..... G ..... A ..... C ..... A ..... G .....
04-372TS2D     ..... G ..... A ..... A ..... G .....

```

```

          4920      4930      4940      4950      4960
    Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney         GCCATGGCTACTGAAATGTGTAAGA AACTGTCACCAACCAGCAAAC TTTAA
00-87TS2A      .....
00-87TS2B      .....
00-87TS2C      .....
04-372TS2A     ..... C .....
04-372TS2B     .....
04-372TS2C     ..... C ..... G ..... C .....
04-372TS2D     ..... C ..... G .....

```

```

          4970      4980      4990      5000      5010
    Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney         GAGATGCTGTCC TTTAGTGTGTGGTAAGGCAATTCAA TTAATGGACAAAT
00-87TS2A      ..... C .....
00-87TS2B      ..... G .....
00-87TS2C      ..... A ..... T .....
04-372TS2A     ..... A ..... G .....
04-372TS2B     ..... A ..... A ..... C ..... G .....
04-372TS2C     .....
04-372TS2D     ..... G .....

```

```

          5020      5030      5040      5050      5060
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CTTCCAGAGTTAGATACAGTATTGACCAGATCACTACAATGATTATCAAT
00-87TS2A   .C..T.....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....C.....T...
04-372TS2A  .C.....G.....
04-372TS2B  .C.....G.....G.....
04-372TS2C  .C.....C.....G.....
04-372TS2D  .CA.....C.....C.....G.....

```

```

          5070      5080      5090      5100      5110
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      GAGAGAAACAGAAGATCCAACATTGGCAATTGTATGGAGGCTTTGTCCA
00-87TS2A   .....T...
00-87TS2B   .....C...
00-87TS2C   ...G.....C...
04-372TS2A  .....T.....C...
04-372TS2B  .....T.....C...
04-372TS2C  .....G..T...T...C...C...
04-372TS2D  .....G..T...T...C...C...

```

```

          5120      5130      5140      5150      5160
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AGGACCACCTCCAGTATAAAGACTTGAAGATTGACATCAAGACGAGTCCCC
00-87TS2A   .....A.....
00-87TS2B   .....A..C.....
00-87TS2C   .....C.....
04-372TS2A  .....C.....
04-372TS2B  .....C.....
04-372TS2C  .....C.....
04-372TS2D  .....T.....

```

```

          5170      5180      5190      5200      5210
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CTCCCTGAATGTATCAATGACTTGTCCAAGCAGTTGACTCCCAGGAGGTG
00-87TS2A   .....C.....
00-87TS2B   .....C..T.....
00-87TS2C   .....T.....
04-372TS2A  .....G.....C.....G.....T...
04-372TS2B  .....G.....C.....T...
04-372TS2C  .....C.....A.....
04-372TS2D  .....C.....C.....

```

```

          5220      5230      5240      5250      5260
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AGAGATTACTGTGAGAAGAAGGGTTGGATAGTCAACATCACCAGCCAGGT
00-87TS2A   .....T.....
00-87TS2B   .....C.....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  C.....T.....
04-372TS2B  C.....T.....
04-372TS2C  .....
04-372TS2D  .....

```

```

          5270      5280      5290      5300      5310
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TCAAACAGAAAGGAACATCAACAGGGCAATGACAATTCTACAAGCGGTGA
00-87TS2A   .....A.....
00-87TS2B   .....G..A.....A..
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  .....A.....T.....CT..
04-372TS2B  .....A.....T.....T.....
04-372TS2C  .....G..A.....G.....A...
04-372TS2D  .....G..A.....A.....

```

```

          5320      5330      5340      5350      5360
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CAACCTTCGCCGCAGTGGCTGGAGTTGTCTATGTCATGTATAAACTGTTT
00-87TS2A   .....T.....
00-87TS2B   .....C.....
00-87TS2C   .....C.....A...
04-372TS2A  .....T.....A.....T.....
04-372TS2B  .....T.....A.....T.....
04-372TS2C  .....T.....A.....T.....C
04-372TS2D  .....T.....A.....T.....

```

```

          5370      5380      5390      5400      5410
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      GCTGGACACCAGGGAGCATACACTGGTTTACCAAACAACCAACCGT
00-87TS2A   .....C.....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....C..G..G..
04-372TS2A  .....T.....C.....
04-372TS2B  .....T.....C.....
04-372TS2C  .....C.....T.....
04-372TS2D  .....C.....

```

```

          5420      5430      5440      5450      5460
Sabin Typ 1  GCCCACCATTTAGGACAGCAAAGGTACAAGGGCCAGGGTTTCGATTACGCAG
Mahoney      .....C.....A.....
00-87TS2A   .....A.....T.....
00-87TS2B   ..A.....A.....T.....
00-87TS2C   .....A.....T.....
04-372TS2A  .....C.....G.....A.....T.....
04-372TS2B  .....C.....G.....A.....T.....
04-372TS2C  .T.....C.....G.....A.....T.....
04-372TS2D  .....G.....A.....T.....

```

```

          5470      5480      5490      5500      5510
Sabin Typ 1  TGGCTATGGCTAAAAGAAACATTGTTACAGCAACTACTAGCAAGGGAGAG
Mahoney      .....
00-87TS2A   .....A.....A.....
00-87TS2B   .....A.....A.....
00-87TS2C   .....T.....A.....
04-372TS2A  ...C...C.....C.C...C.A...A...
04-372TS2B  ...C...C.....C.C...C.A...A...
04-372TS2C  ...C...C.....C.C...C.A...A...
04-372TS2D  ...C...C.....C.C...A...A...

```

```

          5520      5530      5540      5550      5560
Sabin Typ 1  TTCACCTATGTTAGGAGTCCACGACAACGTGGCTATTTTACCAACCCACGC
Mahoney      .....
00-87TS2A   .....T.....
00-87TS2B   .....T.....
00-87TS2C   .....T.T.....
04-372TS2A  .....C.....T.T.....T.....
04-372TS2B  .....C.....T.T.....T.....
04-372TS2C  .....C.....T.T.T.....T.T.....
04-372TS2D  .....C...G...T.T.T.....T.T.....

```

```

          5570      5580      5590      5600      5610
Sabin Typ 1  TTCACCTGGTGAAAGCATTGTGATCGATGGCAAAGAAGTGGAGATCTTGG
Mahoney      .....
00-87TS2A   .....A.....A.....
00-87TS2B   .....A.....A.....
00-87TS2C  C.....
04-372TS2A  .....G.....T.....A.....
04-372TS2B  .....G.....T.....A.....
04-372TS2C  .....A.....A.....
04-372TS2D  .....A.....A.....

```

```

          5620      5630      5640      5650      5660
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ATGCCAAAGCGCTCGAAGATCAAGCAGGAACCAATCTTGAAATCACTATA
00-87TS2A   .C. .... .C.
00-87TS2B   .C. ....G. ....C.
00-87TS2C   ...T. ....C. ....C.
04-372TS2A  .C. .... .C.
04-372TS2B  .C. ....C. ....C.
04-372TS2C  .C. ....T. ....T. ....C. T
04-372TS2D  .C. ....T. ....C. ....C. T

```

```

          5670      5680      5690      5700      5710
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ATCACTCTAAAGAGAAATGAAAAGTTCAGAGACATTAGACCACATATACC
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   ..T. ....C. G.
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  ...C. G. ....G. ....C. G. ....C.
04-372TS2B  ...G. ....G. ....C. G. ....C.
04-372TS2C  ...G. A. ....G. ....C.
04-372TS2D  ...G. A. ....G. ....C.

```

```

          5720      5730      5740      5750      5760
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TACTCAAATCACTGAGACAAATGATGGAGTCTTGATCGTGAACACTAGCA
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  C. ....T. ....T. ....T.
04-372TS2B  C. ....T. ....T.
04-372TS2C  C. ....T. ....T.
04-372TS2D  C. ....T.

```

```

          5770      5780      5790      5800      5810
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AGTACCCCAAATATGTATGTTCCGTGTCGGTGTGTGACTGAACAGGGATAT
00-87TS2A   .....C. ....T. ....C.
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....C.
04-372TS2A  .....C. ....C. C.
04-372TS2B  .....C. ....C.
04-372TS2C  .....C. ....C.
04-372TS2D  .....C. ....C.

```

```

          5820      5830      5840      5850      5860
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      C.TAAATCTCGGTGGGCGCCAAACTGCTCGTACTCTAATGTACAACCTTTCC
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  T.G.....T.
04-372TS2B  T.G.....T.
04-372TS2C  T.G.....
04-372TS2D  T.G.....

```

```

          5870      5880      5890      5900      5910
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AACCCAGAGCAGGACAGTGTGGTGGAGTCATCACATGTACTGGGAAAGTCA
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  ...C.....C.....G.C.....
04-372TS2B  ...C.....G.C.....
04-372TS2C  ...C.....G.C.....
04-372TS2D  ...G.C.....

```

```

          5920      5930      5940      5950      5960
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TCGGGATGCATGTTGGTGGGAACGGTTCACACGGGTTTGCAGCGGCCCTG
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....T.....
04-372TS2A  .....
04-372TS2B  .....
04-372TS2C  .....
04-372TS2D  .....

```

```

          5970      5980      5990      6000      6010
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AAGCGATCATACTTCACTCAGAGTCAAGGTGAAATCCAGTGGATGAGACC
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....A.A.....A.....
04-372TS2A  .....A.....A.T.....
04-372TS2B  .....A.A.....A.T.....
04-372TS2C  .....A.A.....A.T.....
04-372TS2D  .....A.A.....A.T.....

```

```

          6020      6030      6040      6050      6060
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TTCGAAGGAAGTGGGATATCCAATCATAAATGCCCCGTCCAAAACCAAGC
00-87TS2A   .....A.....T.....
00-87TS2B   .....A.....T.....
00-87TS2C   .....G.....A.....
04-372TS2A  ...A.....A.C...T.A...T...
04-372TS2B  ...A.....A.T...T.A...T...
04-372TS2C  ...A.....A.T...T.A...T...
04-372TS2D  ...A.....A.T...T.A...T...

```

```

          6070      6080      6090      6100      6110
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TTGAACCCAGTGC TTTCCACTATGTGTTTGAAGGGGTGAAGGAACCAGCA
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  .....C.....A.....
04-372TS2B  .....C.....A.....
04-372TS2C  .....C.....A.....
04-372TS2D  .....C.....A.....

```

```

          6120      6130      6140      6150      6160
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      GTCCTCAC TAAAAACGATCCCAGGCTTAAGACAAACTTTGAGGAGGCAAT
00-87TS2A   .....G.....
00-87TS2B   .....C.....G.....
00-87TS2C   .....C.....G.....
04-372TS2A  ...A.....T.....AGT.G...
04-372TS2B  ...A.....T.....C.GT.G...
04-372TS2C  ...G.....T.....C.GT.G...
04-372TS2D  ...A.....T.....C.GT.G...

```

```

          6170      6180      6190      6200      6210
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TTTCTCCAAGTACG TGGGTAACAAAATTACTGAAGTGGATGAGCACATGA
00-87TS2A   .....T.....
00-87TS2B   .....T.....
00-87TS2C   .....T.....
04-372TS2A  .....T.....
04-372TS2B  C.....T.....
04-372TS2C  .....T.....
04-372TS2D  .....T.....T.....

```

```

          6220      6230      6240      6250      6260
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AAGAGGCAGTAGACCACCTATGCTGGCCAGCTCATGTCACCTAGACATCAAC
00-87TS2A   .....T
00-87TS2B   .....T
00-87TS2C   .....G.....G.....G
04-372TS2A  .....A.....T
04-372TS2B  .....G.....T
04-372TS2C  .....T.....
04-372TS2D  .....G.....T

```

```

          6270      6280      6290      6300      6310
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ACAGAACAATGTGCTTGGAGGATGCCATGTATGGCACTGATGGTCTAGA
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....G
04-372TS2A  .....A.....
04-372TS2B  .....
04-372TS2C  .....
04-372TS2D  .....

```

```

          6320      6330      6340      6350      6360
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AGCAC TTGATTTG TCCACCAGTGC TGGCTACCCTTATGTAGCAATGGGAA
00-87TS2A   .....C.G
00-87TS2B   .....C.G
00-87TS2C   .....C.G
04-372TS2A  G.....T.T.....G
04-372TS2B  G.....T.T.....G
04-372TS2C  G.....T.T.....G
04-372TS2D  G.....T.T.....G

```

```

          6370      6380      6390      6400      6410
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AGAAGAAGAGAGATATCTTGAACAAACAAACCAGAGACACTAAGGAAATG
00-87TS2A   .....C.....
00-87TS2B   .....A.....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  .....C.....C
04-372TS2B  .....C.....C
04-372TS2C  .....C.....C
04-372TS2D  .....C.....

```



```

          6420      6430      6440      6450      6460
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CAAAAACTGCTCGACACATATGGAATCAACCTCCCAC TGGTGACTTATGT
00-87TS2A    .....T.....
00-87TS2B    .....T.T.....A.....
00-87TS2C    .....
04-372TS2A   ...GGT.A...T...T...G...C...
04-372TS2B   ...GGT.A...T...T...T...
04-372TS2C   ...GGT.A...T...T...T...
04-372TS2D   ...GGT.A...T...T...C...

```

```

          6470      6480      6490      6500      6510
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AAAGGATGAAC TTAGATCCAAAACAAAGGTTGAGCAGGGGAAATCCAGAT
00-87TS2A    .....G.....G.....AT.....G.
00-87TS2B    .....T.....AT.....
00-87TS2C    .....A.....
04-372TS2A   .....G...T...G...GCA.....
04-372TS2B   .....G...T...G...C...GTA.....
04-372TS2C   .....G...T...G...C...GCA.....
04-372TS2D   .....G...T...G...GC.....C

```

```

          6520      6530      6540      6550      6560
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      TAATTGAAGCTTCTAGTTTGAATGACTCAGTGGCAATGAGAATGGCTTTT
00-87TS2A    .....
00-87TS2B    .....
00-87TS2C    .....
04-372TS2A   .....C...
04-372TS2B   .....C...
04-372TS2C   .....C...
04-372TS2D   .....C.C.....C...

```

```

          6570      6580      6590      6600      6610
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      GGGAACCTATATGCTGCTTTTCACAAAACCCAGGAGTGATAACAGGTTTC
00-87TS2A    .....C.....G...
00-87TS2B    .....C.....G...
00-87TS2C    .....G...
04-372TS2A   ...T...G...G.G...
04-372TS2B   ...T...G...G.G...
04-372TS2C   ...T...G...G.G...
04-372TS2D   ...T...C.C...G...G.G...

```

```

          6620      6630      6640      6650      6660
    Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney         AGCAGTAGGGTGCATCCAGATTTGTTTTGGAGCAAAATTCCGGTATTGA
00-87TS2A      .....G.....
00-87TS2B      .....T.....
00-87TS2C      .....C.....
04-372TS2A     .....T.....G.....GC..
04-372TS2B     .....T.C.....G.....G...
04-372TS2C     .....T.....G.....GC..
04-372TS2D     .....T.....G.....G...

```

```

          6670      6680      6690      6700      6710
    Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney         TGAAGAGAAGCTGTTTGCCTTGACTACACAGGGTATGATGCATCTCTC
00-87TS2A      .....T.....G.....
00-87TS2B      .....C.....
00-87TS2C      .....G.....
04-372TS2A     .....G.....C...
04-372TS2B     .....G.....C...
04-372TS2C     .....G.....C...
04-372TS2D     .....G.....C...

```

```

          6720      6730      6740      6750      6760
    Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney         AGCCCTGCTTGGTTCGAGGCCACTAGAGATGGTGCTTGAGAAAATCGGATT
00-87TS2A      .....A.....
00-87TS2B      .....A.....A.....
00-87TS2C      .....A.....T.....
04-372TS2A     .....A.....T...
04-372TS2B     .....A.....C...
04-372TS2C     .....A.....C...
04-372TS2D     .....A.....T...

```

```

          6770      6780      6790      6800      6810
    Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney         CGGAGACAGAGTTGACTACATCGACTACCTAAACCACTCACACCACCTGT
00-87TS2A      .....T.T.....
00-87TS2B      .....T.T.....A...
00-87TS2C      .....T.T.....A...
04-372TS2A     T.....T.....T.G.....A...
04-372TS2B     T.....T.....T.G.....A...
04-372TS2C     T.....T.....T.G.....
04-372TS2D     T.....T.....T.....A...

```

```

          6820      6830      6840      6850      6860
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ACAAGAATAAAACATACTGTGTCAAGGGCGGTATGCCATCTGGTTGCTCA
00-87TS2A   .....C.....
00-87TS2B   .....C.....
00-87TS2C   .....C.....
04-372TS2A  .....C.....C.....C.....
04-372TS2B  .....C.....C.....C.....
04-372TS2C  .....C.....C.....C.....G
04-372TS2D  .....C.....C.....C.....

```

```

          6870      6880      6890      6900      6910
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      GGCACCTTCAATTTTAACTCAATGATTAAACAACCTTGATTATCAGGACACT
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....C.....C.....
04-372TS2A  .....C.....
04-372TS2B  .....C.....A.....
04-372TS2C  .....C.....
04-372TS2D  .....C.....A.....

```

```

          6920      6930      6940      6950      6960
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CTTACTGAAAACCTACAAGGGCATAGATTTAGACCACCTAAAAATGATTG
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  .....G.....T.....
04-372TS2B  .....A.....G.....
04-372TS2C  .....G.....
04-372TS2D  .....

```

```

          6970      6980      6990      7000      7010
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CCTATGGTGATGATGTAATTGCTTCCACCCCATGAAGTTGACGCTAGT
00-87TS2A   .....T.....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....C.....T.....
04-372TS2A  .....C.....
04-372TS2B  .....C.....
04-372TS2C  .....C.....
04-372TS2D  .....C.....

```

```

          7020      7030      7040      7050      7060
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CTCC TAGCCCAA TCAGGAAAAGACTATGGACTAACTATGACTCCAGCTGA
00-87TS2A   .....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  .....
04-372TS2B  .....
04-372TS2C  .....
04-372TS2D  .....

```

```

          7070      7080      7090      7100      7110
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      CAAATCAGCTATATTTGAAACAGTCACATGGGAGAATGTAACATTCTTGA
00-87TS2A   .....C.....
00-87TS2B   T.....C.....
00-87TS2C   T.....C.....
04-372TS2A  .....C.....
04-372TS2B  .....CT.....
04-372TS2C  .....C.....
04-372TS2D  T.....C.....

```

```

          7120      7130      7140      7150      7160
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AGAGATTCTTCAGGGCAGACGAGAAATACCCATTTCTTATTCATCCAGTA
00-87TS2A   .....C.....
00-87TS2B   .....G.....
00-87TS2C   .....T.....T.....C.....
04-372TS2A  .....CG.....C.....
04-372TS2B  .....CG.....C.....
04-372TS2C  .....CG.....C.....
04-372TS2D  .....T.....CG.....C.....

```

```

          7170      7180      7190      7200      7210
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ATGCCAATGAAGGAAATTCATGAATCAATTAGATGGACAAAAGATCCCTAG
00-87TS2A   .....T.....
00-87TS2B   .....
00-87TS2C   .....
04-372TS2A  .....C.....
04-372TS2B  .....C.....
04-372TS2C  .....C.....
04-372TS2D  .....C.....

```

```

          7220      7230      7240      7250      7260
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
00-87TS2A   ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
00-87TS2B   ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
00-87TS2C   ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
04-372TS2A  A...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. G...|.
04-372TS2B  A...|. C...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. G...|.
04-372TS2C  A...|. C...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. G...|.
04-372TS2D  A...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. G...|.

```

```

          7270      7280      7290      7300      7310
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
00-87TS2A   ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
00-87TS2B   ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. C...|.
00-87TS2C   ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
04-372TS2A  ...|. ...|. ...|. C...|. ...|. ...|. ...|. ...|. T...|.
04-372TS2B  ...|. ...|. ...|. C...|. ...|. ...|. ...|. T...|. ...|. C...|.
04-372TS2C  ...|. ...|. ...|. C...|. ...|. ...|. ...|. T...|. ...|.
04-372TS2D  ...|. ...|. ...|. C...|. ...|. T...|. ...|. ...|. T...|. ...|. C...|.

```

```

          7320      7330      7340      7350      7360
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
00-87TS2A   ...|. ...|. ...|. C...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
00-87TS2B   ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
00-87TS2C   ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
04-372TS2A  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. G...|.
04-372TS2B  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. G...|.
04-372TS2C  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. G...|.
04-372TS2D  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. G...|.

```

```

          7370      7380      7390      7400      7410
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
00-87TS2A   ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
00-87TS2B   ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
00-87TS2C   ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
04-372TS2A  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
04-372TS2B  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. C...|.
04-372TS2C  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
04-372TS2D  ...|. ...|. G...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.

```

```

          7420      7430      7440
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...
Mahoney      T.....-
00-87TS2A   T.....-
00-87TS2B   T.....-
00-87TS2C   T.....-
04-372TS2A  T.....-
04-372TS2B  T.....-
04-372TS2C  T.....-
04-372TS2D  T.....-

```

8.1.3 TS3

```

          7280      7290      7300      7310      7320
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AACAAATTCCTAGCTAAAAATCAGGAGTGTGCCAATTGGAAGAGCTTTATT
00-87TS3    .....
04-372TS3    .....T.....C.....

```

```

          7330      7340      7350      7360      7370
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      GCTCCCAGAGTACTCAACATTGTACCGCCGTTGGCTTGACTCATTTTAGT
00-87TS3    .....
04-372TS3    .....G.....

```

```

          7380      7390      7400      7410      7420
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|. ...|.
Mahoney      AACCCACCTCAGTCGAATTGGATTGGGTCATACTGCTGTAGGGGTAAT
00-87TS3    .....T.....
04-372TS3    .....T.....T.....

```

```

          7430      7440
Sabin Typ 1  ...|. ...|. ...|. ...
Mahoney      TTTTCTTTAATTCGGAGG
00-87TS3    .....-
04-372TS3    .....-

```

8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1:** Darstellung eines vermutlich an der Poliomyelitis erkrankten Priesters.
- Abbildung 1-2:** Entwicklung der Erkrankungs- und Todesfallzahlen in West-Deutschland vor und nach Beginn der Impfungen mit OPV
- Abbildung 1-3:** Fortschritt der Wildvirus-Eradikation von 1988 bis August 2007
- Abbildung 1-4:** Berechnetes Modell der äußeren Oberfläche des Poliovirus Serotyp
- Abbildung 1-5:** Genomorganisation des Poliovirus Serotyp1 mit Darstellung der Sekundärstrukturen der 5'NCR und 3'NCR [Kitamura et al., 1981].
- Abbildung 1-6:** Sekundärstrukturmodell der 5'NCR
- Abbildung 5-1:** Poliovirus-Diagnostik-PCR (Sabin-spezifische Primer)
- Abbildung 5-2:** Schematische Darstellung der Erstellung der Totalsequenzen
- Abbildung 5-3:** Lokalisation der Sequenz-Fragmente von TS1 und TS2 im Bezug auf die Sabin Serotyp 1 -Sequenz
- Abbildung 5-4:** Alignment aus den Genomregionen 5'NCR (A) und VP1 (B)
- Abbildung 5-5:** Phylogenetische Analyse in der Region VP1-2A (Nt. 3296 bis 3445)
- Abbildung 5-6:** Phylogenetische Analyse der Teilstücke TS1 und TS2 beider Isolate
- Abbildung 5-7:** Spannbreiten der ermittelten genetischen Distanzen auf NS- und AS-Ebene
- Abbildung 5-8:** Verteilung der NS und AS-Mutationen im Bezug zu Sabin Typ 1 in den Regionen P1 bis P3 (Nt. 743 bis 7369)
- Abbildung 5-9:** Mutationen in dem kalkulierten Sekundärstrukturprofil der Region 5'NCR
- Abbildung 5-10:** Aminosäuresubstitutionen an den putativen neutralisierenden, antigenen Determinanten (NAg 1, 2, 3a, 3b)
- Abbildung 5-11:** Mutationen im kalkulierten Sekundärstrukturprofil der Region 3D/3'NCR des Isolates 04-372 (Nt.7289 – 7464 + 24 Adenin-Reste im 3'poly-A-Trakt)

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 5-1: ELISA – gemessene Extinktionswerte.

Tabelle 5-2: rct-Marker

Tabelle 5-3: Charakteristika der Klonsequenzen im Vergleich mit Sabin Typ 1

Tabelle 5-4: Paarweiser Sequenzvergleich der Klonsequenzen zu Sabin Typ 1 in der Region VP1 (% genetische Distanz)

Tabelle 5-5: Paarweiser Sequenzvergleich in der Region VP1-2A (Nt. 3296 - 3445) auf NS- und AS-Ebene (% Identität)

Tabelle 5-6: Paarweiser Sequenzvergleich auf NS- und AS-Ebene von TS1 (% Identität)

Tabelle 5-7: Paarweiser Sequenzvergleich auf NS- und AS-Ebene von TS2 (% Identität)

Tabelle 5-8: Anteil der mutierten Positionen je Genomregion (%)

Tabelle 5-9: AS-Mutationen zwischen Sabin Typ 1 und beiden Isolaten (TS1) in den Regionen VP2 und VP3

Tabelle 5-10: AS-Mutationen zwischen Sabin Typ 1 und beiden Isolaten (TS2) in der Region VP1

Tabelle 5-11: AS-Mutationen zwischen Sabin Typ 1 und beiden Isolaten in den Regionen P2 und P3

8.4 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AFP	<i>acute flaccid paralysis</i> (Akute schlaffe Lähmung)
as	antisense
AS	Aminosäure
C	Cytosin
CD	<i>cluster of differentiation</i> (zellulärer Differenzierungsmarker)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Zentrum für Krankheitskontrolle und Prävention)
CPE	<i>cytopathic effect</i> (zytopathischer Effekt)
cDNA	komplementäre DNA
cVDPV	<i>circulating VDPV</i> (zirkulierendes VDPV)
CVID	<i>common variable immunodeficiency syndrome</i> (variables Immundefektsyndrom)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
dNUTP	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und dUTP
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
bp	<i>basepair(s)</i> (Basenpaar(e))
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
Ig	Immunglobulin
IPV	Inaktivierte Poliovakzine
IRES	Internal ribosomal entry site (interne Ribosomenbindungsstelle)
iVDPV	VDPV bei immundefizienten Patienten
min	Minute(n)
NAg	neutralizing antigenic site (neutralisierende antigene Determinante)
NCR	<i>non coding region</i> (nicht kodierende Region)

NEAA	<i>non essential aminoacids</i> (nicht-essentielle Aminosäuren)
NID	<i>national immunization Days</i> (nationale Impftage)
NS	Nukleinsäure(n)
NSL	<i>non Sabin-like</i> (nicht Sabin-ähnlich)
Nt	Nukleotid(e)
OPV	Orale Poliovakzine
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
PCBP	<i>poly-C binding Protein</i> (poly-C bindendes Protein)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
rct	<i>reproductive capacity at different temperatures</i> (Reproduktionskapazität bei verschiedenen Temperaturen)
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism assay</i> (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Test)
RIVM	<i>Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu</i> (Niederländisches Institut für öffentliche Gesundheit und Umwelt)
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription
SL	<i>Sabin-like</i> (Sabin-ähnlich)
s	sense
sek	Sekunde(n)
ss+	single strand (+) (einzelsträngig mit positiver Polarität)
T	Thymin
TCID	<i>tissue culture infectiouse dose</i> (Zellkultur infektiöse Dosis)
U	Uracil, Unit
UV	Ultraviolettstrahlung
VAPP	Vakzin-assoziierte paralytische Poliomyelitis
VDPV	<i>vaccine-derived poliovirus</i> (Vakzin-abgeleitetes Poliovirus)
VPg	<i>viral protein, genome linked</i> (Genom-angebundenes virales Protein)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. habil. Eckart Schreier für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Seine persönliche und zugewandte Art hat die Erstellung der Arbeit erheblich erleichtert und motiviert. Viele fachliche und nicht-fachliche Gespräche haben zudem zu einem angenehmen und produktiven Klima in der Arbeitsgruppe beigetragen.

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Dr. Thomas Schneider, für die Betreuung und die freundliche Unterstützung.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. Sabine Diedrich für die herzliche Betreuung und intensive Unterstützung. Ihre stetige Verfügbarkeit und ihre offene Art ermöglichten ein ungezwungenes Arbeiten und haben ebenfalls zu dem sehr persönlichen Miteinander beigetragen.

Dr. Andreas MasMarques möchte ich sehr herzlich für alle Gespräche und Diskussionen persönlicher und freundschaftlicher Art danken. Seine große Hilfsbereitschaft und seine humorvolle Art haben selbst bei schwierigsten Problemen die Laborarbeit leichter werden lassen.

Danken möchte ich insbesondere allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe-Schreier: Birthe Müller, Daniela Gutt, Djin-Ye Oh, Heidrun Linke, Heidrun Roeske, Kathrin Stanossek, Dr. Marina Höhne, Monika Wolf, Paula Silva, Sonja Zimmermann, Dr. Stefan Taube, Ute Pätzold. Ohne deren theoretische und praktische Unterstützung wäre die Arbeit in vielen Bereichen nicht möglich gewesen. Das persönliche und stets freundliche Miteinander im Team hat sehr zur Freude bei der Arbeit beigetragen.

Zuletzt, jedoch an erster Stelle, möchte ich meiner Frau Erika sowie meiner Familie und allen Freunden danken, die mir in allen schwierigen Situationen viel emotionale Unterstützung und Motivation haben zukommen lassen.

Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Bernd Olaf Vollnberg, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Phänotypische und molekulargenetische Untersuchungen an Poliovirus Serotyp 1-Isolaten eines Poliovirus-Dauerausscheiders“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Bernd Olaf Vollnberg

Lebenslauf

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