

Infektionsgefährdung Erwachsener durch Polioviren in der Umwelt

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Lisa Töpel

angefertigt am: Institut für Virologie der Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Gerd Liebert

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 12.02.2019



# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>1. EINFÜHRUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. DAS POLIOVIRUS .....	1
1.2. DIE POLIOMYELITIS .....	2
1.3. INAKTIVIERTE POLIOVIRUS VAKZINE (IPV) UND ORALE POLIOVIRUS VAKZINE (OPV) .....	3
1.4. EPIDEMIOLOGIE UND ERADIKATION DER POLIOMYELITIS .....	6
1.5. JÜNGERE ENTWICKLUNG .....	8
<b>2. ZIELSTELLUNG.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIALIEN .....</b>	<b>15</b>
<b>4. METHODEN .....</b>	<b>19</b>
4.1. ZELLKULTUR.....	19
4.1.1. Zellkultivierung und Zellzahlbestimmung .....	19
4.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	20
4.1.3. Mycoplasmentest.....	21
4.1.4. Agarose-Gelelektrophorese und Gel-Elution.....	23
4.2. HERSTELLUNG VON STOCKVIRUS .....	24
4.3. TITERBESTIMMUNG MITTELS ENDPUNKTTITRATION.....	25
4.4. SERUMPROBEN .....	25
4.5. VIRUSNEUTRALISATIONSTEST FÜR POLIOVIRUS.....	26
4.6. RNA- UND DNA-EXTRAKTION .....	26
4.7. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) .....	27
4.7.1. Enterovirus-spezifische PCR (EV-PCR) .....	28
4.7.2. Poliovirus-spezifische PCR (PanPolio-PCR) .....	29
4.7.3. Baculovirus-spezifische PCR .....	30
4.8. PLASMIDHERSTELLUNG .....	31
4.9. FLUSSWASSERUNTERSUCHUNG.....	34
4.9.1. Konzentrierung des Flusswassers.....	34
4.9.2. Isolation und Identifikation der Viren .....	37
4.9.3. Validierung der Methode zum Poliovirusnachweis im Flusswasser .....	37
4.10. STATISTISCHE METHODEN .....	38
<b>5. ERGEBNISSE.....</b>	<b>40</b>
5.1. IMMUNITÄTSSTATUS DER UNTERSUCHTEN PROBANDEN.....	40
5.1.1. Deskriptive Auswertung der Serumproben .....	40
5.1.2. Seroprävalenz neutralisierender Antikörper .....	41
5.1.3. Alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede der Titer .....	46

5.2.	POLIOVIRUSNACHWEIS IN FLUSSWASSER .....	47
5.2.1.	<i>Einrichtung der Poliovirus-spezifischen PCR.....</i>	<i>47</i>
5.2.2.	<i>Validierung der Methode zum Nachweis von Polioviren in der Holtemme.....</i>	<i>50</i>
5.2.3.	<i>Untersuchung der aus Flusswasser gewonnenen Gesamt-RNA auf Entero- und Poliovirus-RNA .....</i>	<i>57</i>
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>59</b>
6.1.	EINORDNUNG DES IMMUNITÄTSSTATUS .....	59
6.2.	EIGNUNG DER METHODE ZUM NACHWEIS VON POLIOVIREN IN FLUSSWASSER .....	67
6.3.	EINSCHÄTZUNG DER INFektionsGEFÄHRDUNG DURCH POLIOVIREN IN DER UMWELT .....	76
6.4.	LIMITATIONEN.....	79
6.5.	AUSBLICK .....	82
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>86</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>
	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>100</b>
	<b>ANLAGEN.....</b>	<b>101</b>
	<b>ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>106</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>107</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin	EDTA	Ethyldiamintetraacetat
AFP	Acute flaccid paralysis (akute schlaffe Lähmung)	EPI	Expanded Program on Immunization
AS	Aminosäure	EV	Enterovirus
as	antisense	EVSurv	Enterovirus-Surveillance
ATCC	American Type Culture Collection	FKS	Fetales Kälberserum
aVDPV	ambiguous VDPV	GMT	Geometric mean titer (Geometrisches Mittel des Titers)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	GPEI	Global Polio Eradication Initiative
bp	Basenpaar	GPLN	Global Polio Laboratory Network
BSA	Bovines Serumalbumin	G	Guanin
C	Cytosin	h	Stunden
Ca	Calcium	hPVR	humaner Poliovirusrezeptor
CD	Cluster of Differentiation	i.d.R.	in der Regel
cDNA	complementary DNA	IPV	Inaktivierte Poliovirus Vakzine
CPE	Zytopathischer Effekt	IRES	Internal Ribosome Entry Site
Ct	Cycle Threshold (Zyklusanzahl)	IU	Internationale Einheiten
cVDPV	circulating VDPV	iVDPV	immunodeficiency-associated VDPV
d	Tag	K	Kalium
d.h.	das heißt	K/ml	Kopien/Milliliter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	K/R	Kopien/Reaktion (PCR-Reaktion bzw. PCR-Ansatz)
DNA	deoxyribonucleic acid	kDa	Kilodalton
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat	KI	Konfidenzintervall
dpi	days post infection (Tage nach Infektion)	l	Liter
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	M	Mol
E. coli	Escherichia coli	m	männlich

## Abkürzungsverzeichnis

---

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid	SD	Standardabweichung
MID	Minimale infektiöse Dosis	sek	Sekunden
min	Minuten	SIKO	Sächsische Impfkommision
ml	Milliliter	sog.	sogennant
MOI	multiplicity of infection	STIKO	Ständige Impfkommision
mRNA	messenger RNA	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
n	Anzahl	TCID <sub>50</sub>	tissue culture infective dose 50
Na	Natrium	T	Thymin
NCBI	National Center for Biotechnology Information	T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
NPEV	Nicht-Polio-Enterovirus	U	Uracil
NRZ PE	Nationales Referenzzentrum für Poliomyelitis und Enteroviren	U/min	Umdrehungen/Minute
nt	Nukleotid	U/ml	Units/Milliliter
NTC	no template control (Negativkontrolle)	UFZ	Umweltforschungszentrum
NTR	non-translated region	UV	Ultraviolett
OPV	Orale Poliovirus Vakzine	v.a.	vor allem
P/S	Penicillin/Streptomycin	VAPP	Vaccine-associated paralytic Poliomyelitis
PBS	Phosphate buffered saline	VDPV	Vaccine-derived Poliovirus
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)	VP	virales Protein
pfu	plaque forming units	w	weiblich
PK	Positivkontrolle	WHA	World Health Assembly
PV	Poliovirus	WHO	World Health Organization
RKI	Robert Koch Institut	WPV	wild poliovirus (Polio Wildvirus)
RNA	ribonucleic acid	µg	Mikrogramm
rt	real time (Echtzeit)	µl	Mikroliter
RT	Reverse Transkription	z.B.	zum Beispiel
		ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einführung

Die Poliomyelitis, im Volksmund als Kinderlähmung bekannt, ist eine potentiell tödliche Erkrankung. Die Entwicklung effektiver Impfstoffe führte weltweit zu einem starken Rückgang der Fallzahlen. Aufgrund ihrer umweltresistenten Eigenschaften können Polioviren nach Ausscheidung durch infizierte Personen unbemerkt in der Umwelt zirkulieren und Ursprung neuer Epidemien sein. Bei unzureichender Immunität der Bevölkerung und unbemerkter Zirkulation von Polioviren in der Umwelt besteht das Risiko der Wiedereinschleppung von Polioviren in bereits poliofreie Länder (Robert Koch Institut 2014b).

### 1.1. Das Poliovirus

Das Poliovirus ist ein kleines (Durchmesser 30nm, Molekulargewicht 2230 kDa) (Ohlbaum et al. 1970), nicht-behülltes humanes Enterovirus der Familie Picornaviridae. In der Umwelt bleiben Polioviren bei Wassertemperaturen von 30°C für viele Tage und bei 4°C über Monate infektiös (Bernier 1984).

Ein Viruspartikel in Form eines Ikosaeders besteht aus dem einzelsträngigen positiven RNA Genom und den umgebenden Kapsidproteinen VP1, VP2, VP3 und VP4 (VP = virales Protein) (Hogle et al. 1985, Wimmer et al. 1993). Das Genom hat eine Länge von 7433 bp (bp = Basenpaar) (Kitamura et al. 1981). Das nicht-kodierende 5'Ende (5'NCR) (ca. 700 bp) enthält die Internal Ribosome Entry Site (IRES), steuert die Translation und dient als Bindungsstelle während der Replikation (Savolainen-Kopra und Blomqvist 2010). Es folgt die Protein-kodierende Region. Das Genom wird als ein Polyprotein translatiert und durch viral kodierte Proteasen in die Vorläuferproteine P1, P2 und P3 gespalten. Aus P1 entstehen die Kapsidproteine (Wimmer et al. 1993). P2 und P3 sind die Vorläufer der Nicht-Strukturproteine, wie die viralen Proteasen, die RNA-abhängige Polymerase und die Helikase, mit unterschiedlichen Aufgaben in der Replikation (Savolainen-Kopra und Blomqvist 2010). Das 3' Ende des Genoms enthält ein Polyadenylierungssignal (Länge ca. 60 bp) und ist ebenso an der Replikation beteiligt (Wimmer et al. 1993).

Im Rahmen einer Immunantwort binden neutralisierende Antikörper an Aminosäureschleifen der Kapsidproteine. Vier verschiedene antigene Hauptregionen begrenzen die Zahl der Serotypen des Poliovirus auf drei. Die Antikörper sind Serotyp-spezifisch, es existiert keine Kreuzprotektion (Wimmer et al. 1993).

Polioviren infizieren menschliche Zellen durch Bindung an den humanen Poliovirusrezeptor (hPVR) CD155 auf Zelloberflächen (Mueller et al. 2005). Die Bindung führt zur Destabilisierung des Kapsids und damit Umwandlung des sog. 160s Partikels in den 135s Partikel (Mueller et al. 2005). Nach der Internalisierung des Partikels folgt die Freisetzung der viralen RNA in das Zytoplasma (Groppelli et al. 2017). Sie funktioniert nach Abspaltung des kovalent am 5' Ende gebundenen VPg als messenger RNA (mRNA). Die RNA von positiven RNA-Viren ist nach Eintritt in das Zytoplasma infektiös, da sie alle viralen Polypeptide für die Replikation generieren kann (Wimmer et al. 1993). Die IRES-vermittelte Initiation führt zur Translation der RNA in ein Polyprotein, das anschließend autokatalytisch gespalten wird (Wimmer et al. 1993). Nach kovalenter Bindung des VPg an die 5'NCR umgeben die Kapsidproteine die RNA und formen das infektiöse Viruspartikel (World Health Organization 2004b).

Die Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase der Polioviren ( $10^{-5}$ – $10^{-3}$  Basen pro Replikation) ist v.a. auf die fehlende 3'5'-Exonuklease Kontrollfunktion zurück zu führen (Jorba et al. 2008). Die hohen Mutationsraten erlauben eine schnelle Adaptation an veränderte Umgebungsbedingungen. Vermutete Ursache für den trotz dessen sehr stabilen Genotyp und die Konservierung des Polio Wildvirus (WPV) Phänotyps ist der hohe Selektionsdruck der Wirtszellen (Wimmer et al. 1993).

### **1.2. Die Poliomyelitis**

Menschen und nicht-menschliche Primaten sind das einzig bekannte Reservoir für Polioviren. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich fäkal-oral. Nach oraler Aufnahme replizieren Polioviren in hPVR exprimierenden Geweben (Tonsillen, Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe, Enterozyten) v.a. des Verdauungs- aber auch oberen Respirationstraktes. Sie werden dann ausgeschieden oder gelangen in die Blutbahn, was als Virämie bezeichnet wird (Mueller et al. 2005). Die erste Virämie führt zur Vermehrung der Polioviren, eine zweite Virämie ca. 1 Woche später v.a. zur Verteilung in andere Gewebe, wie das ZNS (Minor 2016). Die Inkubationszeit beträgt 7–14 Tage (2–35 d möglich) (Mueller et al. 2005). Ansteckungsgefahr besteht während der Virusausscheidung, in Rachensekreten nach 36 h bis einer Woche, im Stuhl (pro Gramm  $10^6$ – $10^9$  infektiöse Viren (Robert Koch Institut 2015d)) nach 72 h bis mehreren Wochen und bei Immungeschwächten deutlich länger (Nationale Kommission für die Polioeradikation in der Bundesrepublik Deutschland und NRZ PE am Robert Koch Institut 2011, Hamborsky et al. 2015).



Mehr als 95 % der Infektionen verlaufen asymptomatisch, wobei neutralisierende Antikörper die Infektion im Verlauf beenden (Robert Koch Institut 2015d). Bei der abortiven Poliomyelitis (4–8 %) treten unspezifische grippale Symptome auf, die innerhalb einer Woche folgenlos abklingen (Robert Koch Institut 2015d). Erreichen die Polioviren das ZNS, können Infizierte eine nicht-paralytische Poliomyelitis, bzw. aseptische Meningitis (2–4 %) mit Fieber und Nackensteifigkeit begleitet von Rückenschmerzen und Muskelkrämpfen entwickeln, die in der Regel auch vollständig ausheilt (Hamborsky et al. 2015, Robert Koch Institut 2015d). In 0,1–1 % der Fälle kommt es zur klassischen paralytischen Poliomyelitis (Robert Koch Institut 2015d). Die Bezeichnung Poliomyelitis stammt aus dem Griechischen „polios“ wie grau und „myelos“ wie Mark, gemeint ist das Rückenmark (Minor 2016). Im Rahmen der Virämie erreichen die Polioviren die Vorderhornzellen des Rückenmarks. Durch Zerstörung der Motoneuronen treten plötzliche schlaffe Lähmungen, im Englischen als „acute flaccid paralysis“ (AFP) bezeichnet, auf. Die motorischen Paresen sind typischerweise asymmetrisch ausgeprägt, betreffen meist die untere Extremität und bilden sich selten vollständig zurück. Die Sensibilität ist nicht beeinflusst. Sind vegetative Nervenzentren betroffen (bulbäre Form), kann die Lähmung der Herz- und Thoraxmuskulatur zum Tod führen (Robert Koch Institut 2015d). Im Rahmen eines Postpolio-Syndroms treten bei 25–50 % der Infizierten 15–30 Jahre nach der ursprünglichen Paralyse, ohne Hinweise auf eine fortbestehende Infektion mit Polioviren, erneut akute oder gesteigerte Muskelschwäche, –schmerzen und Erschöpfung auf (World Health Organization Geneva 2016).

Die Heilung der Poliomyelitis ist bisher nicht möglich, physiotherapeutische oder orthopädische Maßnahmen sind unterstützend (Robert Koch Institut 2015d). Nach natürlich durchgemachter Infektion entwickeln immunkompetente Personen eine humorale (zirkulierende Antikörper im Blut) und intestinale bzw. lokale (sekretorisches IgA) Serotyp-spezifische Immunität (Hamborsky et al. 2015).

### **1.3. Inaktivierte Poliovirus Vakzine (IPV) und orale Poliovirus Vakzine (OPV)**

1908 gelang es den Österreichern Landsteiner und Popper die infektiöse Natur des Virus und seine Übertragung im Tiermodell zu zeigen (Landsteiner und Popper 1909). Die Identifikation der Poliovirustypen durch die Australier Macnamara und Burnet 1931, sowie die in vitro Vermehrung in Zellkulturen durch Weller und Robbins 1948 brachten die Erforschung der Polioviren, sowie die Impfstoffentwicklung wesentlich voran (GPEI 2017).

1955 erhielt die von Salk entwickelte inaktivierte Poliovirus Vakzine (IPV) die Zulassung (Salk et al. 1954, Robert Koch Institut 2015a). Der Impfstoff enthält in Zellkultur vermehrtes und mit Formaldehyd chemisch inaktiviertes Virus aller drei Serotypen und bewirkt nach Injektion die Ausbildung einer humoralen Immunität (World Health Organization Geneva 2016). Die IPV ist als trivalenter Einzelimpfstoff oder in Kombination mit einem oder mehreren Antigenen wie Diphtherie-Tetanus-Pertussis, Hepatitis B oder Haemophilus influenzae b erhältlich (World Health Organization Geneva 2016). Die Administration erfolgt subkutan oder intramuskulär (World Health Organization Geneva 2016). Abhängig davon, ob Einzel- oder Kombinationspräparate verwendet werden, sind 3–4 Dosen IPV für einen sicheren Impfschutz erforderlich (Robert Koch Institut 2016a). Für die IPV sind keine schweren unerwünschten Reaktionen bekannt. Impflinge sind vor Poliomyelitis geschützt, können sich aber mit Polioviren infizieren und sie durch Ausscheidung weiter übertragen (Behrend et al. 2014). Die IPV ist für die Anwendung bei Immunkompromittierten geeignet (Parker und Grassly 2016, World Health Organization Geneva 2016).

1961 erhielt die monovalente orale Poliovirus Vakzine (mOPV) und 1963 die trivalente (tOPV) mit abgeschwächten Virusstämmen von Sabin die Zulassung (GPEI 2017). Heute sind monovalente (mOPV1, mOPV2, mOPV3), bivalente mit den Serotypen 1 und 3 (bOPV), sowie trivalente orale Poliovirus Vakzinen (tOPV) verfügbar (World Health Organization Geneva 2016). Durch Passagieren von Viren (WPV) in nicht menschlichen Zellen kommt es zur Selektion viraler Subpopulationen, die gut wachsen aber weniger virulent sind. Die Abschwächung ist das Resultat der Akkumulation von Spontanmutationen während der Replikation in anderem Gewebe (Wimmer et al. 1993). Die OPV induziert eine humorale, sowie lokale Immunantwort (Zaidi et al. 2016). Für einen sicheren Impfschutz gegen alle drei Serotypen sind mehrere Dosen erforderlich. Nach oraler Administration der OPV (2 Tropfen) scheiden Impflinge 4–6 Wochen und Personen mit Immundefekten über einen längeren Zeitraum Impfviren aus (World Health Organization Geneva 2016). Dies kann enge Kontaktpersonen indirekt immunisieren und bei bereits immunisierten Personen die intestinale Immunität verstärken (World Health Organization Geneva 2016). Die OPV sei nicht teratogen und sicher für die Anwendung bei Schwangeren und HIV-Infizierten, im Allgemeinen aber, wie alle Lebendimpfstoffe, bei Immunkompromittierten kontraindiziert (Parker und Grassly 2016, World Health Organization Geneva 2016).

Treten nach Applikation der OPV als unerwünschte Reaktion Paralyse auf, wird von Vakzin-assoziiertes paralytisches Poliomyelitis gesprochen (VAPP, „vaccine-associated paralytic poliomyelitis“) (Wimmer et al. 1993). Sie ist klinisch nicht zu unterscheiden von einer Infektion durch Polio Wildviren (WPV) und tritt in ca. 2–4 Fällen / 1000000 Geburten / Jahr in Ländern auf, die OPV anwenden (Platt et al. 2014).

Die Sabin Stämme weichen in wenigen Nukleotiden von ihren Vorläufer WPV-Stämmen (Typ 1: Mahoney, Typ 2: unbekannt, Typ 3: Leon) ab (Mueller et al. 2005). Abhängig vom Serotyp sind nur 2–5 der Substitutionen entscheidend für die Abschwächung (Savolainen-Kopra und Blomqvist 2010). Die hohe Mutationsrate von Polioviren bedingt das Auftreten adaptiver Mutationen, auch Reversion der abschwächenden Genomregionen, während der Replikation der Polioviren in infizierten Personen. Attenuierte Impfstämme, die Übertragungs- und Neurovirulenzeigenschaften der WPVs zurückerlangen und damit erneut zu Polioerkrankungen führen können, werden als Revertanten bezeichnet (Wimmer et al. 1993).

Die Sequenzabweichung der VP1-kodierenden Region eines Poliovirusisolates vom zugehörigen Sabin-Impfstamm in Prozent definiert, ob es zu WPVs, „OPV-like polioviruses“ oder zu „vaccine-derived polioviruses“ (VDPVs) gehört (World Health Organization 2004b). Ein Nicht-Übereinstimmen von 1 % ist gleichbedeutend mit der Replikation in einer oder mehreren Personen für zumindest 1 Jahr nach Gabe der OPV Dosis. WPVs weichen mehr als 15 % ab (Kew et al. 2005). „OPV-like polioviruses“ haben eine minimale Sequenzdifferenz und treten infolge der Anwendung der OPV ubiquitär auf (Burns et al. 2014). Als VDPVs gelten Isolate, deren VP1-Genomsequenzen sich weniger als WPVs (< 15 %), aber durch verlängerte Replikation oder Übertragung zwischen Menschen mehr als die OPV-like PVs von den Sabinstämmen unterscheiden (Serotyp 1 und 3  $\geq 1$  %, Serotyp 2  $\geq 0,6$  %) (Burns et al. 2014). Die VDPVs werden weiter in „circulating VDPVs“ (cVDPVs), „immunodeficiency-associated VDPVs“ (iVDPVs) und „ambiguous VDPVs“ (aVDPVs) unterteilt. Für cVDPVs ist eine Übertragung zwischen Menschen in der Bevölkerung nachgewiesen. iVDPVs entstehen durch verlängerte Replikation in Personen mit Immundefekten, die wegen Defiziten in der Antikörperproduktion 10 Jahre und länger Polioviren ausscheiden. Von aVDPVs ist der Ursprung nicht bekannt (Savolainen-Kopra und Blomqvist 2010, World Health Organization Geneva 2016). Die Genomsequenz der Polioviren verändert sich zusätzlich durch intratypische (zwischen Sabin-Stämmen oder zwischen Sabin-Stämmen und WPVs) und weniger durch intertypische Rekombinationen (mit anderen Nicht-Polio-Enteroviren (NPEVs) der Gruppe C,

wie beispielsweise Coxsackie-Viren) (Wimmer et al. 1993, Brown et al. 2003, Liu et al. 2003, Paximadi et al. 2008).

#### **1.4. Epidemiologie und Eradikation der Poliomyelitis**

Folgend auf erste Epidemien kindlicher Lähmungen Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts in Schweden und den USA, traten nach dem zweiten Weltkrieg auch in Deutschland große Epidemien auf, zuletzt 1961 mit 4594 Erkrankten (davon 306 tödlich) (Windorfer und Feil 2000, Lindner 2004).

Die zugelassenen Impfstoffe wurden unterschiedlich angenommen: Ungarn, Polen, die Tschechoslowakei, die ehemalige DDR, später auch die USA und die BRD entschieden sich für die Massenapplication der OPV. Während es in der BRD keine Impfpflicht gab, zählte die Polioimpfung ab 1961 in der DDR zu den Pflichtimpfungen. Länder wie Finnland, Frankreich, Island, die Niederlande, Norwegen und Schweden (Robertson 1993) entschieden sich frühzeitig für die IPV und blieben durchgehend dabei (Lindner 2004, Lindner und Blume 2006, Klein 2013). Durch die weit verbreitete Impfung gingen die Fallzahlen in entwickelten Ländern in den 60er und 70er Jahren stark zurück (World Health Organization 2004b). Die 27. World Health Assembly (WHA) 1974 war Ursprung des „Expanded Program on Immunization“ (EPI) der World Health Organization (WHO) mit dem allgemeinen Ziel, die Kinder auf der Welt zu impfen (World Health Assembly 1974). Zunächst sollten neben Poliomyelitis Tuberkulose, Tetanus, Diphtherie, Keuchhusten und Masern angegangen werden (GPEI 2017). Die OPV wurde trotz des Risikos der VAPP wegen einfacher Applikation als Schluckimpfung, günstigeren Herstellungskosten und indirekter Immunisierung von Kontaktpersonen bereits geimpfter Personen ebenfalls in die Routine-Impfprogramme der meisten Entwicklungsländer aufgenommen (Lindner und Blume 2006, GPEI 2017).

Die 44. WHA 1988 fasste den Beschluss für die weltweite Poliovirus Eradikation bis zum Jahr 2000 und führte die Global Polio Eradication Initiative (GPEI) ein (World Health Assembly 1988, GPEI 2017). Eradikation meint die „vollständige Entfernung bzw. Eliminierung eines Krankheitserregers aus dem Körper oder einer Population“ (Fiedler 2017). Zu diesem Zeitpunkt gab es weltweit ca. 350000 Fälle in 125 endemischen Ländern (Robert Koch Institut 2016d). Deutschland verzeichnete 1990 die letzte erworbene Wildviruserkrankung und 1992 die letzten beiden importierten Fälle (Ägypten, Indien) (Robert Koch Institut 2015d). 1998

empfehl die Ständige Impfkommission (STIKO) wegen weiterhin jährlich auftretender VAPP-Fälle fortan den generellen Einsatz der IPV anstelle der OPV (Robert Koch Institut 2015d).



**Abb. 1 Weltkarten mit Ländern in denen Polio 1988 und 2017 endemisch vorkam.**

Links: Dunkelgrau - 125 Länder in denen Polio 1988 endemisch war. Rechts: Dunkelgrau - 3 Länder (Pakistan, Afghanistan und Nigeria) in denen Polio 2017 endemisch war und es bis heute (Stand: 28.05.2018) ist. Die Karten wurden mit mapchart.net erstellt.

Die Zahl der Polioerkrankungen konnte weltweit um > 99 % reduziert werden (Robert Koch Institut 2016d) und es leben bereits > 80 % der Weltbevölkerung in poliofreien Ländern (Robert Koch Institut 2015d). Aktuell verbleiben die drei Poliovirus endemischen Länder Pakistan, Afghanistan und Nigeria (Abb. 1).

2015 betrug die Zahl der bestätigten Polio-Wildviruserkrankungen 74, wobei Nigeria zwischenzeitlich nicht zu den endemischen Ländern zählte (Morales et al. 2016). 2016 wurden weltweit insgesamt 37 Wildviruserkrankungen gemeldet (Pakistan 20, Afghanistan 13, Nigeria 4), 2017 waren es 22 Fälle (Pakistan 8, Afghanistan 14) (World Health Organization 2018). WPV Typ 2 verursachte seit 1999 (Minor 2016) keine Wildviruserkrankung mehr und gilt seit September 2015 als ausgerottet (Robert Koch Institut 2016d). Die letzte Wildviruserkrankung durch WPV Typ 3 trat 2012 auf (World Health Organization 2018).

Die Mitgliedstaaten der WHO werden in sechs Regionen gegliedert (Anlagen Tab. 2, Abb. 17) (World Health Organization 2017a). Die Region of the Americas (1994), Western Pacific Region (2000), European Region (2002) (Robert Koch Institut 2002) und zuletzt die South-East Asia Region (2014) (Bahl et al. 2014) sind von der WHO bereits poliofrei zertifiziert. Es fehlen die African und die Eastern Mediterranean Region. Für die Zertifizierung der Poliofreiheit einer Region fordert die WHO, dass mindestens 3 Jahre keine Poliofälle durch Wildviren auftreten, eine ausreichende Impfmunität der Bevölkerung vorliegt, die Erfassung von AFP-Fällen

funktioniert, importierte Poliofälle zuverlässig detektiert und WPVs sicher gelagert werden (Robert Koch Institut 2002).

Die fortlaufende Anwendung der OPV in vielen Ländern birgt bei unzureichender Immunität der Bevölkerung das Risiko der verlängerten Zirkulation der Impfviren und damit des Auftretens neurovirulenter VDPVs (Burns et al. 2014, Zaidi et al. 2016). Zu den ersten Ausbrüchen durch diese Revertanten zählen Ägypten (1983–1993), Hispaniola (Haiti und Dominikanische Republik) (2000–2001), Philippinen (2001) und Madagaskar (2001–2002) (Mueller et al. 2005). Bis 2016 kam es in mehr als 20 Ländern zu Erkrankungswellen, über 80 % durch cVDPV Typ 2 (davon ca. 51 % in Nigeria) (World Health Organization 2017b). Auch die Ukraine, ein Land der WHO European Region, meldete beispielsweise 2015 zwei Erkrankungsfälle durch cVDPV Typ 1 bei zuvor stark gesunkenen Impfquoten (Robert Koch Institut 2015e). In Ländern die mit OPV impfen erfolgte 2016 (unter der Voraussetzung der Integration einer Dosis IPV in das nationale Impfprogramm (Parker et al. 2015)) die Umstellung von der trivalenten (PV 1, 2 und 3) auf die bivalente OPV (PV 1 und 3) um das erneute Auftreten von cVDPV Typ 2 Erkrankungen nach der WPV Typ 2 Eradikation 2015 zu beenden (Robert Koch Institut 2016c).

### 1.5. Jüngere Entwicklung

Zu den Strategien der Polioeradikation zählen zum einen Immunisierungen in Form von Routineimpfungen, zusätzlichen nationalen Impftagen und sog. gezielten „mop-up“ Kampagnen um Immunitätslücken zu schließen (World Health Organization 2004b). Zum anderen spielt die Überwachung der Poliomyelitisituation eine wichtige Rolle. Sie umfasst die Erhebung von Daten zum Immunitätsstatus, Erfassung von Fällen akuter schlaffer Lähmungen (AFP) und ergänzend die Detektion zirkulierender Polioviren in der Umwelt (Asghar et al. 2014).

Ziel der Immunisierungen ist es, eine ausreichende „Herdenimmunität“, d.h. einen Infektionsschutz der Bevölkerung durch Anwesenheit immunisierter Personen, zu gewährleisten (Fine 1993). Je höher der Immunitätslevel, desto kleiner ist die Wirtspopulation für das Virus, wodurch wiederum die Übertragungsrate sinkt (Fine 1993, Smith 2010). Neben Impfungen tragen natürlich durchgemachte Infektionen und maternale Antikörper zur Immunität einer Bevölkerung bei (Fine 1993). Entscheidend für die Kalkulation des erforderlichen Schwellenwertes für Herdenimmunität ist neben Geburtsraten, durchschnittlichem Infektionsalter und Dauer der Protektion durch maternale Antikörper (Anderson und May 1990) die Basisreproduktionszahl  $R_0$  des Erregers. Je höher  $R_0$ , desto schwieriger ist die Eradikation:  $R_{0\text{ Masern}} = 10$ –

20,  $R_0$  Pocken = 2–4 und  $R_0$  Polio = 5–7 (Anderson und May 1990, Plans-Rubió 2012). Unter der Annahme, dass die Impfung zu 100 % effektiv ist, liegt der Schwellenwert für Polio bei 80–86 % (Fine 1993).

Die Steigerung des Immunitätslevels einer Bevölkerung senkt das Infektionsrisiko (Smith 2010). Das kann jedoch dazu führen, dass sich der Erkrankungszeitpunkt derjenigen die trotzdem erkranken, vom Kindes- in das Erwachsenenalter verlagert (Smith 2010). Weiterhin begünstigend sind Immunitätslücken im Alter, bedingt durch fehlende Impfungen oder eine mögliche Abnahme, sog. Waning, der Antikörperlevel (Blake et al. 2014). Mit steigendem Alter bei Infektion sind die Krankheitsverläufe bei vielen Kinderkrankheiten, wie Röteln, Masern, aber auch Polio schwerwiegender. Das Risiko für Paralysen ist höher (Anderson und May 1990). Bei Kindern enden 5–10 % der paralytischen Poliomyelitiden tödlich, bei Jugendlichen und Erwachsenen hingegen 15–30 % (World Health Organization Geneva 2016). Z.B. betrafen Polioausbrüche in Namibia 2006 (Yusuf et al. 2014), Tajikistan 2010 (Yakovenko et al. 2014) und im Kongo 2010 (Robert Koch Institut 2011a) ungewöhnlich viele Erwachsene mit einem hohen Anteil tödlicher Verläufe (Robert Koch Institut 2011a).

Durch ein höheres Erkrankungsalter steigt  $R_0$  für Polio auf bis zu 30 und der Schwellenwert für Herdenimmunität damit auf >95 % (Fine 1993). Nach Sauerbrei et al. (2004) sowie Diedrich und Schreier (2007) sei, wie basierend auf den Berechnungen von Fine (1993), eine Herdenimmunität von mindestens 80 % erforderlich um zumindest die Verbreitung von Polioviren zu verhindern. Die DDR sah im Gegensatz dazu >90 % (Dittmann und Thilo 1986, Klein 2013), die Schweiz beispielsweise >95 % (Bienz und Bourquin 2003) als notwendig an. Der Poliovirusausbruch in Tajikistan (WHO European Region) und angrenzenden Ländern 2010 mit insgesamt 475 Fällen durch importiertes WPV Typ 1 (aus Indien) bei einem Immunitätslevel von 87 % (2008) verdeutlicht die Auswirkungen einer mangelnden Bevölkerungsimmunität in nichtendemischen Regionen (Robert Koch Institut 2010b, Robert Koch Institut 2011b).

Jüngeren Aussagen des Robert Koch Institutes zufolge, könne die Zirkulation des Poliovirus nur verhindert und die Eradikation erreicht werden, wenn der Schutz der Bevölkerung über 95 % läge (Robert Koch Institut 2012). Auch die WHO fordere aktuell Immunitätslevel von mindestens 95 % (Robert Koch Institut 2017). Eine Impfquote von mindestens 95 % sei laut RKI ein wichtiger Indikator zur Einschätzung des Risikos der Weiterverbreitung eines eingeschleppten Poliovirus in der Bevölkerung (Robert Koch Institut 2018a). Weiterhin sei es nach Angaben der Technical Advisory Group on Vaccine-preventable Diseases für die WHO Region

of the Americas ebenfalls Ziel, einen Impfschutz >95 % zu erreichen (TAG on Vaccine-Preventable Disease 2013).

Daten jüngster Vergangenheit zum Immunitätsstatus Erwachsener in Deutschland zeigen, dass 95 % Immunität gegen alle drei Poliovirustypen nicht erreicht werden. Die Untersuchung von 290 Seren schwangerer Frauen von 1995–1996 ergab, dass nur 62,4–64,1 % einen ausreichenden Titer (Cut-Off Titer  $\geq 10$ ) gegen alle drei Poliovirustypen hatten (Sauerbrei et al. 2004). Im Rahmen des Bundesgesundheits surveys von 1997/1998 waren nur 85 % der 2564 getesteten Erwachsenen serologisch gegen alle drei Poliovirustypen geschützt (Diedrich et al. 2000). Die aktuellsten Zahlen für Deutschland stammen aus der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“. Mit der ersten Erhebungswelle von 2008–2011 wurden Impfdaten von einem Teil der 18–79-Jährigen deutschlandweit erhoben. 85,6 % der Erwachsenen waren vollständig gegen Poliomyelitis immunisiert (Poethko-Müller und Schmitz 2013).

Sauerbrei et al. (2004) und Nijsten et al. (2015) zeigten zudem auf, dass im direkten Vergleich die Rate des impfanamnestischen Schutzes höher war, als die Seroprävalenz neutralisierender Antikörper gegen Polioviren. Damit könnte auch für die Erwachsenen in Deutschland der Immunitätslevel geringer sein, als die aktuellsten Zahlen aus Impfanamnesen vorgeben. Weiterhin stellten Poethko-Müller und Schmitz (2013) höhere Prävalenzen bei Frauen im Vergleich zu Männern, sowie einen Abfall der Impfquote mit steigendem Alter fest. Die deutschlandweiten Impfquoten von Kindern bei Schuleingangsuntersuchungen für das Jahr 2016 liegen bei 93,9 % und sind damit im Vergleich zu den Resultaten für Erwachsene in Deutschland zunächst sehr gut (Robert Koch Institut 2018b). Sie seien jedoch in den letzten 10 Jahren um ca. 2,5 % gesunken (Robert Koch Institut 2018b). Entgegen der Annahme, dass insbesondere Beschäftigte im Gesundheitswesen, wie z.B. Ärzte, Pflegepersonal oder Medizinstudierende, ein gesteigertes Bewusstsein für die Inanspruchnahme von Schutzimpfungen haben sollten, lagen die ermittelten Impf- und auch Seroprävalenzraten in Untersuchungen von Wicker et al. (2007), Voigt et al. (2008) und Külshammer et al. (2013) für die letzten Jahre teilweise <70 %.

Deutschland nimmt seit 1997 aktiv am Programm der Polioeradikation der WHO teil (Robert Koch Institut 2010a). Polio zählt in Deutschland nach § 6 und § 7 des Infektionsschutzgesetzes zu den meldepflichtigen Erkrankungen. Jeder Krankheitsverdacht (jede nicht traumatisch bedingte akute schlaffe Lähmung), die Erkrankung und der Tod, sowie der direkte und indirekte Nachweis von Poliovirus, der auf eine akute Infektion hinweist wird namentlich gemeldet (Ro-



bert Koch Institut 2015d). Für AFP-Fälle erfolgt zusätzlich eine Meldung an die Nationale Kommission für die Polio-Eradikation (Bigl und Roch 2001). Im Rahmen der AFP-Überwachung werden von jedem der auftretenden Fälle bei Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren zwei Stuhlproben mit einem Mindestabstand von 24 h innerhalb von 14 Tagen nach Beginn der Lähmungen genommen (Robert Koch Institut 2010a). Ursachen für akute schlaffe Lähmungen sind neben Polio z.B. das Guillain–Barré–Syndrom, die transverse Myelitis und andere Virusinfektionen (Robert Koch Institut 2010a). Die Meldezahlen müssen mindestens der Inzidenz der AFP von 1 Kind <15 Jahre/100000 Kinder/Jahr entsprechen, um als adäquate Überwachung zu gelten (Zaidi et al. 2016). In Deutschland erfolgte die AFP-Überwachung von 1998–2010 (Robert Koch Institut 2015c). Da Deutschland die Qualitätsvorgaben der WHO über viele Jahre nicht erfüllen konnte, wurde 2005 zusätzlich die Enterovirus Surveillance (EVSurv) etabliert (Robert Koch Institut 2010a). In akkreditierten Labors wird zur differentialdiagnostischen Abklärung viraler Meningitiden und Enzephalitiden, sowie bei nicht traumatisch bedingten AFPs ohne Altersbeschränkung eine Enterovirusdiagnostik in Stuhl- oder Liquorproben durchgeführt (Nationale Kommission für die Polioeradikation in der Bundesrepublik Deutschland und NRZ PE am Robert Koch-Institut 2011). Hintergrund ist, dass Poliovirusinfektionen seltener mit akuten schlaffen Lähmungen, als mit Meningitiden oder Enzephalitiden einhergehen (Robert Koch Institut 2010a).

Im Allgemeinen gilt die AFP-Überwachung als internationaler Standard in der Polioeradikation (Asghar et al. 2014). Der klinische Manifestationsindex von Poliovirusinfektionen ist sehr niedrig, 95 % verlaufen asymptomatisch. Infizierte Personen scheiden trotzdem Polioviren aus, die dann unbemerkt in der Umwelt zirkulieren und auf diesem Weg ein Gesundheitsrisiko darstellen können (Bosch et al. 2008, Cashdollar und Wymer 2013). Durch Trinkwasser, Wasseraufnahme bei Freizeitaktivitäten wie Schwimmen oder Wassersport, kontaminierte Lebensmittel (durch Bewässerungsanlagen in der Landwirtschaft), Meeresfrüchte oder Aerosole (die z.B. bei der Abwasseraufbereitung entstehen) werden Viren potenziell übertragen (Mayr 2003, Bosch et al. 2008, Battistone et al. 2014). Die sonst oft als Anzeiger für Wasserverunreinigung verwendeten Indikatorbakterien weisen nicht die gleichen umweltresistenten Eigenschaften wie viele Viren, unter anderem Polioviren, auf. Ein Vorkommen von enteralen Viren in Abwesenheit von Fäkalindikatoren kann deshalb nicht ausgeschlossen werden (Fong und Lipp 2005, Moser-Danhel und Meyer 2008). Eine sensitive Umweltüberwachung detektiert die Abwesenheit zirkulierender WPVs oder eingeschleppter WPVs, sowie das Vorhandensein von OPV-like

PVs oder Kategorien der VDPVs (Asghar et al. 2014). Teilweise steht der Nachweis in der Umwelt im Zusammenhang mit Erkrankungsfällen in der Region oder erfolgt während Massimpfkampagnen mit OPV. Falls aber WPVs oder cVDPVs in der Abwesenheit von AFP-Fällen nachgewiesen werden, spricht man von der stummen Zirkulation in der Umwelt, was besonders in Populationen mit hohen Immunitätsleveln unbemerkt auftritt (Manor et al. 2014).

In Israel und Palästina trat 1988 der letzte einheimische Poliofall auf. Da Polio in den umliegenden Regionen aber noch endemisch war, wurde 1989 ein System zur Überwachung der Wildviruszirkulation in Abwässern etabliert. 1994 begann die Überwachung der akuten schlaffen Lähmungen. Die Umweltüberwachung konnte in Abwesenheit von AFP-Fällen mehrere stumme Wildvirus-Zirkulationen aufdecken, z.B. 1990 WPV Typ 3, 1991 WPV Typ 1 und 1996 WPV Typ 1 (Manor et al. 1999). 2013 wurde erneut vermehrungsfähiges WPV Typ 1 in Abwasser detektiert. Phylogenetische Analysen der Stämme ergaben Übereinstimmungen mit dem SOAS (South Asia) Typ des WPV Typ 1, der noch in Afghanistan und Pakistan endemisch vorkommt (Anis et al. 2013, Kaliner et al. 2014, Shulman et al. 2014). Auch in Brasilien, wo es seit über 20 Jahren keinen einheimischen Poliofall mehr gegeben hatte und die Durchimpfungsraten gegen Polio hoch sind, wurden importierte Polioviren (WPV Typ 1) in Abwässern eines internationalen Flughafens detektiert (Pan American Health Organization 2014).

Der Nachweis von WPVs und VDPVs in der Umwelt in Abwesenheit von AFP-Fällen (beschrieben von Shulman et al. 2006, Blomqvist et al. 2012, Hovi et al. 2012, Al-Hello et al. 2013, Anis et al. 2013, Hovi et al. 2013, Battistone et al. 2014, Kuryk et al. 2014, De Oliveira Pereira et al. 2016) oder noch vor dem Auftreten von AFP-Fällen unter anderem in Regionen mit mangelhafter AFP-Überwachung, inadäquaten Impfkaktivitäten oder Regionen mit einem hohen Risiko für die Polioviruseinschleppung, verdeutlicht den zusätzlichen Nutzen der Umweltüberwachung (Kuryk et al. 2014, Zaidi et al. 2016). Einige Studien zeigten, dass die Umweltüberwachung höhere Sensitivitäten als die AFP-Überwachung erreichen kann (Manor et al. 1999, Blomqvist et al. 2012, Alam et al. 2014, Battistone et al. 2014).

In fünf der sechs WHO-Regionen (Abb. 21 in den Anlagen (Asghar et al. 2014)) erfolgte in interdisziplinärer Zusammenarbeit mit der WHO die Etablierung eines Umweltüberwachungssystems. In der Europäischen Region zählen dazu unter anderem die Niederlande, Italien und Israel. Deutschland führte bisher keine routinemäßige Umweltüberwachung ein, da die EVSurv

eine gute Qualität der Polio-Überwachung gewährleistet. „In Abhängigkeit von der epidemiologischen Situation können jedoch lokale, temporär begrenzte Abwasser-Untersuchungen eine sinnvolle Ergänzung zur etablierten EVSurv sein“ (Diedrich et al. 2016).

Um die oft geringen Virusmengen in Oberflächenwasser (Flüsse, Meere, Seen) oder Abwasser nachzuweisen, müssen große Probenvolumina (1 l–1000 l) entnommen (Bosch et al. 2008, Gibson et al. 2012, Cashdollar und Wymer 2013) und meistens in zwei separaten Schritten konzentriert werden. Grundlegende Prinzipien sind Adsorption und Elution, Zwei-Phasen-Separation, Zentrifugierung und Filtration (Percival 2004), die als primäre und sekundäre Konzentrierung kombiniert werden (Winona et al. 2001, Bosch et al. 2008). Häufig reichern jedoch auch Stoffe (z.B. Huminsäuren) mit an, die nachfolgende zellkulturbasierte aber v.a. auch PCR-Nachweisverfahren inhibieren (Gibson et al. 2012).

Standard zum Virus-Nachweis ist die Anzucht und Isolation auf Zellkulturen und die anschließende Identifikation der Isolate (World Health Organization 2003). Durch die Konzentrierung kann zuvor infektiöses Virus zerstört worden sein, sodass in der Zellkultur weniger Virus als tatsächlich enthalten war, detektiert wird (Fong und Lipp 2005). Zellkulturbasierte Methoden dauern im Gegensatz zur PCR mindestens einige Tage, was für die routinemäßige Anwendung in der Umweltüberwachung nicht optimal ist (Hindiye et al. 2014). Insgesamt betont dies die Notwendigkeit der Entwicklung effektiver Methoden zum direkten Poliovirusnachweis im Rahmen der Umweltüberwachung, wie sie beispielsweise auch für das WPV Typ 1 Isolat in Israel 2013 in Form einer spezifischen PCR zur Anwendung kamen (Hindiye et al. 2014).

## 2. Zielstellung

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Verschiebung des Erkrankungszeitpunktes für Poliomyelitis in das Erwachsenenalter, wenigen aktuellen Zahlen zum serologischen Immunitätsstatus Erwachsener und der bisher nicht etablierten Umweltüberwachung in Deutschland, stellt sich die Frage, ob die deutsche Bevölkerung einen ausreichenden Impfschutz gegen Poliomyelitis aufweist und ob hierzulande Polioviren in der Umwelt nachweisbar sind.

Da gerade auch bei Beschäftigten im Gesundheitswesen (z.B. Ärzten, Pflegekräften oder Medizinstudierenden) ein unzureichender Schutz gegen Polioviren festgestellt wurde (Wicker et al. 2007, Voigt et al. 2008, Külshammer et al. 2013), sollen stellvertretend bereits gewonnene Serumproben von Mitarbeitern der Uniklinik Leipzig auf neutralisierende Antikörper gegen Polioviren getestet werden. Ziel ist es, den Immunitätsstatus der Probanden im Hinblick auf die Gewährleistung einer ausreichenden Herdenimmunität **(1a)** und alters- oder geschlechtsspezifische Unterschiede **(1b)** zu analysieren. Weiterhin soll darauf eingegangen werden, inwiefern von den untersuchten Probanden auf Erwachsene in Deutschland geschlossen werden kann **(1c)**.

Als mögliches Übertragungsmedium von Polioviren in der Umwelt soll stellvertretend Flusswasser der Holtemme (in den Landkreisen Harz und Börde in Sachsen-Anhalt) getestet werden. Dies erfolgt in Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen des UFZ Leipzig, die auch für andere Projekte Analysen in der Holtemme durchführen. Ziel ist es, unter Anwendung einer direkten PCR-basierten Nachweismethode und zuvor Ermittlung der Sensitivität und Spezifität der Methode in sog. Spike-Versuchen **(2a)**, schließlich Flusswasser verschiedener Standorte der Holtemme auf das Vorhandensein von Polio- und NPEVs zu untersuchen **(2b)**.

Abschließendes Ziel ist es, die Infektionsgefährdung Erwachsener durch Polioviren in der Umwelt basierend auf dem Immunitätsstatus der untersuchten Probanden und der angewendeten Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser einzuschätzen **(3)**.

Die Ergebnisse der Arbeit sollen einen Beitrag zur Überwachung der Poliomyelitissituation in Deutschland und Europa leisten.

### 3. Materialien

#### Zelllinien

Bezeichnung	DSMZ-Nummer	Charakteristika	Herkunft/Quelle
RD (TE-671)	ACC 263	Muskelzellen eines kaukasischen Mädchens (7 Jahre)	DSMZ, Braunschweig
SF21	ACC 119	Ovarialzellen des Insekts <i>Spodoptera frugiperda</i>	DSMZ, Braunschweig

#### Virusstämme und Bakterien

Erreger	Stamm	Herkunft/Quelle
Baculovirus	AcCC1	ATCC, Wesel
Poliovirus Typ 1	Sabin	RKI, Berlin
Poliovirus Typ 2	Sabin	RKI, Berlin
Poliovirus Typ 3	Sabin	RKI, Berlin

Bakterienstamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i>	JM109	Promega

#### Primer und Sonden

Bezeichnung	Polarität	Sequenz 5'→3'	nt-Position	Länge (bp)	T <sub>M</sub> (°C)	G/C (%)	Firma
EV-1 as	antisense	ACC CAA AGT AGT CGG TTC C	537-555 (AY752944)	19	57,0	52,6	Tib Molbiol
EV-1 s	sense	GGT GCG AAG AGT CTA TTG AGC TA	416-438 (AY752944)	23	63,0	47,8	Tib Molbiol
EV probe	Sonde	6FAM-TGA ATG CGG CTA ATC CTA ACT GCG-BBQ	460-483 (AY752944)	24	64,2	50,0	Tib Molbiol
M13for (pGEM®-T)	sense	GTA AAA CGA CGG CCA G	2941-2957	16	46,0	56,0	Metabion
MPas	antisense	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G	321621- 321642	22	64,0	54,5	Metabion
MPs	sense	GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG	321179- 321199	21	63,0	57,1	Metabion
PanPolio_as	antisense	AYR TAC ATI ATY TGR TAI AC	2956-2978*	20	47,0	25,0	Eurofins
PanPo- lio_probe	Sonde	FAM-TGR TTN ARI GCR TGI CCR TTR TT-BHQ1	2935-2957*	23	57,1	39,1	Eurofins
PanPolio_s	sense	CIT AIT CIM GIT TYG AYA TG	2876-2895*	20	50,1	32,5	Eurofins
Bacu 8.1 s	sense	GCT GCA CGG CAA TAC CTA TCA TC	80918-80940 (NC_001623)	23	57,0	52,0	Metabion
Bacu 8.1 as	antisense	ATG TAC AGA CGC GAC CCC AA	81128-81109 (NC_001623)	20	54,0	55,0	Metabion

## Materialien

Bacu FL	Sonde	CAA CAA TAG TCC GCT GTA TGC GCT CAT T-FL	81033-81006 (NC_001623)	28	60,0	46,0	Tib Molbiol
Bacu LC	Sonde	LC Red640-ACA TTC TAA ACA TTA AAA CGG TGC GCA GT-PH	81004-80977 (NC_001623)	29	57,0	38,0	Tib Molbiol

\* (Toyoda et al. 1984)

## Weitere Nukleinsäuren

dNTP-Set, je 100 mM	Fermentas, R0186
GeneRuler™ 100 bp DNA LadderPlus	Fermentas, SM0321

## Kits

Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, 4336776
DyeEx®2.0 Spin Kit (250)	Qiagen, 63206
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche, 11858874001
pGEM®-T Vector System I	Promega, A3600
QIAamp® Viral RNA Mini Kit (250)	Qiagen, 52906
QIAprep® Spin Miniprep Kit (50)	Qiagen, 27104
Quanti Fast Multiplex RT-PCR + R Kit	Qiagen, 204954
Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System	Promega, A9282

## Enzyme

Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen, 10966-034
Superscript III Reverse Transcriptase	Invitrogen, 18080-044

## Nährmedien

Erhaltungsmedium SF21-Zellen	Insectomed SF express+2 % FKS
LB-Medium	Lennox L Broth Base (Invitrogen; 12780-052); 20 g/l VE-Wasser (autoklaviert)
Erhaltungsmedium RD-Zellen	DMEM mit Glutamax I + 10 % FKS + P/S (100 U/ml)
Nährmedium SF21-Zellen	Insectomed SF express + 10 % FKS
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose auf 10 ml

## Puffer und Lösungen

Kristallviolett (Gebrauchslösung)	100 g Kristallviolett-pulver + 100 ml Ethanol (20 %ig)
Ladepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) + 0,03 % Bromphenolblau + 0,03 % Xylencyanol + 60 % Glycerol + 60 mM EDTA
LB-Agar für Petrischalen	17,5 g LB-Agar (Sigma, L-2897) auf 500 ml VE-Wasser; pH mit 1 M NaOH auf 7,3 - 7,4 einstellen; dann autoklavieren und auf ca. 55 °C abkühlen lassen; Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml); 20 ml in Petrischalen gießen
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris + 0,1 M EDTA, mit Eisessig auf pH 8,5
TM-Puffer	50 mM Tris HCl pH 7,8 + 10 mM MgSO <sub>4</sub>

## Chemikalien und Reagenzien

Ampicillin	Ratiopharm
Bisbenzimid (H 33258)	AppliChem
Bovines Serumalbum (BSA)	Sigma, A4503
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
DMEM	Gibco®
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth, 3738
Einbettungsmedium	Dr.Merck & Kollegen
Ethanol absolut	J.T. Baker, 8228
Ethidiumbromid (5 mg/ml)	Sigma, E8751
FKS (fötales Kälberserum)	Biochrom, S0115
HiDi Formamid	AppliedBiosystems, 4311320
HPLC-Wasser	Roth, A511.2
Insectomed SF express	Biochrom, F8275
Kristallviolett	Merck
L-Glutamin	Gibco®
LE Agarose	Biozym
Loading Dye (6x)	Fermentas, R0611
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) (50 mM)	Invitrogen
PCR Puffer (10x MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen
Penicillin Streptomycin Mix	Gibco®, 15140
Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS 10x)	Gibco®
TE-Puffer	Invitrogen, 12090-015
Trypan Blau-Lösung (0,4 %)	Gibco®
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco®

## Geräte und Verbrauchsmaterial

Bakterienröhrchen	Greiner
Brutschrank (Steri-Cult 200; 5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C, 95 % Feuchte)	Forma Scientific
Brutschrank für Bakterien (kelvitron® t; 5% CO <sub>2</sub> , 37°C, 95% Feuchte)	Heraeus Instruments
Crossflow Filter (Hydrosart® Ultrafiltration Cassette)	Sartorius
Deckgläser (20x26 mm)	Menzel Gläser
Digitale Farbkamera DFC 360 FX	Leica
DNA/RNA-Extraktionsinstrument (MagNA Pure 96)	Roche
Eismaschine (AF-20)	Scotsman
Elektrophoresegerät (PowerPac 300)	Biorad
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop DMIRB	Leica
Gefrierbehälter (Mr. Frosty™)	Thermo Scientific
Gefrierschrank (- 20 °C)	Liebherr, Premium
Gefrierschrank (- 80 °C)	Revco Scientific
Geldokumentationsanlage (Multimage™Light Cabinet)	Alpha Innotech Corporation
Gelelektrophoresekammer	Biorad
Glas-Douncer	GLW
Gläser mit Schraubverschluss (100 – 500 ml)	Schott Duran, Biochrom KG
Glaskapillaren (LightCycler® Capillaries 20 µl)	Roche
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	K.J. Werner GmbH

## Materialien

Kryoröhrchen (Cryo Tube™)	Nunc™
Kühlschrank	Liebherr Premium
Laminarflowsystem (Klasse: IIB, DIN 12950, BS 5726, NSF 49)	CleanAir
Magnetrührer und Heizplatte (MR 3001)	Heidolph Instruments
Mehrkanalpipette (Finnpipette F2)	ThermoFisher
Mehrkanalpipette 50 µl	Eppendorf
Membranpumpe (SartoJet Membran Pumpe)	Sartorius
Mikrofiltrations-Set (Sartocon® Slice Microfiltration Set)	Sartorius
Mikroskop (Inverses Stereomikroskop DMIL)	Leica
Mikrowelle (Pro II 1400)	Panasonic
Neubauer-Zählkammer und dazu die Deckgläser	Marienfeld
Objektträger	Thermo Scientific
PCR Instrument (GeneTouch)	BioEr
Petrischalen	Sarstedt
Photometer (Nanodrop 1000)	Thermo Fisher
Pipettenspitzen	Greiner
Pipettus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner
Real-Time PCR-System (LightCycler® 1.0/2.0)	Roche
Reinstwasseranlage (ELIX)	Millipore
Schüttelplattform mit Außengehäuse (Certomat®R und Certomat®HK)	B. Braun Biotech International
Schüttler (Reax 2000)	Heidolph Instruments
Sequenziergerät (3500 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems Hitachi
Spritzenfilter 0,20 µm	Roth
TC-Platte (96-well)	Sarstedt, Greiner
Thermoblock (Thermomixer comfort)	Eppendorf
Thermocycler (BIOER GeneTouch)	Biozym
Tischzentrifuge (5417 R)	Eppendorf
Tischzentrifuge (MiniSpin®)	Eppendorf
Transferpipetten	Sarstedt
Ultrazentrifuge (Ultrazentrifuge Optima XPN-80)	Beckman
UV-Transilluminator (λ = 365 nm)	Alpha Innotech Corporation
Vakuumpumpe (CVC 2000)	Vacuumbrand
Wasserbad	Memmert
Zellkultur-Flaschen 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> (CELLSTAR®)	Greiner
Zellkulturschale 10 mm	Falcon
Zentrifugal-Vakuumkonzentrator (Savant SPD111V SpeedVac Concentrator)	ThermoScientific
Zentrifuge (ROTIXA/P)	Hettich
Zentrifuge (Rotina 46 R)	Hettich
Zentrifuge (LC Carousel Centrifuge)	Roche



## 4. Methoden

### 4.1. Zellkultur

Die erläuterten Methoden entsprechen den üblichen Vorgehensweisen am Institut für Virologie der Universität Leipzig, ähnlich stellvertretend in Krieg (2016) beschrieben.

#### 4.1.1. Zellkultivierung und Zellzahlbestimmung

Die in dieser Arbeit verwendeten RD-Zellen sind spindelförmige, vielkernige Zellen aus humanem Muskelgewebe eines 7-jährigen kaukasischen Mädchens mit einem Rhabdomyosarkom. Sie wachsen adhärent als Monolayer und eignen sich für die Detektion von Enteroviren.

Die Kultivierung erfolgte in sterilen Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Das Wachstumsmedium setzte sich aus DMEM mit Glutamax I zusammen und enthielt zusätzlich 10 % fötales Kälberserum (FKS), Penicillin (10000 U/ml) und Streptomycin (10000 µg/ml). Im Abstand von 3–5 Tagen mussten die RD-Zellkulturen für die Gewährleistung optimaler Zellwachstumsbedingungen passagiert werden. Nach Abnahme und Verwerfen des Zellkulturmediums, wurden Zellreste und FKS-Rückstände durch Spülen der Flasche mit PBS entfernt. Nach kurzer Einwirkungszeit von 0,05 %igem Trypsin EDTA lösten sich die Zellen durch die proteolytische Wirkung des Trypsins von der Flaschenwand. Die vollständig abgelösten Zellen erschienen bei der Kontrolle unter dem Lichtmikroskop abgekugelt. Das anschließend zugegebene FKS-haltige Zellkulturmedium hob die Wirkung des Trypsins auf. Das fötale Kälberserum und ein darin enthaltener Inhibitor hemmten die Protease. Überschüssige Ionen beendeten zudem die Wirkung des EDTA als Calciumbinder. Nach Resuspension der verbliebenen Zellen und Teilung in einem ausgewählten Verhältnis (z.B. 1:10), wurde erneut Wachstumsmedium hinzugegeben. Der entnommene Teil der Zellsuspension konnte für Untersuchungen wie beispielsweise Virusneutralisationstests weiterverwendet oder verworfen werden.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer und den dazugehörigen Deckgläschen. Nach Vereinzeln der Zellen wurde die Suspension zu gleichen Teilen mit Trypanblau gemischt und auf die Zählkammer gebracht. Der anionische Diazofarbstoff färbte abgestorbene Zellen blau an. Vitale Zellen erschienen unter dem Lichtmikroskop farblos, da sie den Farbstoff aktiv ausscheiden. Die vier großen Quadranten wurden ausgezählt und die Zellzahl,

da ein Quadrant 0,1 µl Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau versetzt enthielt, anschließend halbiert. Die Multiplikation mit  $10^4$  ergab die Einheit Zellen/ml.

#### **4.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Das Einfrieren von Zellen ermöglicht eine „Bevorratung“ und somit den Schutz vor Zellverlust durch z.B. Geräteausfall, Kontamination, Variabilität durch Subkultivierung oder Zellalterung. Zellkulturen können in flüssigem Stickstoff über Jahre ohne Vitalitätsverlust gelagert werden (Gstraunthaler und Lindl 2013). Entscheidend ist dabei die Einhaltung der Lagerungstemperatur von weniger als -130 °C um eine irreversibel schädigende Eiskristallbildung zu verhindern, sowie ein rasches Abkühlen und ein schnelles Auftauen der Zellsuspension (Gstraunthaler und Lindl 2013). Für die Kryokonservierung wurde den RD-Zellen eine Mischung aus 70 % Medium, 20 % FKS und 10 % des Frostschutzmittels DMSO zugesetzt.

Vor der Kryokonservierung wurde die Zellkultur auf Vitalität, Kontamination und Authentizität überprüft. Einen Tag vor dem Einfrieren erfolgte ein Mediumwechsel und die Einstellung der Suspension auf eine bestimmte Zellzahl, beispielsweise  $10^6$  Zellen/ml. Nach Zentrifugierung für 5 min bei 1200 U/min konnte das Zellpellet in Konservierungsmedium resuspendiert und zu je 1 ml aliquotiert werden. Die Abkühlung der Kryokonservierungsbehälter und des darin enthaltenen Isopropanol auf 4 °C ermöglichte ein schonendes Einfrieren. Die Aliquote wurden in der Kryobox mit einer Abkühlungsrate von 1 °C/min über Nacht bei -80 °C tiefgefroren und dann in flüssigen Stickstoff umgelagert. Es ist dabei gleich, ob die Lagerung in der Gasphase bei ca. -150 bis -160°C oder in der Flüssigphase bei -196 °C erfolgt (Gstraunthaler und Lindl 2013).

Das Auftauen der Kryoröhrchen geschah schnell durch Erhitzen auf 37 °C im Wasserbad, Zugabe von 10 ml Wachstumsmedium und erneuter Zentrifugierung für 5 min bei 1200 U/min und 4 °C (Gstraunthaler und Lindl 2013). Letzter Schritt entfernte verbliebenes Frostschutzmittel. Nach Lösung der Zellpellets in warmem FKS-haltigen Erhaltungsmedium, ruhte die Zellsuspension für die nächsten 12 h. Nach einem Mediumwechsel 24 h später konnten die Zellen wieder wie gewohnt kultiviert werden.

#### 4.1.3. Mycoplasmentest

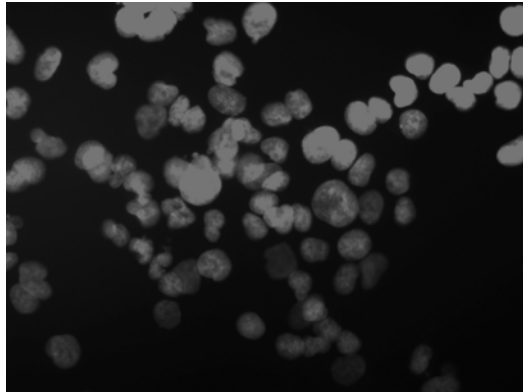
Mycoplasmen zählen zu den kleinsten, selbst replizierenden Prokaryoten (Hay et al. 1989). Der Befall von Zellkulturen ist mit einem Anteil von ca. 30 % relativ häufig. Weder durch gängige  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, noch durch herkömmliche Sterilfilter lassen sich Infektionen abwenden (Drexler und Uphoff 2002). Als die drei häufigsten Spezies seien *M. orale* (Wirtsorganismus Mensch), *M. hyorhina* (Wirtsorganismus Schwein) und *M. arginini* (Wirtsorganismus Rind) genannt (Hay et al. 1989). Mycoplasmen greifen vielfältig, aber nicht immer dramatisch in den Stoffwechsel der Zellen ein. Dies kann unter anderem zu Fehlinterpretationen von Testergebnissen führen (Drexler und Uphoff 2002). Kontaminationen mit Mycoplasmen sind nicht direkt sichtbar bzw. lichtmikroskopisch erkennbar. Infektionen derart sind dauerhaft nur sehr schwer zu vermeiden und sollten deshalb durch regelmäßige Untersuchungen (aller 1-2 Monate) ausgeschlossen werden (Drexler und Uphoff 2002). Zur routinemäßigen Testung von Zellkulturen auf Mycoplasmen-Kontamination sind mindestens zwei unabhängige Testverfahren erforderlich (Young et al. 2010). Zudem ist es ratsam, Puffer und Medien nicht gleichzeitig für unterschiedliche Kulturen zu verwenden. Vor der Testung sollte die Passage der Zellkulturen mindestens dreimal ohne antibiotikahaltige Zusätze stattfinden (Gstraunthaler und Lindl 2013).

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Fluoreszenzfärbung mycoplasmaer DNA mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33258), sowie der Nachweis von Mycoplasmen-DNA mittels PCR.

Der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33258) bindet an DNA. Mycoplasmen erscheinen dadurch im Fluoreszenzlicht als kleine, gleichmäßig geformte, hell leuchtende, teils perlchnurartig angeordnete Punkte. In einer gesunden mycoplasmenfreien Zellkultur färben sich wie in Abb. 2 nur die Zellkerne. Beim Umgang mit diesem Farbstoff sind besondere Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten, da es sich um eine interkalierende und damit mutagen und kanzerogen wirkende Substanz handelt (Gstraunthaler und Lindl 2013).

Dünn auf mehrere Deckgläschen in einer 10 mm Schale ausplattierte Zellen der ausgewählten Zellkultur, inkubierten über Nacht mit Wachstumsmedium im Brutschrank. Lag nach 24 h lichtmikroskopisch ein gleichmäßiges, fast konfluierendes Zellwachstum vor, wurde das Medium verworfen und der Zellrasen zweimalig mit PBS gespült. Für 5 min wirkte die Bisbenzimid-Gebrauchslösung (Mischung aus 1 ml eiskaltem Methanol und 4  $\mu$ l Stammlösung Hoechst 33258

(1 µg/ml)) ein. Die Zellen färbten sich und das enthaltene Methanol fixierte sie. Nach Spülen des Zellrasens mit Aqua dest. und Lufttrocknung, konnte dieser mittels Eindeckmedium auf dem Objektträger positioniert werden. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop mit Blauanregung (Wellenlänge  $\lambda = 360$  nm).



**Abb. 2** Hoechst 33258-Färbung kontaminationsfreier RD-Zellen.

Die Breite des Bildausschnitts entspricht 100 µm.

Durch die PCR lassen sich geringste Mengen fremder DNA nachweisen, jedoch werden hier keine lebenden Zellen detektiert. Neben dem Screening mit Universalprimern ist es zusätzlich möglich, durch hochspezifische Primer die Mycoplasmenspezies im Fall einer Kontamination zu identifizieren (Gstraunthaler und Lindl 2013). Falsch-positive Ergebnisse in der PCR sind aufgrund der hohen Sensitivität nicht selten (Drexler und Uphoff 2002). Beispielsweise kann das mycoplasmenfreie FKS noch DNA-Spuren enthalten obwohl keine vitalen Mycoplasmen mehr vorhanden sind.

Die PCR erfolgte nach dem Protokoll von Wong-Lee und Lovett (1993). Die verwendeten Primer MPs und MPas binden in der hochkonservierten 16s rRNA Region der Mycoplasmen-DNA und bilden ein 450 bp langes Amplifikat.

Die Testung fand für isolierte DNA aus dem Zellkulturüberstand sowie aus der Zellsuspension der zu kontrollierenden Zellkultur statt. In jedem PCR Ansatz wurde Wasser als Negativkontrolle und DNA Mycoplasmen-kontaminierter Zellen als positive Kontrolle mitgeführt. Ein Ansatz enthielt 1 µl Zellkulturüberstand und folgende Komponenten in insgesamt 25 µl:

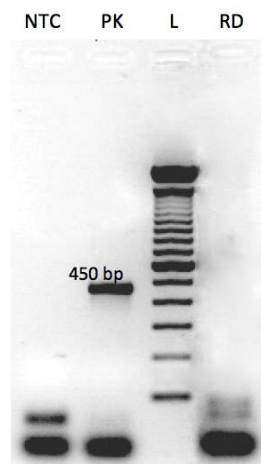
Wasser	18,4 µl
dNTPs (jedes 10 mM)	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,4 µl

10xPuffer-MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
Primer MPs (100 µM)	0,5 µl
Primer MPas (100 µM)	0,5 µl
Platinum Taq Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl

Im Thermocycler erfolgten die Denaturierung bei 95 °C für 3 min, 35 Zyklen mit jeweils 30 sek Denaturierung bei 95 °C, 30 sek Annealing bei 55 °C, sowie 1 min Elongation bei 72 °C, final die Extension für 1 min bei 72 °C und die Abkühlung auf 4 °C.

#### 4.1.4. Agarose-Gelelektrophorese und Gel-Elution

Mittels Elektrophorese auf Agarose-Gel ist es möglich DNA-Fragmente aus der Amplifikation einer PCR nach ihrer Größe aufzutrennen. Das Anlegen einer Spannung an die Elektrophorese-Kammer bewirkt, dass die Fragmente mit ihrem negativ geladenen Phosphat-Rest von der Kathode zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von ihrem Molekulargewicht ab, je kleiner desto schneller.



**Abb. 3 Analytisches Agarose-Gel zur Demonstration der Mycoplasmen-PCR.**

Spur NTC – no template control (Wasser); Spur PK – Positivkontrolle; Spur L – DNA-Längenmarker; Spur RD – zu testender RD-Zellkulturüberstand. Spezifisches Produkt Länge 450 bp. Die Entstehung einer Bande auf der Höhe von 450 bp wie bei der Positivkontrolle hätte eine Mycoplasmenkontamination der untersuchten Zellkultur bestätigt.

Für die Auftrennung der Amplifikate aus der Mycoplasmen PCR mit einer Länge von 450 bp wurde z.B. ein 2 %iges Agarose-Gel hergestellt. Erhitzen in TAE-Puffer löste die Agarose. Bei Erreichen von ca. 45 °C erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Der Farbstoff Ethidiumbromid ermöglicht die Darstellung der DNA-Fragmente im Gel unter UV-Licht. Das ausgehärtete Gel konnte in einer mit TAE-Puffer gefüllten Kammer positioniert werden. Durch Anlage eines elektrischen Feldes (120 V für 40 min), wanderten die zuvor in die Kavitäten pipettierten Proben zur Anode. Der mitgeführte DNA-Längenstandard

ermöglichte die Unterscheidung der Länge der Fragmente unter Durchleuchtung mit UV-Licht (Wellenlänge  $\lambda = 265 \text{ nm}$ ).

Die Gel-Elution war erforderlich, um bereits in einem Agarose-Gel aufgetragene PCR-Amplifikate mit der Methode nach Sanger zu sequenzieren. Das gewünschte Produkt konnte unter UV-Beleuchtung des Gels sichtbar gemacht und herausgeschnitten werden. Die Extraktion des Amplifikats erfolgte mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System.

Das ausgewählte Gelstückchen inkubierte nach Mischung mit der Membranbindungs-Lösung (Verhältnis 10 mg: 10 ml) bei 50 - 65 °C bis zur kompletten Auflösung. Dann konnte das gelöste Gel auf die SV Mini Colum gegeben werden und für 1 min bei Raumtemperatur ruhen. Nach 1 min Zentrifugierung bei 16000 x g wurde das Filtrat verworfen. Die DNA lag an die Säule gebunden vor. Es folgte der erste Waschschrift mit der Membranwaschlösung, dann eine Zentrifugierung bei 16000 x g für 1 min, der zweite Waschschrift sowie die nächste Zentrifugierung bei 16000 x g für 5 min. Die Wiederholung der Zentrifugierung sollte jegliche Ethanol-Reste aus der Membran entfernen.

Das Amplifikat konnte mit nukleasefreiem Wasser durch je 1 min Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugierung bei 16000 x g von der Membran gelöst werden. Die gelöste DNA lagerte bei - 20 °C und sollte abschließend nach Sanger sequenziert werden.

### **4.2. Herstellung von Stockvirus**

Die Herstellung von Poliovirus-Stockvirus erfolgte mit RD-Zellen. Je  $1 \times 10^7$  Zellen wurden dazu in Zellkulturflaschen ( $175 \text{ cm}^2$ ) für Poliovirus Typ 1, Typ 2 und Typ 3 ausplattiert. Nach Zugabe von Erhaltungsmedium und ca. 24 h Inkubation war unter dem Lichtmikroskop ein regelmäßiger, konfluierender Zellrasen sichtbar. Einmaliges Spülen mit PBS entfernte Serumreste. Dann erfolgte die Zugabe der Poliovirusstämme in Suspension mit FKS-freiem Medium mit einer MOI von 0,003. Nach erneuter Inkubation der Kulturflaschen im Brutschrank für 1 h konnte der Überstand verworfen und für eine optimale Virusvermehrung, Erhaltungsmedium mit vermindertem FKS-Gehalt (10 % auf 1 %) zugegeben werden. Die mit Poliovirus infizierten Kulturflaschen inkubierten im Brutschrank bei 33 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 90 % Luftfeuchte. Die reine Zellkultivierung erfolgt sonst bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und einer 5 %igen  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre. Diese veränderten Inkubationsbedingungen ermöglichten eine schonende Virus-

vermehrung und –freisetzung. Aufgrund der hohen Ausgangskonzentration der Virussuspension konnte der Überstand bei täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle schon nach 2 dpi abgenommen und bei - 80 °C als Stockvirussuspension für Poliovirus Typ 1, Typ 2 und Typ 3 eingefroren werden.

### **4.3. Titerbestimmung mittels Endpunkttitration**

Die Bestimmung des Titers eines virushaltigen Zellkulturüberstandes erfolgte mit der Endpunkttitration. Nach Ausplattieren von RD-Zellen in einer 96-well Platte ( $2 \times 10^4$  Zellen/well) in FKS-haltigem Erhaltungsmedium inkubierte die vorbereitete Platte für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchte. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle des gleichmäßigen Wachstums des Zellrasens konnte das Medium verworfen werden. Spülen des Rasens mit PBS entfernte etwaige Serumrückstände, welche die Viren inhibieren könnten. Dann erfolgte die Zugabe der zuvor vorbereiteten Virusverdünnung (in Medium ohne Zusätze von  $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$ ) im sechsfachen Ansatz für jeden Virustypen. Zur Kontrolle der Intaktheit der Zellen lief eine Zellkontrolle mit Medium ohne Virus mit. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchte wurde im Verhältnis 1:1 serumhaltiges Erhaltungsmedium zur Virusverdünnung und zur Zellkontrolle gegeben. Die Auswertung des zytopathischen Effektes (CPE) fand nach ca. 4 Tagen Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchte statt. Zu den Platten gegebenes Kristallviolett färbte vitale Zellen, also den erhaltenen Zellrasen, violett. Von Viren zerstörte Zellen blieben farblos. Der Titer wurde in TCID<sub>50</sub>/ml angegeben. Die TCID<sub>50</sub> entspricht derjenigen Virusdosis, bei der 50 % der Kavitäten vollständig infiziert sind und berechnete sich nach der Formel von Spearman und Kärber (Kärber 1931).

### **4.4. Serumproben**

Die Serumproben für die Ermittlung des Immunitätsstatus stammen von Mitarbeitern der Uniklinik Leipzig und der Sportmedizinischen Ambulanz der Universität Leipzig. Die Stichprobe setzt sich aus Mitarbeitern des Klinikums, aber auch Studenten, Doktoranden und Praktikanten zusammen. Es sind im Allgemeinen gesunde Probanden, die sich zu arbeitsmedizinischen Einstellungs-, Folge- und Entlassungsuntersuchungen bei dem Betriebsarzt vorstellten. Es wurden 530 Probanden im Alter von 18 bis 64 Jahren (zum Zeitpunkt des Materialeingangs zwischen dem 05.01.2015 und dem 15.05.2015) untersucht. Die Serumproben lagerten bei -20 °C. Vor der Testung erfolgte die Inaktivierung bei 56 °C für 30 min.

Für die retrospektive Datenerfassung war laut Bescheid der Ethik-Kommission der Universität Leipzig (Aktenzeichen 296/16-ek) keine explizite Zustimmung der Probanden zur Verwendung ihrer Seren im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit notwendig.

Die Kalibrierung des internen Referenzserums erfolgte mithilfe des WHO-Referenzserum (bereitgestellt vom NRZ PE des RKI).

#### **4.5. Virusneutralisationstest für Poliovirus**

Die Bestimmung der neutralisierenden Antikörper erfolgte mit dem Mikroneutralisationstest nach WHO-Empfehlung (World Health Organization 1997) in Anlehnung an die interne Arbeitsvorschrift des NRZ PE des RKI. Alle Seren lagerten bei - 20 °C. Die Serumverdünnung (1:4 bis 1:512, Doppelansatz) wurde zu gleichen Teilen mit Poliovirus-Typ-1, -2- und -3-Zellkulturüberständen (Impfstämme, 100 TCID<sub>50</sub>) gemischt. Nach 1 h Inkubation des Virus-Serum-Gemisches erfolgte die Zugabe von 2 x 10<sup>4</sup> RD-Zellen (in 100 µl). Die Auswertung des zytopathischen Effekts (CPE) fand nach ca. 4 Tagen Inkubation bei 37 °C statt. Zugegebenes Kristallviolett färbte einen erhaltenen Zellrasen bei nicht vorliegendem CPE violett (Zellkontrolle oder ausreichend neutralisierende Antikörper). Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit des Testsystems erfolgte in jedem Ansatz die Testung des Kontrollserums (KS) mit bekanntem Gehalt an neutralisierenden Antikörpern und parallel für die gesamte Testreihe eine Virustitration aller drei Poliovirustypen. Als antikörperhaltig galten Seren, die bei Serumverdünnung von 1:8 und höher keinen CPE zeigten, d.h. einen Titer ≥ 8 hatten.

#### **4.6. RNA- und DNA-Extraktion**

Die RNA-Isolation aus den Zellkulturüberständen erfolgte mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit für zellfreie Flüssigkeiten der Firma Qiagen. RNA bindet hierbei spezifisch an die QIAamp® Siliziumdioxid-Membran und wird dann in einem speziellen Puffer gelöst. Kontaminationen und Inhibitoren werden laut Herstellerangaben während der einzelnen Schritte vollständig entfernt. Zunächst wurden die Proben auf Raumtemperatur (15 – 20 °C) gebracht und dann mit dem Lysepuffer (AVL) (Lagerung bei 2 – 8 °C) im Verhältnis 1:5 gemischt. Durch 15sekündiges Vortexen entstand eine homogene Lösung, die dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubierte. Die im AVL-Puffer enthaltene Carrier-RNA dient der Stabilisierung der RNA, da diese erwartungsgemäß nur in geringer Konzentration vorliegt und allein sehr viel anfälliger für den Verdau durch RNasen ist. Nach Zugabe von Ethanol, als organisches Lösungsmittel, im



Verhältnis 1:2 wurde die Lösung in kleinen Fraktionen nacheinander auf die QIAamp® Mini Säule gegeben und für jeweils 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Durch die chaotropen Eigenschaften des AVL-Puffers fällte die DNA als Niederschlag aus, während die RNA an die Siliziumdioxid-Membran der Säule band. Grundlegend ist hier die Veränderung von Ladungen in Anwesenheit eines Salzes und eines bestimmten pH-Wertes. Es fanden zwei Waschschriffe statt um Unreinheiten von der Membran zu entfernen. Nach Zugabe des AW1-Puffers auf die Säule und 1 min Zentrifugierung bei 8000 U/min, folgte der AW2-Puffer mit 3 min Zentrifugierung bei 14000 U/min. 80 µl des Elutionspuffers (AVE) inkubierten 1 min auf der Säule. 1 min Zentrifugierung bei 8000 U/min löste die RNA von der Siliziumdioxid-Membran der Säule. Die isolierte RNA lagerte bei - 80 °C. In dieser Form ist sie bis zu einem Jahr stabil.

Die Isolation der DNA aus Zellkulturüberständen erfolgte mit dem MagNA Pure 96 System und dem dazugehörigen Kit (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche) für die Extraktion viraler DNA und RNA. Dabei band das zu isolierende Material spezifisch an Magnetic Beads. Ein magnetisches Feld trennte die Beads vom Überstand. Ein Elutionspuffer löste die DNA von den magnetischen Partikeln. Die DNA konnte dann als Überstand abgenommen werden.

### **4.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Vermehrung von Genfragmenten. Die PCR ähnelt den Vorgängen bei der Replikation. In sich wiederholenden Zyklen der Denaturierung, einer darauffolgenden Anlagerung von Primern und abschließenden Verlängerung (Elongation) verdoppelt sich in jedem Durchlauf das in einer Probe enthaltene genetische Material. Abhängig von Zielsequenz und Primern werden für die Schritte unterschiedliche Temperaturprofile benötigt. Die angelagerten Primer dienen als Ausgangspunkte der Elongation durch die DNA-Polymerase.

Eine quantitative Echtzeit (real time) PCR ermöglicht eine relative Quantifizierung der Kopienzahl als Vermehrung des Fluoreszenzsignals während der Amplifikation. Eine Möglichkeit ist dabei die Verwendung einer TaqMan® Sonde. Sie bindet zusätzlich zu Primern spezifisch an die zu replizierende Zielsequenz. Die Sonde ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, dem sogenannten Reporter. Ist die Sonde intakt, wird das Signal des Reporters unterdrückt. Bei der Elongation wird die Sonde hydrolysiert und der Reporter fluoresziert durch Anregung. Die Messung der Fluoreszenz für jeden Zyklus ermöglicht die relative Quantifizierung der Kopien-

zahl als Vermehrung des Fluoreszenzsignals. Wird zusätzlich ein Standard in der PCR mitgeführt, dessen Konzentration und Amplifikationsverhalten in der PCR bekannt ist, kann die amplifizierte Menge absolut quantifiziert werden.

RNA muss vor der PCR in cDNA transkribiert werden. Finden diese Reverse Transkription und PCR in einem PCR-Ansatz statt, spricht man von einem one-step Protokoll. Finden die Vorgänge in zwei getrennten Ansätzen statt, so ist es ein two-step Protokoll.

#### 4.7.1. Enterovirus-spezifische PCR (EV-PCR)

Das Enterovirus-PCR-Protokoll dient dem Screening auf Enteroviren. Die Primer „EV-1 s“ und „EV-1 as“ liegen in der 5'NTR. Die Amplifikatlänge beträgt 140 Basenpaare. Die Enterovirus-PCR ist eine one-step RT real-time PCR mit der TaqMan® Sonde „EV probe“.

Folgende Komponenten wurden mit 5 µl der Probe zu insgesamt 20 µl in der PCR eingesetzt:

Wasser (RNase-frei)	1,7 µl
2xFast MP RT-PCR Mastermix (2x)	10 µl
Primer EV-1 s (10 µM)	0,8 µl
Primer EV-1 as (10 µM)	0,8 µl
Sonde EV probe (4 µM)	1 µl
Fast RT Mix	0,2 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl

Im LightCycler® erfolgten die Reverse Transkription bei 50 °C für 20 min und anschließend die Denaturierung bei 95 °C für 5 min. Es folgten 45 Zyklen mit jeweils 15 sek Denaturierung bei 95°C, 10 sek Annealing bei 56 °C und 30 sek Elongation bei 60 °C, sowie die abschließende Kühlung auf 40 °C für 30 sek. Die Heizrate betrug durchgehend 20 °C/sek.

In der Reversen Transkription diente aus Zellkultur isolierte RNA des Coxsackie B1-Virus als positive Kontrolle. In der PCR fungiert das Plasmid pCR2.1+CoxB5 (Konzentration 10<sup>5</sup> Kopien/Reaktion (K/R)) als Eichstandard. Wasser war die Negativkontrolle.

Das Amplifikat des CoxB5-positiven Zellkulturisolates wurde zuvor in den Vektor „pCR2.1“ inkloniert und in E. coli vermehrt. Nach erfolgreicher Plasmidpräparation und Überprüfung des Klons auf Richtigkeit konnte nach photometrischer Messung der Konzentration die Anzahl der Kopien berechnet werden. Das Einsetzen einer Verdünnungsreihe des gewonnenen Plasmids von 10<sup>9</sup> K/R bis 10<sup>0</sup> K/R ermöglichte die Erstellung einer Standardkurve. Die Effizienz der Enterovirus-PCR beträgt 1,998 und der Fehler 10,4 %. Die Effizienz trifft eine Aussage darüber,

wie erfolgreich die PCR funktioniert. Im Idealfall hat sie einen Wert von 2,00, d.h. in jedem Zyklus der PCR erfolgt exakt eine Verdopplung des Amplifikats. Der Fehler sollte idealerweise unter 10 % liegen, er ist ein Wert für die Genauigkeit des Arbeitens z.B. bei der Erstellung der Verdünnungskurve und dem Pipettieren des Ansatzes.

Das Plasmid diente auch der Überprüfung der Sensitivität der PCR. Diese ist bis zu 1 Kopie/Reaktion gegeben. Die Spezifität ist durch die Bindungsstelle der Primer und Sonden in einer stark konservierten Region aller Enterovirus-Genome gewährleistet, in silico mithilfe des Programmes Geneious von Biomatters Limited überprüft und in vitro bestätigt.

#### **4.7.2. Poliovirus-spezifische PCR (PanPolio-PCR)**

Ziel der Poliovirus-spezifischen PCR ist es, mit möglichst hoher Spezifität und Sensitivität geringe Mengen Poliovirus in kurzer Zeit zu detektieren. Die verwendeten Serotyp-übergreifenden Primer „PanPolio\_s“ und „PanPolio\_as“ und die Sonde „PanPolio\_probe“ stammen von Kilpatrick et al. (2009). Sie binden in der VP1 Region des Poliovirusgenoms. Die Amplifikatlänge beträgt 103 bp. Um der hohen Variabilität und schnellen Evolution der Polioviren gerecht zu werden, ist die Verwendung sogenannter degenerierter Basen in Primern und der Sonde erforderlich (Kilpatrick et al. 2009). Das enthaltene Inosin erniedrigt die Schmelzpunkte der Primer und Sonden, sodass die Annealing-Temperatur im Protokoll im Vergleich zum herkömmlichen Protokoll für TaqMan® Polymerasen von 56 °C auf 44 °C reduziert ist (Polio Molecular Diagnostic Development Lab 2011). Außerdem ist die Elongationstemperatur von 72 °C auf 60 °C herabgesetzt und die Heizrate zwischen Annealing und Elongation von 20 °C/sek auf 0,4 °C/sek erniedrigt, um ein Schmelzen des Primer-Template Komplexes vor Eintreten der Verlängerung zu verhindern (Polio Molecular Diagnostic Development Lab 2011).

Es erfolgte eine quantitative two-step real-time RT-PCR mit TaqMan® Sonde. Im alternativen one-step Vorgehen (einstufig) war die Sensitivität der Primer mehr als zehnfach niedriger (Kilpatrick et al. 2014).

Für die Reverse Transkription (1 h bei 44 °C im Thermocycler) wurden folgende Komponenten mit 5 µl der Probe zu insgesamt 10,5 µl eingesetzt:

5x FirstStrand-Puffer (5x)	2 µl
DTT (100 mM)	0,5 µl
Primer PanPolio_as (30 pmol/µl)	1 µl
dNTPs (jedes 10 mM)	1 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
SuperScript III (200 U/µl)	0,5 µl

Im Anschluss daran konnten 2 µl der entstandenen cDNA mit folgenden Komponenten zu insgesamt 20 µl in die PCR eingesetzt werden:

Wasser	2,7 µl
10x Puffer-MgCl <sub>2</sub>	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 µM)	2,4 µl
BSA (2 mg/ml)	1 µl
Primer PanPolio_s (10 pmol/µl)	3 µl
Primer PanPolio_as (10 pmol/µl)	3 µl
Sonde PanPolio_probe (4 pmol/µl)	3 µl
dNTPs (jedes 10 mM)	0,5 µl
Platinum Taq (5 U/µl)	0,4 µl

Im LightCycler® erfolgten 50 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 95 °C, 10 sek Annealing bei 44 °C, sowie 10 sek Elongation bei 60 °C und die abschließende Kühlung auf 40 °C für 30 sek.

In der Reversen Transkription war aus Zellkultur isolierte RNA des Poliovirus Typ 1, 2 und 3 die Positivkontrolle. Die Plasmide Poliovirus Typ 1, Typ 2 und Typ 3 (Konzentration 10<sup>6</sup> K/R) galten in der PCR als Eichstandard und Positivkontrolle zugleich. Wasser war die Negativkontrolle.

### 4.7.3. Baculovirus-spezifische PCR

Die Baculovirus-PCR dient der Quantifizierung des standardmäßig als interne Kontrolle verwendeten *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* der Gruppe der Baculoviren, im weiteren Verlauf als Baculovirus bezeichnet. Stein (2014) etablierte sie im Rahmen ihrer medizinischen Promotion für die Anwendung in der Routinediagnostik humanpathogener DNA- und RNA-Viren am Institut für Virologie der Universität Leipzig. Als interne Kontrolle ermöglicht das Baculovirus die Überwachung der DNA-Extraktion und der PCR um festzustellen, ob eine Inhibition vorliegt. Die Anzucht des Baculovirus erfolgte auf SF21-Zellen. Diese inkubierten bei 35 °C mit dem Nährmedium Insectomed SF express + 10 % FKS. Nach Infektion

mit Baculovirus folgte die Zugabe von Erhaltungsmedium Insectomed SF express mit 2 % FKS. 8 dpi konnte geerntet und die DNA isoliert werden.

Es war eine real time PCR am LightCycler®. Für den Mastermix wurden zu 5 µl der Probe (isolierte DNA) folgende Komponenten zu insgesamt 20 µl gegeben:

Wasser	5,7 µl
10 x Puffer - MgCl <sub>2</sub>	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,6 µl
BSA (2 mg/ml)	1 µl
Primer Bacu 8.1 s (10 µM)	1 µl
Primer Bacu 8.1 as (10 µM)	1 µl
Sonde Bacu FL (3 µM)	1 µl
Sonde Bacu LC (3 µM)	1 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Platinum Taq (5 U/µl)	0,2 µl

Im LightCycler® erfolgte zunächst die Denaturierung bei 95 °C für 30 sek. Anschließend folgten 45 Zyklen Amplifikation mit jeweils 0 sek Denaturierung bei 95 °C, 10 sek Annealing bei 57 °C, sowie 12 sek Elongation bei 72 °C, final die Kühlung auf 40 °C für 60 sek.

Positivkontrolle waren humanpathogene Viren und Negativkontrolle Wasser. Die Quantifizierung erfolgte durch Einsetzen von Baculovirus-Plasmid (10<sup>9</sup> K/R). Die Amplifikatlänge betrug 211 bp.

### 4.8. Plasmidherstellung

Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle, die vor allem in Prokaryoten vorkommen. In Bakterien enthalten sie beispielsweise oft die genetische Information für Antibiotika-Resistenzen. Plasmide werden bei der Zellteilung an alle Tochterzellen in Kopie weitergegeben, sie können ebenso über Konjugation z.B. von einem Bakterium auf ein anderes übertragen werden. In der Wissenschaft werden Plasmide genutzt um genetisches Material zu klonieren, zu manipulieren oder aber zu transferieren (Miko 2014). Diese experimentell verwendeten Plasmide werden als Vektoren bezeichnet. DNA-Fragmente können in diese Vektoren eingebracht werden, wodurch ein rekombinantes Plasmid entsteht. Dieses Plasmid wird dann durch Transformation in ein Bakterium eingesetzt. Aufgrund der hohen Teilungsrate von Bakterien eignen sich diese besonders gut, um in kurzer Zeit eine große Menge des gewünschten Produktes herzustellen. Dieses wird dann wieder aus den Bakterien entfernt, aufgereinigt und

auf Korrektheit überprüft. Es kann anschließend z.B. als Standard in einer PCR verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Plasmide für die PanPolio-PCR hergestellt. Nach Amplifikation der VP1 Region (nt-Position 2895 – 2978) mit Primern „PanPolio\_s“ und „PanPolio\_as“ aus isolierter RNA der drei Poliovirustypen diente das spezifische Produkt für Poliovirus Typ 1, 2 und 3 als Insert für die Plasmid-Herstellung.

Die Klonierung erfolgte mit dem pGEM<sup>®</sup>-T Vector System I. Die nach der PCR durchgeführte Gelelektrophorese zeigte, ob das Amplifikat das korrekte Molekulargewicht hatte. Für die Ligation inkubierten 1,5 µl des Amplifikats mit 1,5 µl Wasser, 5 µl des 2x Rapid Ligation Buffer, 1 µl des Vektor pGEM<sup>®</sup>-T, sowie 1 µl des Enzyms T4-Ligase für 1 h bei Raumtemperatur. 2 µl des Ligationsansatzes ruhten weitere 15 min in E. coli. Die nachfolgende Transformation ermöglichte, dass der Vektor über durch Hitze einwirkung geöffnete Poren (30 sek bei 42 °C) in das Bakterium gelangt. Durch die sofortige Abkühlung auf Eis verschlossen die Poren sich wieder. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium inkubierte der Ansatz 1 h bei 350 U/min im Thermomixer. Die Bakterien bildeten mittels ihres erworbenen Plasmids die Resistenz aus. 200 µl wurden abschließend auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und getrocknet. Die Petrischale ruhte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C. Am nächsten Tag konnten gewachsene Kolonien gepickt werden und inkubierten mit 5 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C auf einer Schüttelplattform mit 220 U/min.

Die Isolation der Plasmide erfolgte mit dem QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit. 3,5 ml Medium aus Bakterienkulturröhrchen zentrifugierten für 5 min bei 4000 U/min. Die Resuspension des entstandenen Pellet fand in 250 µl P1 Puffer statt, der RNase zur Zerstörung der bakteriellen RNA sowie die Reagenz Lyse Blue zur Farbkontrolle der nachfolgenden Arbeitsschritte enthielt. Nach Zugabe von 250 µl des alkalischen Lysepuffers P2, der Zellwände und Zellmembranen der Bakterien zerstört, entstand durch sorgfältiges Mischen eine homogene, visköse, blau gefärbte Lösung. Zugegebene 350 µl des Neutralisationspuffer N3 und gründliches Mischen entfärbten die Lösung wieder. Das alkalische Milieu bewirkte eine Strukturveränderung der zellulären DNA, sodass diese sich bei der folgenden Zentrifugierung für 10 min bei 13000 U/min mit Zellmembran- und Zellwandbestandteilen sowie Proteinen als Pellet absetzte. Der Überstand mit den zirkulierenden Plasmiden wurde dann auf die saubere Säule gegeben und für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Nach dem Prinzip der Säulenchromatografie lagen die Plasmide an die Membran gebunden vor. Um Pufferreste und Verunreinigungen zu entfernen

zentrifugierte die Säule nach Zugabe von 500 µl PB Puffer und anschließend 750 µl des PE Puffers jeweils für 1 min bei 13000 U/min. Nach Hinzufügen von 50 µl des Elutionspuffers inkubierte die Säule für 1 min bei Raumtemperatur. Die von der Membran gelöste Plasmid DNA sammelte sich durch Zentrifugierung bei 13000 U/min für 1 min im Elutionspuffer und wurde bei - 20 °C eingefroren. Die Bestimmung der Konzentration der Plasmid DNA Isolate erfolgte photometrisch.

Durch Sequenzierung nach Sanger mittels Kapillarelektrophorese konnte die Plasmid DNA abschließend auf Korrektheit überprüft werden. Die Sanger-Sequenzierung, Dideoxymethode oder auch Kettenabbruchmethode ist ein herkömmliches Verfahren in der Biochemie und Genetik, welches die Bestimmung der Basenabfolge eines DNA-Abschnittes ermöglicht (Thermo Fisher Scientific Inc 2016). Es findet eine in-vitro Replikation des DNA-Moleküls statt. DNA-Polymerasen kopieren die DNA-Einzelstränge. Die Kettenverlängerung erfolgt am 3'OH-Ende des passenden Primers. Dieses Oligonukleotid bindet an eine bekannte Sequenz des DNA-Moleküls. Die Verlängerung erfolgt mit dNTPs entsprechend der komplementären Basenpaarung vom 5'- zum 3'-Ende. Der synthetisierte Strang ist durch Phosphorsäurediester-Brücken verknüpft. Wird zufällig ein ddNTP eingebaut, so erfolgt ein Kettenabbruch. Es entstehen Syntheseprodukte unterschiedlicher Länge, die kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Dideoxynukleotide sind für jede Base mit einem anderen Farbstoff markiert und werden während der Elektrophorese mit einem Laser angeregt. Eine Kamera detektiert die Lichtsignale und eine Software wandelt diese wieder in eine Basenabfolge um.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem Big Dye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit und dem Primer „M13for“. Folgende Komponenten wurden mit 500 ng des Plasmids zu insgesamt 10 µl eingesetzt:

BigDye v1.1	4 µl
Primer M13for (10 µM)	1 µl
HLPC Wasser	abhängig vom Volumen der Lösung mit 500 ng Plasmid

Im Thermocycler fand die Denaturierung bei 95 °C für 2 min statt. Darauf folgten 25 Zyklen mit jeweils 30 sek Denaturierung bei 95 °C, 15 sek Annealing bei 55 °C und 4 min Elongation bei 60 °C und die abschließende Kühlung auf 4 °C.

Das DyeEx®2.0 Spin Kit diente der Aufreinigung der Produkte der Sequenzierreaktion. Durch Vortexen und Zentrifugieren bei 2700 U/min für 3 min wurden die mitgelieferten Säulen vorbereitet. Nach Zugabe des Sequenzierproduktes trockneten die Säulen für 15 min im Zentrifugal-Vakuumkonzentrator (SpeedVac). Das in 20 µl HiDi Formamid gelöste Eluat konnte für die Kapillarelektrophorese in eine mit Polymer gefüllte Kapillare injiziert werden. Durch eine angelegte Spannung wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente durch das Polymer zur positiven Elektrode und trennten sich nach ihrem Molekulargewicht auf. Die Kapillaren passierten dabei einen Laser, der die basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffe angeregte. Jeder der vier Farbstoffe emittierte nach Anregung durch den Laser Licht einer anderen Wellenlänge als optisches Signal, das der Apparat nach Digitalisierung als genaue Basenabfolge dokumentierte.

Nach Überprüfung des Klons auf Richtigkeit im Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) konnte mithilfe der photometrisch gemessenen Konzentration der Plasmidlösung die Anzahl der enthaltenen Kopien berechnet werden. Die Plasmidgröße in Basenpaaren entsprach dabei der Summe aus der Länge des Inserts und der Länge des Vektors. Die durchschnittliche molare Masse eines Basenpaares beträgt 660 g/mol, 1 mol entspricht einer Menge von  $6 \times 10^{23}$  Molekülen und 1 ng entspricht  $1 \times 10^9$  g. Daraus ergab sich dann folgende Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der Kopien}}{\mu\text{l Plasmidlösung}} = \frac{6,022 \times 10^{23} \left( \frac{\text{Kopien}}{\text{mol}} \right) \times \text{Konzentration der Plasmidlösung} \left( \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right)}{\text{Plasmidgröße (bp)} \times 10^9 \left( \frac{\text{ng}}{\text{g}} \right) \times 660 \left( \frac{\text{g/mol}}{\text{bp}} \right)}$$

## 4.9. Flusswasseruntersuchung

### 4.9.1. Konzentrierung des Flusswassers

Die Konzentrierung von Flusswasser mit dem Ziel Polioviren anzureichern erfolgte in dieser Arbeit mit einer Filtrationsmethode. Polioviruspartikel haben einen Durchmesser von durchschnittlich 30 nm. Die Filtrationsmethode basiert auf einem etablierten Vorgehen von Arbeitsgruppen des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) Leipzig in Anlehnung an das Protokoll der Marine Biological Association (2006).

Die Probennahme für diese Arbeit erfolgte im Oktober 2014 durch verschiedene Arbeitsgruppen des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig und Magdeburg im Rahmen einer Stichtagsbeprobung zur Untersuchung anthropogener Einflüsse auf den Fluss Holtemme an den in Abb. 4 weiß markierten Orten 1 bis 13. Die Spikeversuche wurden mit zusätzlich an



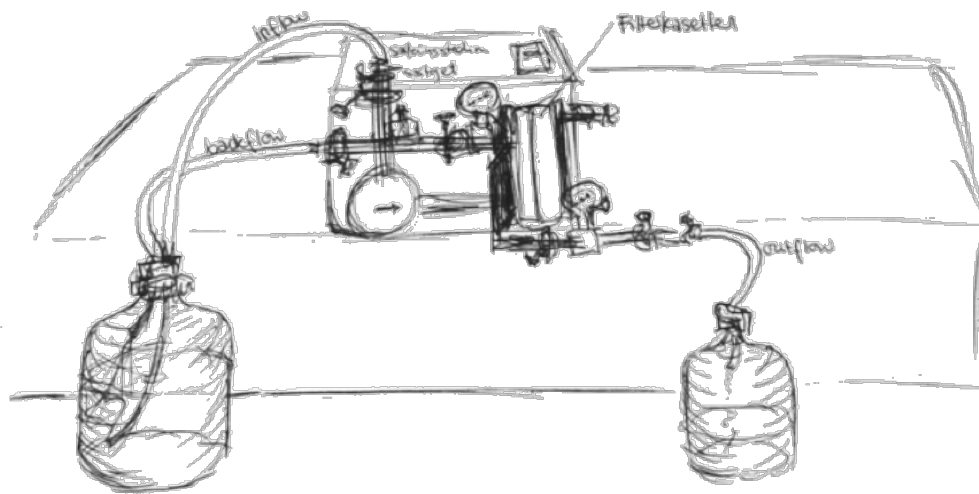
Standort 5 entnommenem Wasser durchgeführt. Die Standorte konnten anhand ihrer Landnutzung in naturnah, urban und landwirtschaftlich eingeteilt werden. Die zwei ersten Standorte spiegelten hierbei einen weitestgehend ursprünglichen Zustand wider, wobei sich zwischen beiden Standorten ein Unternehmen zur Batterieherstellung (Werbat Wernigeröder Batterie GmbH) befand. In Wernigerode (Standort 3) war der erste urbane Standort. Das Gebiet zwischen Wernigerode und Halberstadt wurde intensiv landwirtschaftlich genutzt, wohingegen nach Halberstadt extensive Landwirtschaft betrieben wird und renaturierte Bereiche zu finden sind. Abwässer urbaner Regionen enthalten u.a. Haushaltsprodukte, Kosmetika und Pharmazeutika. Einleitungen durch Klärwerke erhöhen hierbei vor allem die Vielfalt und Dichte der mikrobiellen und viralen Flora. Landwirtschaftlich genutzte Regionen sind v.a. durch den Eintrag hoher Nitrat- und Phosphatkonzentrationen gekennzeichnet. Mikrobielle und virale Gemeinschaften von Fließgewässern sind derzeit nicht ausreichend erforscht. Die Beprobung der Holtemme dient daher als Beispiel, wie verschiedene anthropogene Einflüsse auf Struktur, Diversität und Interaktionen dieser Gemeinschaften wirken.



**Abb. 4 Standorte der Probennahme für den Nachweis von Polio- und Enteroviren in Flusswasser.**

An den Standorten 1–13 wurden jeweils 10 l Flusswasser entnommen. Die Spikeversuche erfolgten mit Flusswasser des fünften Standortes. Bereits vorliegende und durch das UFZ zur Verfügung gestellte RNA wurde mittels Enterovirus- und PanPolio-PCR getestet. Kartendaten: Google, GeoBasis – DE/BKG.

Ein Sieb (Porengröße 30 µm) entfernte grobe Verschmutzungen aus den aufgefangenen 10 l Flusswasser. Die Skizze in Abb. 5 zeigt den verwendeten Aufbau und allgemeinen Ablauf der ersten Konzentrierung mittels Tangentialflussfiltration.



**Abb. 5 Schemazeichnung des Filtrationssystems zur Konzentrierung von Flusswasserproben.**

Das System bestand aus einer Pumpe (Sartorius Stedim Sartojet Pumpe) mit einem Zufluss von der linken Seite (inflow), einem Rückfluss (backflow) zum selben Behälter auf der linken Seite und einem Abfluss (outflow) in einen Behälter auf der rechten Seite der Anlage. Nach Durchdringen der vertikal eingespannten Filterkassetten unterschiedlicher Porengröße (200 nm und 30 kDa) in der markierten Flussrichtung (Pfeil nach rechts) bei einem Systemdruck von 0,5 - 1 bar, konnte das konzentrierte Volumen aufgefangen werden.

Nach Spülung der 200 nm Filterkassette mit 5 l Aqua dest. zur Entfernung von Rückständen der Desinfektionslösung (spezielle alkoholhaltige Lösung, in der die Kassetten zwischen verschiedenen Testreihen eingeweicht wurden) konnte das Flusswasser (10 l) über den Zufluss dem System zugeführt werden. Alle Bestandteile > 200 nm sollten den Filter nicht passieren und als „erster Rückfluss“ über den Rückfluss wieder in das Ausgangsbehältnis gelangen. Alle Partikel < 200 nm sammelten sich als „erstes Filtrat“ über den Abfluss in einem sauberen Gefäß. Nach erneuter Spülung der 200 nm Kassette mit 5 l Aqua dest. („erste Waschflüssigkeit“), konnte die 30 kDa Kassette eingespannt und ebenso mit 5 l Aqua dest. gespült werden.

Die Filterkassette hielt Bestandteile > 30 kDa des wieder zugeführten ersten Filtrates zurück und sammelte diese über den Rückfluss im angeschlossenen Gefäß. Dieses „zweite Filtrat“ entsprach dem konzentrierten Flusswasser mit Bestandteilen der Größe 30 kDa–200 nm mit einem von eingangs 10 l auf ca. 300 - 400 ml reduzierten Volumen. Zum Schluss erfolgte die Spülung der 30 kDa Kassette mit 5 l Aqua dest. („zweite Waschflüssigkeit“). Zu Analysezwecken wurden der „erste Rückfluss“ und die „erste“ und „zweite Waschflüssigkeit“ aufgefangen.

Die zweite Konzentrierung erfolgte mittels Zentrifugierung bei 22000 U/min für 2 h. Dabei setzten sich die molekularen Bestandteile, auch die aufgefangenen Viruspartikel, aufgrund unterschiedlicher Sedimentationseigenschaften als Pellet ab. Das in 500 µl TM-Puffer gelöste Pellet lagerte bis zur weiteren Verarbeitung bei 8 °C im Kühlschrank.

#### **4.9.2. Isolation und Identifikation der Viren**

Die RNA-Isolation aus den konzentrierten Proben erfolgte mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit der Firma Qiagen. Die gelöste RNA lagerte bei - 80 °C. Nach Testung der Proben in der Enterovirus- und PanPolio-PCR sollten positive Amplifikate nach Nix et al. (2006) sequenziert werden. Die verwendeten Primer sind Enterovirus-spezifisch und binden in der VP1 Region. Zusätzlich erfolgte eine Gelelektrophorese. Abschließend sollten die Isolate durch Vergleich in der Datenbank BLAST identifiziert werden.

#### **4.9.3. Validierung der Methode zum Poliovirusnachweis im Flusswasser**

Zur Bestimmung der Sensitivität der Methode für den Nachweis von Polioviren in Flusswasser wurden je 10 l Fluss- und Reinstwasserproben stellvertretend mit definierten Mengen Poliovirus Typ 1 und Baculovirus versetzt und die Wiederfindungsrate nach Durchlaufen des Protokolls bestimmt. Dieses Vorgehen wird als sog. Spikeversuch abgeleitet vom Englischen „to spike something“ bezeichnet, was so viel bedeutet wie „mit etwas versetzen“. Ziel war es, die zugegebenen Virusmengen nach Konzentrierung des Wasservolumens und Extraktion der RNA bzw. DNA in der PCR zu detektieren.

Poliovirushaltige Zellkulturüberstände verschiedener Konzentrationen lagerten bei - 80 °C. Hitzeinaktivierung der Überstände bei 56 °C für 30 min diente dem Infektionsschutz. Nach erfolgter RNA-Isolation erfolgte die Bestimmung des Virusgehaltes der Proben in der PanPolio-PCR.

Um inhibierende Faktoren des Flusswassers, wie beispielsweise den Verdau von RNA durch RNasen zu detektieren wurde in den Tests zusätzlich ein DNA-Virus, das Baculovirus zugesetzt. Die Resultate sollten mit denen für Polioviren verglichen werden. Die Extraktion der DNA, sowie der Nachweis in der PCR sind für das Baculovirus standardisiert und gut erprobt. Da das Baculovirus nicht humanpathogen ist, entfiel die Hitzeinaktivierung. Zur Analyse des Konzentrierungsverfahrens unabhängig von Eigenschaften des Flusswassers, erfolgten die Spikeversuche für Poliovirus Typ 1 auch mit Reinstwasser.

Zusätzlich definiert sich die Sensitivität der Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser darüber, inwiefern sie in der Lage ist, infektionsgefährdende Konzentrationen von Polioviren in der Umwelt nachzuweisen. Für wasserübertragene Erreger gelten laut WHO Risiken von 1 infizierten Person/10000 Einwohner/Jahr bei täglicher Aufnahme von 2 l Trinkwasser (World Health Organization 2004a) und 1 infizierte Person/1000 Schwimmer/Jahr bei einer durchschnittlichen Wasseraufnahme von 100 ml/Schwimmaktion/Person/Tag (Botzenhart 2013) als akzeptabel. In Risikokalkulationen fließt zudem die minimale infektiöse Dosis (MID) von Polioviren mit 10–100 infektiösen Viruspartikeln und der Manifestationsindex von Poliovirusinfektionen von 1 % ein (Botzenhart 2013). Von der MID und dem akzeptablen Infektionsrisiko ausgehend, sollten notwendigerweise 1,1 m<sup>3</sup> Trinkwasser (bei täglicher Aufnahme von 2 l) frei von Poliovirus Typ 1 sein. Basierend auf diesen Informationen erfolgte die Einordnung der Ergebnisse der Spikeversuche.

### **4.10. Statistische Methoden**

Die Auswertung der erhobenen Daten und Messergebnisse, sowie die Erstellung von Diagrammen erfolgten mit Microsoft® Excel für Mac 2011 und dem Statistik- und Analyseprogramm IBM® SPSS Statistics (Version 23).

Das Histogramm mit Normalverteilungskurve diente der Darstellung der Häufigkeitsverteilung von Alter und Geschlecht in der untersuchten Probandengruppe. Das arithmetische Mittel, bzw. für Titer das geometrische Mittel mit der dazugehörigen Standardabweichung charakterisieren die Ausprägung betrachteter metrisch skalierten Merkmale (Löffler 2004a, Löffler 2004b). Die Titer wurden für einen Teil der statistischen Auswertung logarithmiert.

Der Vergleich der geometrischen Mittelwerte der Titer verschiedener Altersgruppen bzw. Geschlechter erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (Nullhypothese: Es liegt kein signifikanter Unterschied vor.). Ein p-Wert < 0,05 deutet auf einen signifikanten Unterschied hin (Löffler 2004a, Löffler 2004b).

Zur Untersuchung des Einflusses des Alters und des Geschlechts auf die Titer der Probanden wurde eine multiple lineare Regression durchgeführt. Das ermittelte R-Quadrat gibt dabei an, welcher Anteil der Varianz der abhängigen Variable (Titer) durch das Modell erklärt werden kann (Löffler 2004a, Löffler 2004b). Ein R<sup>2</sup> nahe 0 deutet mithin auf eine geringe, ein R<sup>2</sup> nahe 1 auf eine sehr hohe Erklärungskraft hin. Die Erklärungskraft des Gesamtmodells wird mittels

eines F-Tests überprüft (Nullhypothese: Das Modell hat keine Erklärungskraft). Ein p-Wert < 0,05 deutet demnach auf Erklärungskraft des Gesamtmodells hin. Für die erklärenden Variablen (Alter, Geschlecht) erfolgten t-Tests (Nullhypothese: Koeffizient=0). Ein p-Wert < 0,05 deutet auf einen signifikanten Zusammenhang zur abhängigen Variable (Titer) hin.

Das 95 %-Konfidenzintervall der Seroprävalenzraten für Altersgruppen und Poliovirustypen entspricht der Spannbreite, in der mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit der wahre Wert der Grundgesamtheit liegt (Löffler 2004a, Löffler 2004b). Das Nicht-Überlappen der Konfidenzintervalle deutet auf einen signifikanten Unterschied (5 %-Signifikanzniveau) zwischen betrachteten Gruppen hin.

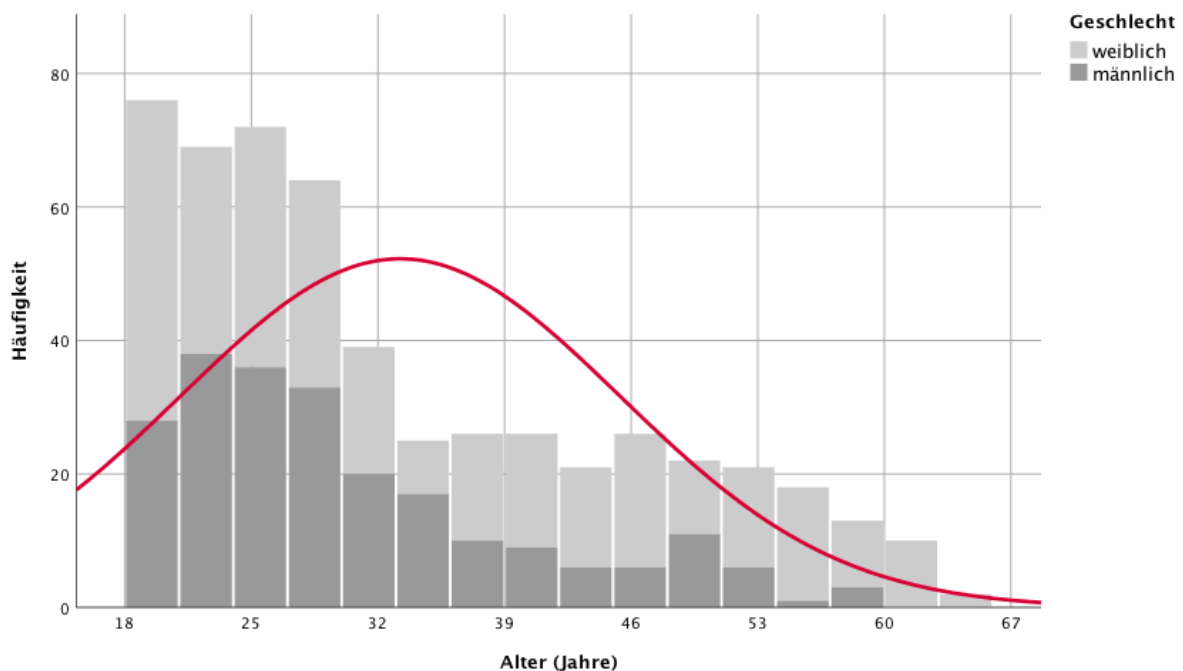
Mithilfe des Binomialtests wurde geprüft, inwiefern die Seroprävalenzraten der Altersgruppen für verschiedene Poliovirustypen Immunitätslevel von 95 % überschreiten (Nullhypothese: Seroprävalenz  $\leq$  95 %). Ein p-Wert < 0,05 deutet auf ein signifikantes Überschreiten der 95 % hin.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Immunitätsstatus der untersuchten Probanden

#### 5.1.1. Deskriptive Auswertung der Serumproben

Von insgesamt 843 Seren entsprachen 530 der gewählten Altersgruppe von 18–64 Jahren. Für die Auswertung erfolgte die Dokumentation des Geschlechts und des Geburtsdatums der Probanden. Das Durchschnittsalter der Untersuchten zum Zeitpunkt des Materialeingangs betrug 32,74 Jahre.



**Abb. 6** Verteilung des Alters der untersuchten Probandengruppe (n = 530).

Rot – Normalverteilungskurve.

Die Abweichung der Balkenhöhe von der roten Kurve in Abb. 6 zeigt, dass das Alter in der untersuchten Probandengruppe (n = 530) nicht normalverteilt war und insbesondere jüngere Probanden stärker repräsentiert sind (sog. rechtsschiefe Verteilung).

Wie auch in Untersuchungen von Diedrich und Schreier 1995, Diedrich et al. 2000 und Diedrich et al. 2002 für Deutschland erfolgte eine Unterteilung der Probanden in ähnlich große Altersgruppen (Tab. 1) um eventuelle vorliegende Unterschiede darzustellen. 42,3 % (n = 224) der Untersuchten waren männlich und 57,7 % (n = 306) weiblich.

**Tab. 1 Zusammensetzung der Stichprobe für die Untersuchung des Antikörperstatus nach Altersgruppen und Geschlecht (n = 530).**

Altersgruppe in Jahren	Geschlecht	
	männlich	weiblich
% der Altersgruppe (Anzahl)		
18 - 24	46,9 % (75)	53,1 % (85)
25 - 31	49,3 % (74)	50,7 % (76)
32 - 38	54,1 % (33)	45,9 % (28)
39 - 45	31,0 % (18)	69,0 % (40)
46 - 52	37,3 % (19)	62,7 % (32)
≥ 53	10,0 % (5)	90,0 % (45)
Gesamt	42,3 % (224)	57,7 % (306)

Um vermutete Veränderungen der Titer mit steigendem Alter und mögliche Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Probanden zu untersuchen, wurden aus den 530 Seren aus den Altersgruppen 39 bis 45 Jahre ( $n_{39-45 \text{ Jahre}} = 47$ ; 51,6 %; Mittelwert: 42,06 Jahre) und älter als 53 Jahre ( $n_{\geq 53 \text{ Jahre}} = 44$ ; 48,4 %; Mittelwert: 57,07 Jahre) nochmals 91 Probanden zufällig ausgewählt. 19,8 % von ihnen waren männlich ( $n_m = 18$ ) und hauptsächlich der jüngeren Altersgruppe zuzuordnen ( $n_{m,39-45 \text{ Jahre}} = 16$ ;  $n_{m,\geq 53 \text{ Jahre}} = 2$ ) und 80,2 % weiblich ( $n_w = 73$ ;  $n_{w,39-45 \text{ Jahre}} = 31$ ;  $n_{w,\geq 53 \text{ Jahre}} = 42$ ).

### 5.1.2. Seroprävalenz neutralisierender Antikörper

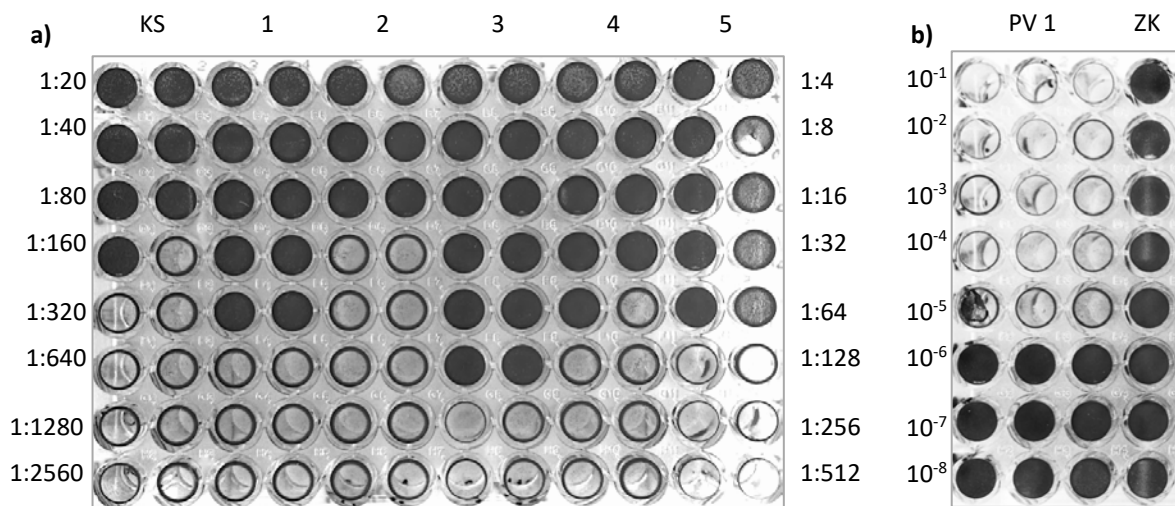
Durch das Mitführen eines Kontrollserums, die Titration des verwendeten virushaltigen Zellkulturüberstandes, sowie die Beurteilung der nicht infizierten Zellkontrollen, konnte die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für die Neutralisationstiter gegen Polioviren gewährleistet werden.

Die in Endpunkttitrationen ermittelten Titer der verwendeten Stockviruszellkulturüberstände betragen für Poliovirus Typ 1  $1,93 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml, Poliovirus Typ 2  $5,32 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml und Poliovirus Typ 3  $9,28 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml. In jeder Versuchsreihe erfolgte die Virustitration der eingesetzten virushaltigen Zellkulturüberstände. Die geometrischen Mittelwerte der Titer (GMTs) lagen für Poliovirus Typ 1 bei  $7,28 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml (SD  $1,94 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml), für Poliovirus Typ 2 bei  $1,96 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml (SD  $5,54 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml) und für Poliovirus Typ 3 bei  $2,18 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml (SD  $1,28 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml). Die experimentellen Schwankungen waren vertretbar.

Jeder Virusneutralisationstest erfolgte für die Seren der Probanden sowie parallel dazu für das Kontrollserum. Bei der Kalibrierung des Kontrollserums mithilfe des Referenzserums der WHO konnten die vorgegebenen Referenzwerte für neutralisierende Antikörper gegen alle drei Poliovirustypen (Sabin) bei mehrfacher Testung eingehalten werden. Die Schwankungen der Titer des Kontrollserums im Vergleich zur Referenz waren vertretbar. Die geometrischen Mittelwerte der Titer (GMTs) des Kontrollserums lagen gegen Poliovirus Typ 1 bei 273,39 (SD 131,32), gegen Poliovirus Typ 2 bei 469,08 (SD 246,15) und gegen Poliovirus Typ 3 bei 777,90 (SD 408,30).

Die mitgeführten Zellkontrollen, d.h. RD-Zellen ohne Infektion mit Poliovirus, zeigten in keinem der Versuche einen CPE.

Für den Vergleich der Titer zwischen Probanden unterschiedlicher Altersgruppen (n = 91) erfolgte der Virusneutralisationstest mit Serumverdünnungen von 1:4 bis 1:512, für die übrigen der insgesamt 530 untersuchten Seren mit Serumverdünnungen bis 1:32. Die Abb. 7 a) zeigt beispielhaft einen mit Kristallviolett eingefärbten VNT Ansatz zur Auswertung, die Abb. 7 b) die intakte Zellkontrolle (ZK) und die Titration der Poliovirus Typ 1 Lösung (PV 1) (Titer:  $2,0 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml).



**Abb. 7 a) Virusneutralisationstest und b) Virustitration Poliovirus Typ 1.**

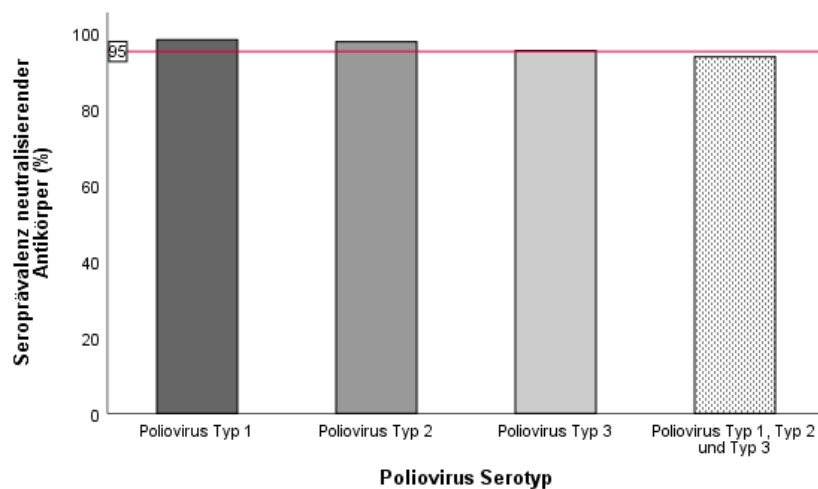
a) VNT für 5 Probanden und das Kontrollserum (KS): Es erfolgte jeweils ein doppelter Ansatz in den nebeneinander liegenden Spalten. KS: Verdünnungsstufen 1:20–1:2560, Titer des KS beträgt 120 (GMT: 273,39; SD 131,32). Probandenserum verdünnt von 1:4–1:512. Titer  $\geq 8$  protektiv gegen Polioviren.

b) Virustitration Poliovirus Typ 1 Zellkulturüberstand und Zellkontrolle (ZK): Der Titer der Poliovirus Typ 1 Lösung beträgt  $2,0 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml (GMT:  $7,28 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml; SD:  $1,94 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml). Zellkontrolle intakt.



Die Testung des Kontrollserums (KS) (Verdünnungsstufen 1:20–1:2560) und der Probandenserum 1–5 (Verdünnungsstufen 1:4–1:512) im Doppelansatz auf das Vorhandensein neutralisierender Antikörper gegen das Poliovirus Typ 1 (Sabin) ergab folgende Titer: KS – 120, Proband 1 – 64, Proband 2 – 128, Proband 3 – 128, Proband 4 – 48 und Proband 5 – 64. Ein Titer von  $\geq 8$  galt als protektiv, also ausreichend neutralisierend gegen Polioviren. Damit wiesen alle getesteten Seren ausreichend neutralisierende Antikörper gegen Poliovirus Typ 1 (Sabin) auf. Bei einem Titer von 512 wurde, um der Tatsache gerecht zu werden, dass der Titer genau 512 oder aber auch weit höher als 512 sein konnte, für die Auswertung ein Neutralisationstiter von 1024 angenommen. VNTs mit Verdünnungsreihen von 1:4–1:32 sollten lediglich zeigen, ob Seren den Cut-Off Titer  $\geq 8$  erreichten, der genaue Titer wurde nicht bestimmt.

Von den 530 untersuchten Seren wiesen 93,6 % ( $n = 496$ ; 95 % - KI: 91,5 % - 95,7 %) ausreichend neutralisierende Antikörper (Titer  $\geq 8$ ) gegen Poliovirus Typ 1, 2 und 3 auf. Gegen die einzelnen Typen waren es gegen Typ 1 98,1 % (95 % - KI: 96,7 % - 99,3 %), Typ 2 97,6 % (95 % - KI: 96,2 % - 98,9 %) und Typ 3 95,3 % (95 % - KI: 93,5 % - 97,1 %), wobei alle Werte signifikant über 80 % (Sauerbrei et al. 2004, Diedrich und Schreier 2007) lagen ( $p < 0,000$ ).



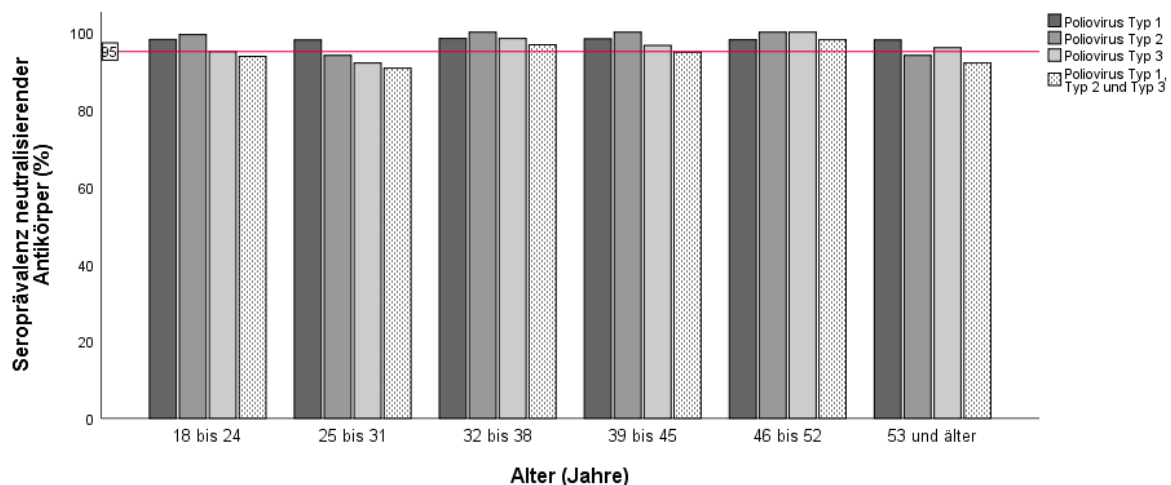
**Abb. 8 Prävalenz neutralisierender Antikörper gegen Poliovirus Typ 1, 2 und 3 gesamt.**

Dargestellt sind die Seroprävalenzen neutralisierender Antikörper (%) gegen Poliovirus Typ 1, 2 und 3 für die gesamte Stichprobe, wobei die Werte für PV1 und PV2 signifikant über 95 % liegen ( $p_{PV1} = 0,0002$ ;  $p_{PV2} = 0,0024$ ).  $n = 530$ ; PV 1 = 98,1 % (95 % - KI: 96,7 % - 99,3 %); PV 2 = 97,6 % (95 % - KI: 96,2 % - 98,9 %); PV 3 = 95,3 % (95 % - KI: 93,5 % - 97,1 %); PV 1, 2 und 3 = 93,6 % (95 % - KI: 91,5 % - 95,7 %). Rot – 95 % - Seroprävalenz.

Die Seroprävalenzen neutralisierender Antikörper gegen Poliovirus Typ 1 ( $p = 0,0002$ ) und Poliovirus Typ 2 ( $p = 0,0024$ ) überschritten signifikant die aktuell geforderten Immunitätslevel von 95 % (Abb. 8, rote Markierung) (Fine 1993, Robert Koch Institut 2012, Robert Koch Institut 2017, Robert Koch Institut 2018a). Für Poliovirus Typ 3 lag die Seroprävalenz nicht signifikant

über 95 % ( $p = 0,43$ ). Das Konfidenzintervall der Seroprävalenz gegen alle drei Poliovirustypen gesamt überschritt mit 91,5 % - 95,7 % zwar die 95 % Grenze, es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die Seroprävalenz signifikant höher als 95 % war ( $p = 0,085$ ). Wie die Lage der 95 % - Konfidenzintervalle (95 % - KI) weiterhin verdeutlicht, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Seroprävalenzen gegen die einzelnen Poliovirustypen festgestellt werden. Einzig die Prävalenz neutralisierender Antikörper gegen Poliovirus Typ 1 war signifikant (5 %- Signifikanzniveau) höher als die gegen alle drei Poliovirustypen.

Abb. 9 zeigt die Seroprävalenzen neutralisierender Antikörper in den unterschiedlichen Altersgruppen, wobei alle Werte 80 % (Sauerbrei et al. 2004, Diedrich und Schreier 2007) signifikant ( $p < 0,05$ ) überschritten. Das niedrigere Signifikanzniveau im Vergleich zur gesamten Stichprobe konnte hier durch die Unterteilung der großen in kleinere Stichproben bedingt sein. Auch die 95 %-Konfidenzintervalle der einzelnen Seroprävalenzen wurden mit kleinerer Stichprobe tendenziell größer. Die Seroprävalenzen gegen alle drei Serotypen gesamt lagen zwischen 90,7 % (95 % - KI: 86 % - 95,4 %) in der Gruppe 25-31 Jahre und 98,0 % (95 % - KI: 94,1 % - 100 %) in der Gruppe 46-52 Jahre.



**Abb. 9 Prävalenz neutralisierender Antikörper gegen Polioviren Typ 1, 2 und 3 nach Altersgruppen.**

Gezeigt sind die Seroprävalenzen neutralisierender Antikörper gegen Poliovirus Typ 1, 2 und 3 in den Altersgruppen 18 bis 24, 25 – 31, 32 -38, 39 – 45 und  $\geq 53$  Jahre. Die Werte für ausreichende Neutralisationstiter gegen alle Serotypen liegen zwischen 90,7 % (95 % - KI: 86 % - 95,4 %) und 98,0 % (95 % - KI: 94,1 % - 100 %) variieren jedoch zwischen einzelnen Serotypen. Signifikant über 95 % lagen für PV1 die 18–24-Jährigen ( $p = 0,039$ ), für PV2 die 18–24-Jährigen ( $p = 0,003$ ) und die 32–38-Jährigen ( $p = 0,044$ ). Signifikant unter 95 % lagen für PV1, 2 und 3 die 25–31-Jährigen ( $p = 0,019$ ). Rot – 95%–Seroprävalenz.

Für Poliovirus Typ 1 erreichte jede Altersgruppe Seroprävalenzen über 95 %, wobei nur die 18–24-Jährigen mit 98,1 % (95 %-KI: 96,0 %-100 %) die 95 % (Abb. 9, rote Markierung) signi-

fikant ( $p = 0,039$ ) überschritten. Bei den Seroprävalenzen ausreichend neutralisierender Antikörper gegen Poliovirus Typ 2 zeigte sich, dass die 18–24-Jährigen (99,4 %; 95 %-KI: 98,1 %–100 %;  $p = 0,003$ ), sowie die 32–38-Jährigen (100,0 %; 95 %-KI: 100,0 %;  $p = 0,044$ ) Werte signifikant über 95 % hatten. Die Gruppe der 39–52-Jährigen erreichte über 95 %, die 25–31-Jährigen und  $\geq 53$ -Jährigen unter 95 %, wobei keine Signifikanz (5 %-Signifikanzniveau) gezeigt werden konnte. Gegen Poliovirus Typ 3 wiesen alle Altersgruppen bis auf die 25–31-Jährigen Seroprävalenzen über 95 % auf, dabei lagen keine signifikanten Werte vor. Im überwiegenden Teil der Altersgruppen unterschritten die Seroprävalenzen gegen alle drei Poliovirustypen gesamt 95 %, von den 25–31-Jährigen wiesen mit 90,7 % signifikant weniger als 95 % ( $p = 0,019$ ) ausreichend neutralisierende Antikörper gegen alle drei Serotypen zugleich auf.

Insgesamt konnte für weniger als die Hälfte der in Abb. 9 dargestellten Seroprävalenzen der Altersgruppen ein signifikantes Überschreiten der aktuell geforderten 95 % Immunitätslevel (Fine 1993, Robert Koch Institut 2012, Robert Koch Institut 2017, Robert Koch Institut 2018a) gezeigt werden.

Für Poliovirus Typ 1, Typ 3 und gegen alle drei Poliovirustypen lagen entsprechend der 95 %-Konfidenzintervalle keine signifikanten (5 %-Signifikanzniveau) Unterschiede zwischen den Altersgruppen vor. Die Seroprävalenz neutralisierender Antikörper gegen Poliovirus Typ 2 der 25–31-Jährigen (94,0 %; 95 % - KI: 90,2 % - 97,8 %) war signifikant niedriger als die Seroprävalenzen der jüngeren und älteren Probanden, wick jedoch nicht signifikant von den Werten der  $\geq 53$ -Jährigen (94,0 %; 95 % - KI: 87,2 % - 100 %) ab. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Poliovirustypen festgestellt werden. Die Seroprävalenzen gegen Poliovirus Typ 2 schienen innerhalb der meisten Altersgruppen höher als gegen Poliovirus Typ 1 und Typ 3 zu sein. Die Seroprävalenzen gegen Poliovirus Typ 3 lagen zudem überwiegend niedriger als gegen Poliovirus Typ 1.

34 der untersuchten Probanden (6,4 %) wiesen unzureichend neutralisierende Antikörper gegen alle drei Poliovirustypen auf. Zwei Probanden (0,4 %) hatten gegen keinen der Poliovirustypen einen ausreichenden Titer. Für 30 der nicht ausreichend gegen Polioviren geschützten Probanden konnte retrospektiv eine Impfanamnese erhoben werden. Aus der Dokumentation beim Betriebsarzt ging hervor, dass 17 der Probanden eine Grundimmunisierung und eine Auffrischung erhielten (Tab. 3 im Anhang). Für die anderen 13 Probanden lagen keine Angaben vor. In 3 dieser Fälle war jedoch vermerkt, dass eine Empfehlung zur Auffrischung des Impfstatus erfolgte. Die zwei Probanden mit unzureichenden Titern gegen alle drei Serotypen waren

weiblich im Alter von 28 und 30 Jahren. Bei einer der Frauen lagen keine Angaben zum Impfstatus vor, die andere hatte eine vollständige Grundimmunisierung, sowie eine Auffrischung erhalten. Es zeigte sich, dass die Titer zwischen den Poliovirustypen variierten. In den meisten Fällen lagen unzureichend neutralisierende Antikörper gegen Poliovirus Typ 3 vor ( $n = 23$ ), gegen Typ 1 und Typ 2 war die Anzahl gleich (je  $n = 10$ ). Das durchschnittliche Alter der betroffenen Probanden betrug 30,77 Jahre und lag damit etwas unter dem durchschnittlichen Alter der gesamten Stichprobe. Der Anteil männlicher und weiblicher Probanden mit unzureichendem Immunitätsstatus und erhobener Impfanamnese war in etwa ausgeglichen ( $n_m = 14$ ;  $n_w = 16$ ). Zusammenfassend zeigte sich, dass zum Teil trotz erfolgter Impfung kein ausreichender Titer vorlag oder Impfungen nicht durchgeführt bzw. dokumentiert wurden. Die Zahl der nicht ausreichend geschützten Probanden war zu gering um sinnvoll auf statistische Zusammenhänge zu testen.

### 5.1.3. Alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede der Titer

Die ermittelten Titer der 91 ausgewählten Probanden waren gegen alle Poliovirustypen ausreichend (Titer  $\geq 8$ ). Insgesamt lag der GMT gegen Poliovirus Typ 1 bei 2,44 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,38), gegen Poliovirus Typ 2 bei 2,41 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,42) und gegen Poliovirus Typ 3 bei 2,54 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,39).

Im durchgeführten Mann-Whitney-U-Test konnte auf einem 5 %-Signifikanzniveau kein Unterschied zwischen den GMTs der zu vergleichenden Altersgruppen festgestellt werden ( $n_{39-45 \text{ Jahre}} = 47$ ;  $n_{\geq 53 \text{ Jahre}} = 44$ ;  $p(\text{PV1}) = 0,785$ ;  $p(\text{PV2}) = 0,262$ ;  $p(\text{PV3}) = 0,323$ ). Der GMT der 39–45-Jährigen betrug gegen Poliovirus Typ 1 2,46 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,33), gegen Poliovirus Typ 2 2,46 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,39) und gegen Poliovirus Typ 3 2,50 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,40). Die GMTs der Probanden im Alter von  $\geq 53$  Jahren lagen bei 2,41 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,43) gegen Poliovirus Typ 1, mit 2,35 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,46) gegen Poliovirus Typ 2 und 2,58 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,39) gegen Poliovirus Typ 3.

Des Weiteren konnte im Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied (5 %-Signifikanzniveau) in der Verteilung der Neutralisationstiter gegen alle drei Poliovirustypen zwischen männlichen und weiblichen Probanden festgestellt werden ( $n_m = 18$ ;  $n_w = 73$ ;  $p(\text{PV1}) = 0,833$ ;  $p(\text{PV2}) = 0,904$ ;  $p(\text{PV3}) = 0,535$ ). Die männlichen Probanden hatten gegen Poliovirus Typ 1 einen GMT in Höhe von 2,43 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,39), gegen Poliovirus Typ 2 von 2,38 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,50) und gegen Poliovirus Typ 3 von 2,40 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,54). Die

GMTs der weiblichen Probanden lagen gegen Poliovirus Typ 1 bei 2,44 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,38), gegen Poliovirus Typ 2 bei 2,41 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,41) und gegen Poliovirus Typ 3 bei 2,57 log TCID<sub>50</sub>/ml (SD 0,35).

Innerhalb der ähnlich großen Altersgruppen war der Anteil männlicher und weiblicher Probanden zugunsten der weiblichen unausgeglichen, wobei vor allem die Gruppe  $\geq 53$  Jahre in der Mehrheit aus Frauen bestand. Mithilfe einer multiplen linearen Regression konnte nicht gezeigt werden, dass die Zugehörigkeit zur Altersgruppe oder zum Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf den Titer hat (Ergebnisse in Tab. 4 im Anhang).

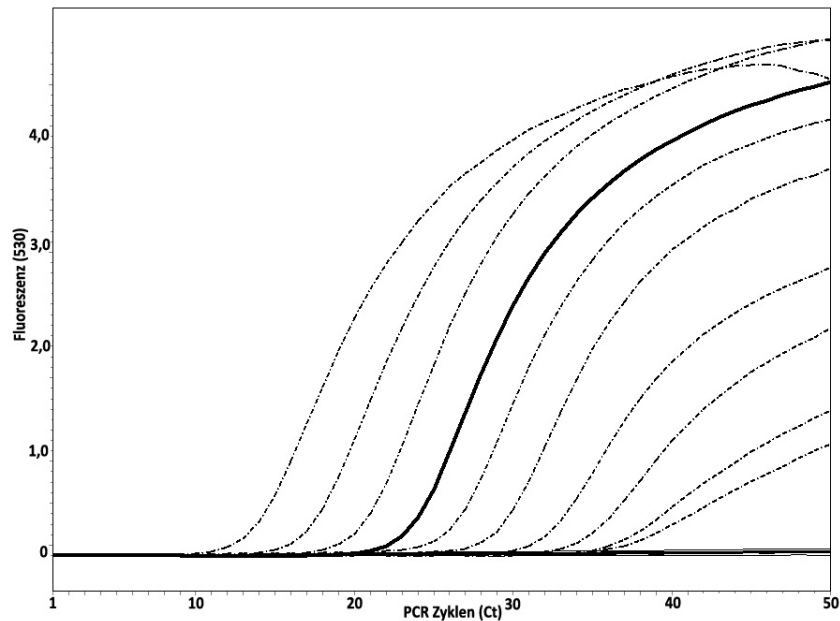
## **5.2. Poliovirusnachweis in Flusswasser**

### **5.2.1. Einrichtung der Poliovirus-spezifischen PCR**

Die Sequenzen der Primer und Sonde (Kilpatrick et al. 2009) für die Poliovirus-spezifische PCR (PanPolio-PCR) banden spezifisch in der VP1-Region des Poliovirus-Genoms und enthielten zum Ausgleich nicht übereinstimmender Basenpaare degenerierte Basen.

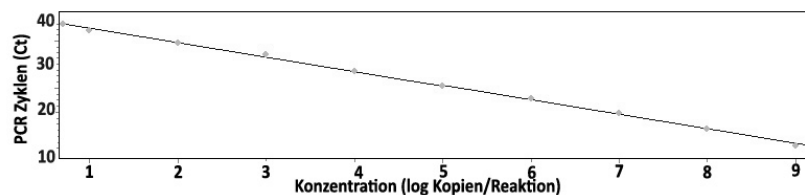
Abb. 18, Abb. 19 und Abb. 20 in den Anlagen zeigen schematisch das Alignment der Primer und Sonden mit den Poliovirus-Inserts, sowie den Aufbau des Vektors für die hergestellten Plasmide von Poliovirus Typ 1, 2 und 3. Zur Verwendung der Plasmide als Eichstandard in der PanPolio-PCR, erfolgte die Erstellung einer Standardkurve mit exponentiellen Verdünnungsreihen der Plasmidlösungen ( $2 \times 10^9$  K/ $\mu$ l) bis zu  $10^{-1}$  K/R mit der zusätzlichen Zwischenstufe 5 K/R. Abb. 10 zeigt beispielhaft die Fluoreszenzsignale der Amplifikation der Verdünnungsreihe für das Plasmid Poliovirus Typ 1 in der PanPolio-PCR mit TaqMan<sup>®</sup>-Sonde mit Wasser als Negativkontrolle.

Mithilfe der logarithmierten Amplifikationssignale der Verdünnungsreihe in der PanPolio-PCR mit TaqMan<sup>®</sup>-Sonde konnte die in Abb. 11 gezeigte Standardkurve festgelegt und für die nachfolgenden Versuchsreihen zur Quantifizierung hinterlegt werden.



**Abb. 10 Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe für das Plasmid von Poliovirus Typ 1 in der PanPolio-PCR mit TaqMan®-Sonde.**

Von links nach rechts sind die gemessenen Fluoreszenzsignale für  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 und 5 K/R gezeigt. Hervorgehoben ist die Kurve von  $10^6$  K/R. In dieser Konzentration wurde das Plasmid für Poliovirus Typ 1 in der PanPolio-PCR als Standard zur Quantifizierung mitgeführt.

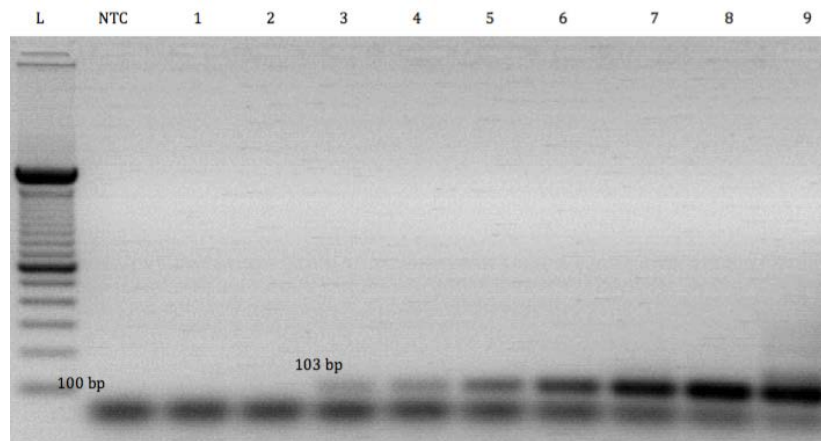


**Abb. 11 Standardkurve der PanPolio-PCR mit TaqMan®-Sonde für das Plasmid von Poliovirus Typ 1.**

Gezeigt ist die Standardkurve der Verdünnungsreihe für das Plasmid von Poliovirus Typ 1 von  $10^9$  bis  $10^1$  und 5 log K/R. Die hellgrauen Punkte auf der abfallenden Diagonale entsprechen den einzelnen Verdünnungsstufen von links nach rechts mit steigender Konzentration. Effizienz der PCR = 2,147, Fehler = 9,05 %.

Die in Abb. 10 hervorgehobene Verdünnungsstufe ( $10^6$  K/R) des Plasmids von Poliovirus Typ 1 diente anschließend als Eichstandard zur Quantifizierung der amplifizierten Proben in der PanPolio-PCR für Poliovirus Typ 1 und zählte gleichzeitig als Positivkontrolle. Das Plasmid von Poliovirus Typ 1 ( $10^6$  K/R) war relativ stabil und damit gut zur Verwendung als Standard geeignet, wobei eine Quantifizierung zuverlässig war, wenn die gemessene Zyklusanzahl (Ct) innerhalb der Standardabweichung lag (n = 14; Mittelwert 23,08; SD 1,03).

Das analytische Agarose-Gel in Abb. 12 zeigt die Amplifikate der PanPolio-PCR der Verdünnungsreihe von Plasmid Poliovirus Typ 1. Das spezifische Produkt hatte eine Länge von 103 bp. Als Positivkontrolle galten die in der Amplifikation in der PCR mit TaqMan®-Sonde positiv gemessenen Verdünnungsstufen des Plasmid Poliovirus Typ 1 und Wasser als Negativkontrolle.



**Abb. 12 Analytisches Agarose-Gel zur Demonstration der PanPolio-PCR mit Verdünnungsstufen des Plasmid Poliovirus Typ 1.**

Gezeigt sind PCR-Amplifikate einer Länge von 103 bp einer Verdünnungsreihe des Plasmid Poliovirus Typ 1 von Spur 1 bis Spur 9 mit steigender Konzentration  $10^{-1}$ ,  $10^0$ , 5,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  und  $10^6$  K/R. Spur L–DNA-Längenmarker, Spur NTC–Negativkontrolle.

Sowohl die Fluoreszenzsignale der Verdünnungsreihe des Plasmid Poliovirus Typ 1 in der Pan-Polio-PCR, als auch das Agarose-Gel zeigten, dass bis 5 K/R (Spur 3 in Abb. 12) ein Signal gemessen bzw. eine spezifische Bande im Gel abgrenzbar war. Das heißt die Linearität und die Sensitivität der PanPolio-PCR für die Amplifikation von Plasmid Poliovirus Typ 1 waren bis zu 5 K/R gewährleistet. Analog zum Plasmid Poliovirus Typ 1 erstellte Verdünnungsreihen und Standardkurven der Plasmide von Poliovirus Typ 2 und 3 zeigten in der PanPolio-PCR für den Serotyp 2 eine Linearität und Sensitivität bis 5 K/R und für den Serotyp 3 bis 10 K/R. Für die PanPolio-PCR mit dem Plasmid von Poliovirus Typ 1 ergab sich eine Effizienz von 2,147 und ein Fehler von 9,05 %, mit dem Plasmid von Poliovirus Typ 2 eine Effizienz von 2,153 und ein Fehler von 12,6 %, sowie mit dem Plasmid von Poliovirus Typ 3 eine Effizienz von 1,985 und ein Fehler von 15,3 %. Diese Werte waren für die PanPolio-PCR akzeptabel.

Der Umrechnungsfaktor von K/R in K/ml in der Probe betrug entsprechend dem Vorgehen zur Aufreinigung und Verarbeitung 112,5 (1000  $\mu$ l virushaltiger Zellkulturüberstand, davon 560  $\mu$ l für die RNA-Isolation, isolierte RNA in 60  $\mu$ l Eluat, davon 5  $\mu$ l für Reverse Transkription, davon 2  $\mu$ l in PanPolio-PCR).

Die Quantifizierung der gemessenen Fluoreszenzsignale für Verdünnungsreihen isolierter RNA aus Zellkulturüberständen von Poliovirus Typ 1, 2 und 3 mithilfe des Plasmids Poliovirus Typ 1 als Standard ergab höhere Nachweisgrenzen als für die Plasmide: 37,6 K/R (PV1), 40,9 K/R

(PV2) und 31,6 K/R (PV3) bzw. 4240 K/ml, 4600 K/ml und 3560 K/ml. Dennoch war eine Linearität der PCR bis zur Nachweisgrenze der Plasmide zu erwarten, d.h. bis zu 5 K/R für Poliovirus Typ 1 und 2 und bis zu 10 K/R für Poliovirus Typ 3.

Die Höhe des Fluoreszenzsignals in der PCR entsprach nicht automatisch der Menge infektiöser Viruspartikel. Die PCR erfasst Genomkopien, unabhängig von ihrer Fähigkeit einen CPE in zellkulturbasierten Methoden zu erzeugen. Die Titer der Stockviruszellkulturüberstände von Poliovirus Typ 1, 2 und 3 betragen  $9,00 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml,  $6,32 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml und  $2,00 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml. Der Vergleich der in der PanPolio-PCR mithilfe des Plasmid Poliovirus Typ 1 ( $10^6$  K/R) quantifizierten Fluoreszenzsignale von Verdünnungsreihen isolierter RNA (von  $10^1$  bis  $10^{-10}$ ) aus den Stockviruszellkulturüberständen in K/ml mit den entsprechend des Titers enthaltenen TCID<sub>50</sub>/ml zeigte, dass eine TCID<sub>50</sub>/ml in der Endpunkt titration ungefähr 1000 K/ml in der PanPolio-PCR entsprach. Davon ausgehend war lediglich ein Tausendstel der nachgewiesenen Kopien der Poliovirus-RNA infektiös.

Isolate von Coxsackie A2, A4, A5, A6, A9, A10, A16, B2, B3, B4, B5, Echo 3, 6, 9, 14, 16, 18, 30 und Enterovirus 68 dienten der In-vitro-Untersuchung der Spezifität der PanPolio-PCR. Nach der Überprüfung auf Intaktheit des genetischen Materials in der Enterovirus-PCR, erfolgte die Testung in der PanPolio-PCR. Die Auswertung zeigte für keine der Proben, ausgenommen der mitgeführten Poliovirusisolate, ein Fluoreszenzsignal. Damit konnte die Kreuzreaktivität der PanPolio-Primer und PanPolio-Sonde mit Nicht-Polio-Enteroviren (NPEVs) für die gewählten Viren ausgeschlossen werden und war im Rahmen dieser Arbeit als In-vitro-Überprüfung ausreichend. Die In-silico-Erstellung eines Alignments der Primer und Sonden mit allen in BLAST enthaltenen Sequenzen von Poliovirus-Isolaten und NPEVs mit Geneious von Biomatters Limited bestätigte und erweiterte die In-vitro-Resultate zur Spezifität der PanPolio-PCR.

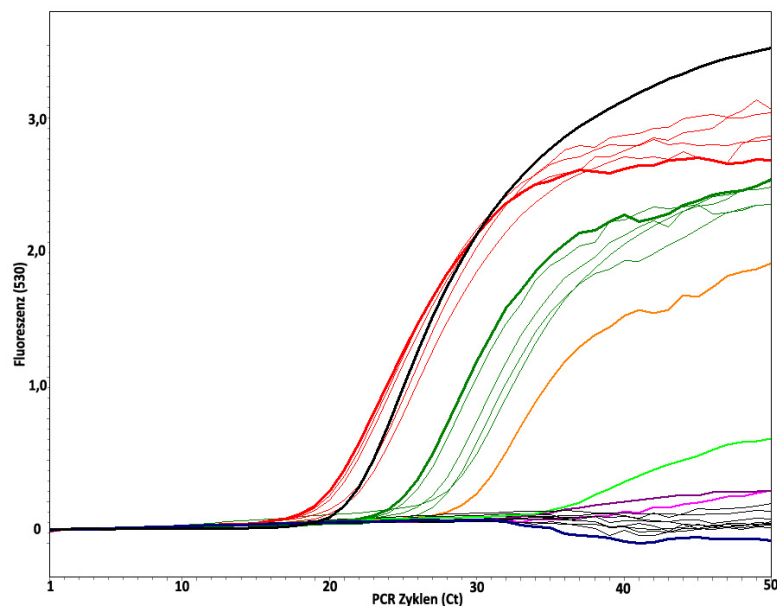
### **5.2.2. Validierung der Methode zum Nachweis von Polioviren in der Holtemme**

Die Validierung der Methode zum Virusnachweis in Flusswasser erfolgte mit Spikeversuchen in Fluss- und Reinstwasser mit dem Ziel, die zugegebene Menge Poliovirus Typ 1 bzw. Baculovirus nach Durchlaufen der Konzentrierung mit einer möglichst geringen Verlustrate in der jeweils spezifischen PCR nachzuweisen.



Zu drei Proben Flusswasser (je 10 l) zugesetzte Baculoviren (500 µl Zellkulturüberstand mit  $7,17 \times 10^8$  K/ml) konnten nach durchgeführter Konzentrierung und DNA-Isolation nicht in der Baculovirus-spezifischen PCR nachgewiesen werden.

Für dieselben dreimal 10 l Flusswasser, sowie weitere zweimal 10 l Flusswasser und zweimal 10 l Reinstwasser erfolgten Spikeversuche mit jeweils 500 µl hitzeinaktivierten Poliovirus Typ 1 Zellkulturüberständen der Konzentrationen  $2,96 \times 10^3$  K/R,  $4,66 \times 10^4$  K/R,  $1,14 \times 10^5$  K/R oder  $2,17 \times 10^6$  K/R. Die beiden zuletzt genannten Konzentrationen entsprachen Mittelwerten aus Mehrfachtestungen ( $n = 5$ ;  $n = 4$ ) von Überständen gleicher Viruskonzentration und sind in der Abb. 13 grün und rot dargestellt. Die jeweils in grün und rot hervorgehobenen Fluoreszenzsignale entsprechen isolierter RNA aus nicht-hitzeinaktivierten Zellkulturüberständen mit  $6,94 \times 10^4$  K/R und  $4,48 \times 10^6$  K/R. Der Vergleich mit und ohne 30 min Inkubation bei 56 °C zeigte, dass in der PanPolio-PCR nach der Hitzeinaktivierung im Mittel 106,35 % (48,44 %–164,35 %) der Kopien nachweisbar waren. Da die Hitzeinaktivierung für die Durchführung der Spikeversuche im Rahmen dieser Arbeit notwendig war, erfolgte die Kalkulation der Wiederfindungsraten mit den ermittelten Viruskonzentrationen nach Hitzeinaktivierung der Proben als Vergleichswert.



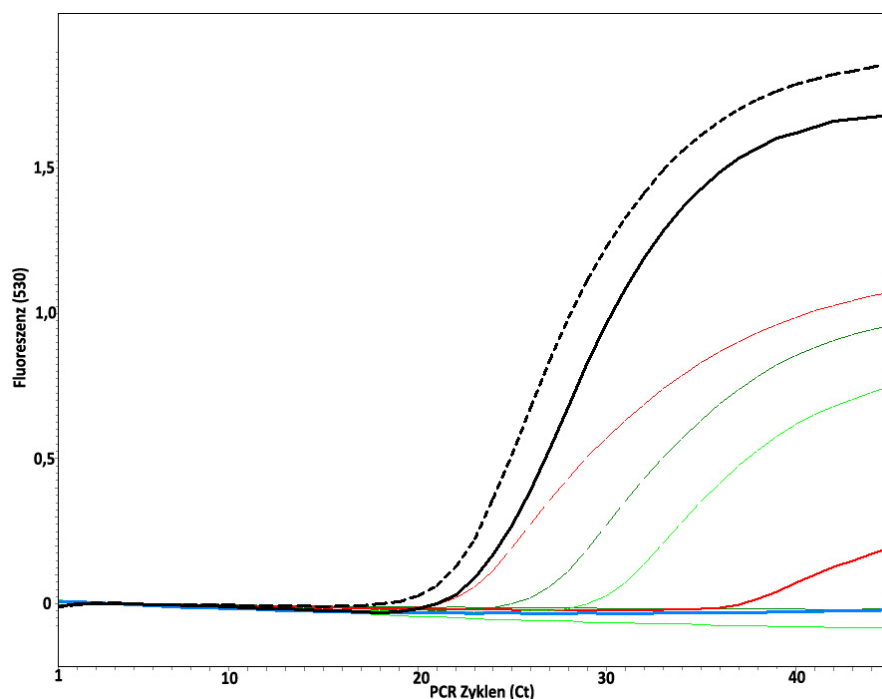
**Abb. 13 Amplifikationskurven verschiedener Proben in der PanPolio-PCR mit TaqMan®-Sonde.**

Dunkelblau – Negativkontrolle Wasser; Schwarz hervorgehoben – Standard Plasmid Poliovirus Typ 1 ( $10^6$  K/R); Schwarz – Proben in denen keine cDNA amplifiziert werden konnte (Ergebnis negativ); Rot – isolierte RNA aus hitzeinaktivierten (30 min bei 56 °C) Zellkulturüberständen (mittlere Konzentration  $2,17 \times 10^6$  K/R; SD  $1,26 \times 10^6$  K/R); Rot hervorgehoben – nicht-hitzeinaktivierter Zellkulturüberstand der gleichen Konzentration wie „Rot“; Grün - isolierte RNA aus hitzeinaktivierten Zellkulturüberständen (mittlere Konzentration  $1,14 \times 10^5$  K/R; SD  $2,05 \times 10^5$  K/R); Grün hervorgehoben – nicht-hitzeinaktivierter Zellkulturüberstand der gleichen Konzentration wie „Grün“; Orange, Hellgrün, Lila, Pink – weitere RNA haltige Proben aus Rückflüssen und Waschflüssigkeiten im Rahmen der Konzentrierung von Flusswasser und Reinstwasser für die Bestimmung der Wiederfindungsrate von Poliovirus Typ 1 Kopien.

Durch die Konzentrierung reduzierte sich das Volumen des Wassers von 10 l auf 500 µl. Aus 280 µl erfolgte die RNA-Isolation und Elution in 100 µl. Das Enterovirus-PCR-Protokoll benötigt 5 µl, das PanPolio-PCR-Protokoll 5,5 µl. Die Wiederfindungsrate in Prozent entsprach dem Anteil der eingesetzten Viruskonzentration, die im Anschluss an die Konzentrierung und RNA-Isolation wieder in der PanPolio- oder der Enterovirus-PCR nachgewiesen werden konnte. Jedes eindeutige Fluoreszenzsignal in der Amplifikation und jede spezifische Bande im Agarosegel zählten als Nachweis bzw. positives Resultat.

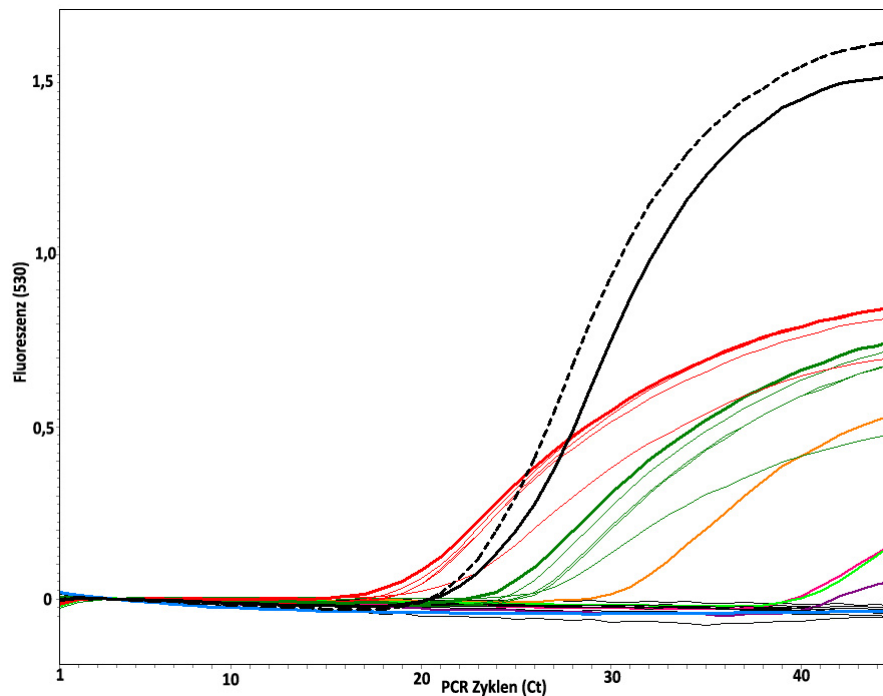
Für die mit  $2,96 \times 10^3$  K/R und  $4,66 \times 10^4$  K/R Poliovirus Typ 1 versetzten Flusswasserproben, gelang weder in der PanPolio- noch in der Enterovirus-PCR ein Nachweis von RNA. Die Wiederfindungsrate betrug 0 %.

Aus der Flusswasserprobe mit  $1,14 \times 10^5$  K/R Poliovirus Typ 1 wurden nach Konzentrierung und RNA-Isolation in der Enterovirus-PCR 0,934 K/R (Ct 38,03; Abb. 14 Rot hervorgehoben) detektiert, was einer Wiederfindungsrate von 0,001 % entsprach. Wiederholungen der PCR konnten das Ergebnis nicht bestätigen.



**Abb. 14 Amplifikationskurven (1) verschiedener Proben in der EV-PCR mit TaqMan®-Sonde.**

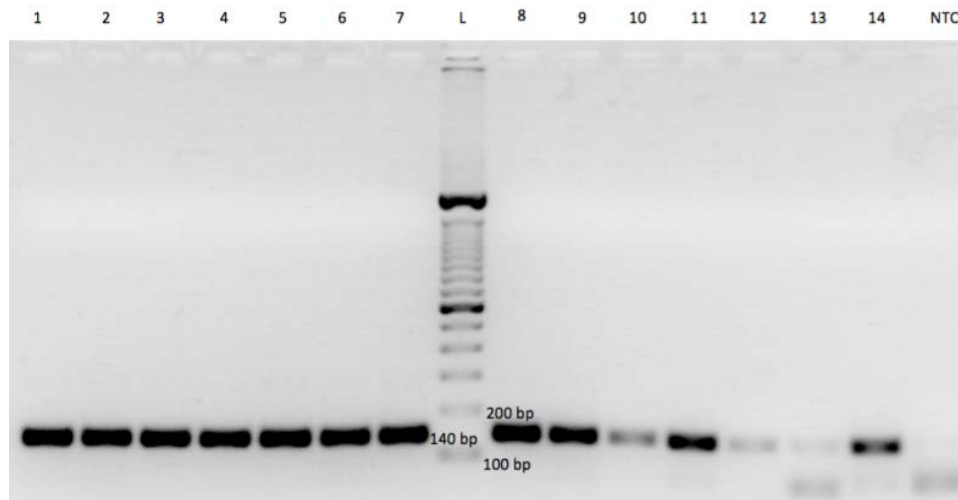
Schwarz gestrichelt – Positivkontrolle (Zellkultur Überstand Coxsackie B1); Schwarz – Plasmid pCR2.1+CoxB5 ( $1 \times 10^5$  K/R); Rot/Dunkelgrün/Hellgrün gestrichelt – Spikematerial Poliovirus Typ 1 ( $1,14 \times 10^5$  K/R;  $4,66 \times 10^4$  K/R;  $2,96 \times 10^3$  K/R); Rot/Dunkelgrün/Hellgrün – isolierte RNA aus gespiketen Flusswasserproben (10 l); Blau – Negativkontrolle (Wasser). Wiederfindungsrate Rot: 0,001 %.



**Abb. 15 Amplifikationskurven (2) verschiedener Proben in der EV-PCR mit TaqMan®-Sonde.**

Schwarz gestrichelt – Positivkontrolle (Zellkultur Überstand Coxsackie B1); Schwarz – Plasmid pCR2.1+CoxB5 ( $1 \times 10^5$  K/R); Rot/Dunkelgrün hervorgehoben – nicht-hitzeinaktiviertes Spikematerial Poliovirus Typ 1; dünn Rot/dünn Dunkelgrün – Spikematerial nach Hitzeinaktivierung (30 min bei  $56^\circ\text{C}$ ) ( $2,17 \times 10^6$  K/R;  $1,14 \times 10^5$  K/R); Orange/Hellgrün/Rot/Lila - weitere RNA haltige Proben aus Rückflüssen und Waschflüssigkeiten im Rahmen der Konzentrierung von Flusswasser und Reinstwasser für die Bestimmung der Wiederfindungsrate von Poliovirus Typ 1 Kopien; Blau – Negativkontrolle (Wasser). Wiederfindungsraten  $< 0,00\%$ .

Für das mit  $2,17 \times 10^6$  K/R Poliovirus Typ 1 versetzte Flusswasser ergab die Quantifizierung in der Enterovirus-PCR nach der Konzentrierung und RNA-Isolation  $0,235$  K/R (Ct 39,28; flachste rote Kurve in Abb. 15). Im Agarose-Gel (Spur 12 Abb. 16) lag eine schwache Bande auf Höhe der spezifischen Amplifikatlänge von 140 bp vor. Im Reinstwasser mit  $2,17 \times 10^6$  K/R Poliovirus Typ 1 konnten in der Enterovirus-PCR  $0,0437$  K/R (Ct 41,71; Abb. 15 Kurve Lila) und damit weniger als aus dem Flusswasser detektiert werden. Das Agarose-Gel zeigte auch für dieses Amplifikat (Spur 13 Abb. 16) eine Bande auf Höhe der spezifischen Amplifikatlänge von 140 bp. Die Wiederfindungsrate im konzentrierten Reinstwasser lag mit  $< 0,00\%$  ( $0,000011\%$  und  $0,000002\%$ ) niedriger als für das Flusswasser in der Enterovirus-PCR.



**Abb. 16 Analytisches Agarose-Gel von Amplifikaten aus der Enterovirus-PCR.**

Spezifische Amplifikatlänge (5'NTR) 140 bp. Spur L – DNA-Längenmarker. Spur NTC – Negativkontrolle. Spur 1–14 Amplifikate isolierter RNA aus Proben verschiedener Konzentration Kopien Poliovirus Typ 1. Spuren 1 und 3: Zellkulturüberstände mit  $2,2 \times 10^6$  K/R,  $1,14 \times 10^5$  K/R (Positivkontrollen). Spuren 4, 6, 9 und 11: Hitzeinaktivierte Zellkulturüberstände mit  $1,14 \times 10^5$  K/R. Spuren 2, 5, 7 und 8: Hitzeinaktivierte Zellkulturüberstände mit  $2,2 \times 10^6$  K/R. Spur 10: Erste Waschflüssigkeit der Konzentrierung von Flusswasser mit  $1,14 \times 10^5$  K/R; Spur 14: Erster Rückfluss der Konzentrierung von Reinstwasser mit  $2,2 \times 10^6$  K/R; Spur 12: Konzentrierung von Flusswasser mit  $2,2 \times 10^6$  K/R; Spur 13: Konzentrierung von Reinstwasser mit  $2,2 \times 10^6$  K/R.

In der PanPolio-PCR gelang für keine der konzentrierten, mit Poliovirus Typ 1 versetzten Fluss- oder Reinstwasser-Proben der Nachweis von RNA. Die Wiederfindungsrate in der PanPolio-PCR lag bei 0 %.

Weiterhin erfolgte die Testung von Rückflüssen und Waschflüssigkeiten, die während des ersten Konzentrierungsschrittes des Fluss- bzw. auch des Reinstwassers entstanden. Der erste Rückfluss entsprach der Flüssigkeit, die den Filter mit der Porengröße 200 nm nicht passierte, also Partikel größer als 200 nm enthielt. Polioviren sollten nicht nachweisbar sein, da diese einen durchschnittlichen Durchmesser von 30 nm haben. Die erste Waschflüssigkeit war das aufgefangene Aqua dest. nach Waschen der 200 nm Kassette im Anschluss an die Filtration des Fluss- bzw. Reinstwassers und die zweite Waschflüssigkeit analog dazu nach Waschen der 30 kDa Kassette.

Für den ersten Rückfluss aus der Konzentrierung von Reinstwasser versetzt mit  $1,14 \times 10^5$  K/R Poliovirus Typ 1 ergab die PanPolio-PCR 0,025 K/R (Ct 43,86; Abb. 13 Pink). Im ersten Rückfluss aus der Konzentrierung von Flusswasser mit  $2,2 \times 10^6$  K/R Poliovirus Typ 1, konnten in der PanPolio-PCR 1,57 K/R (Ct 38,44; Abb. 13 Lila) gemessen werden. Der erste Rückfluss aus der Konzentrierung von Reinstwasser mit  $2,2 \times 10^6$  K/R Poliovirus Typ 1 enthielt in der PanPolio-PCR 2010 K/R (Ct 29,08; Abb. 13 Orange) und in der Enterovirus-PCR 149 K/R (Ct 29,95; Abb. 15

Orange; Abb. 16 Spur 14). Die Quantifizierung für die erste Waschflüssigkeit aus der Konzentrierung von Flusswasser mit  $1,14 \times 10^5$  K/R Poliovirus Typ 1 ergab in der PanPolio-PCR 6,03 K/R (Ct 36,68; Abb. 13 Hellgrün) und in der Enterovirus-PCR 0,106 K/R (Ct 40,43; Abb. 15 Hellgrün; Abb. 16 Spur 10).

Der als Verlustrate bezeichnete Anteil der in Rückflüssen und Waschflüssigkeiten detektierten RNA an der eingangs zu Fluss- bzw. Reinstwasser zugegebenen Viruskonzentration betrug im Mittel 0,017 % (0,000022 %–0,093 %).

Aufgrund der zu geringen quantifizierten Konzentration isolierter RNA aus Fluss- oder Reinstwasser konnte für keine der positiv getesteten Proben eine Sequenzierung zur Identifizierung der Isolate durchgeführt werden.

Inhibitorische Effekte ausgehend von der Wassermatrix konnten ursächlich für die niedrigen Wiederfindungsraten sein. Eine Möglichkeit diese zu eliminieren bestand in der Verdünnung des RNA-Isolates. Da viele der untersuchten Proben jedoch negativ waren und auch die konzentrierten Reinstwasserproben nur sehr geringe Viruskonzentrationen enthielten, schien das Vorgehen für die vorhandenen Proben nicht geeignet zu sein um die Fluoreszenzsignale zu erhöhen. Des Weiteren werden Enzyme der PCR durch BSA (Bovines Serumalbumin) und  $MgCl_2$  beeinflusst. BSA sei in der Lage Enzyme zu stabilisieren, verhindere die Anhaftung der Enzyme an den Reaktionsgefäßen und Pipetten und könne an Inhibitoren binden (z.B. an Proteinasen), sodass diese nicht mehr stören (Gibson et al. 2012). In Umweltproben sind häufig sogenannte Huminstoffe aus Böden enthalten, unter anderem Huminsäuren (Walter 2013). Diese haben die Fähigkeit Magnesium-Ionen zu binden und damit die Funktion der Polymerase einzuschränken. Zur Milderung störender Einflüsse erfolgte für BSA und  $MgCl_2$  der Vergleich drei verschiedener Varianten des Enterovirus-PCR Protokolls. Als Testproben dienten die in der Enterovirus-PCR positive isolierte RNA aus Flusswasser mit  $1,14 \times 10^5$  K/R, isolierte RNA aus Poliovirus-Zellkulturüberständen ( $6 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^2$ ,  $6 \times 10^1$  K/R), Wasser als Negativkontrolle und das Plasmid pCR2.1+CoxB5 ( $1 \times 10^5$  K/R) als Positivkontrolle. Die PCR-Ansätze enthielten kein zusätzliches BSA, BSA (2 mg/ml) zur Endkonzentration 200 ng/ $\mu$ l und zur Endkonzentration 400 ng/ $\mu$ l und analog dazu kein zusätzliches  $MgCl_2$ ,  $MgCl_2$  (50 mM) zur Endkonzentration 1 mM und zur Endkonzentration 2 mM. Die Negativkontrolle war in jeder Amplifikation negativ, die isolierte RNA aus dem Flusswasser konnte nicht detektiert werden und die Zyklusanzahl (Ct) für das Plasmid pCR2.1+CoxB5 lag zwischen 21,58–23,24. Es konnte keine deutliche

Verbesserung der Resultate festgestellt werden, sodass weder für das Enterovirus-PCR Protokoll noch für das PanPolio-PCR Protokoll prinzipielle Modifikationen erfolgten.

Unter der Annahme der akzeptablen Risiken für wasserübertragene Erreger (1 infizierte Person/10000 Einwohner/Jahr bei täglicher Aufnahme von 2 l Trinkwasser (World Health Organization 2004a); 1 infizierte Person/1000 Schwimmer/Jahr bei einer durchschnittlichen Wasseraufnahme von 100 ml/Schwimmaktion/Person/Tag (Botzenhart 2013)), sowie der MID (10–100 infektiösen Viruspartikel) von Polioviren und dem Manifestationsindex (1 %) von Polioinfektionen (Botzenhart 2013) erfolgte die Einordnung der Resultate der Spikeversuche zur Einschätzung der Infektionsgefährdung durch Polioviren in der Umwelt. Bei der Betrachtung von Oberflächenwasser (unter anderem Flusswasser) spielte v.a. die orale Aufnahme bei Freizeitaktivitäten eine Rolle.

Die Konzentration von Poliovirus Typ 1 in 10 l Flusswasser versetzt mit 500 µl Zellkulturüberstand Poliovirus Typ 1 ( $1,14 \times 10^5$  K/R) entsprach 6412,5 K/ml. Die detektierte Menge Poliovirus Typ 1 nach Konzentrierung und RNA-Isolation betrug 1 K/R. Ausgehend von der experimentell ermittelten Differenz zwischen nachweisbaren Kopien und infektiösen Viruspartikeln in der Zellkultur lag eine Konzentration von 6,41 TCID<sub>50</sub>/ml in den 10 l Flusswasser vor. Unter der Annahme, diese Konzentration spiegele die Kontamination des untersuchten Oberflächenwassers wieder, würden 100 ml des Wassers 6412,5 TCID<sub>50</sub> Poliovirus Typ 1 enthalten, was über der MID von 10–100 lag und damit ein Infektionsrisiko darstellte.

Enthielten 100 ml Flusswasser 1 TCID<sub>50</sub>/ml bzw. 1000 K/ml Polioviren (entsprechend einer MID von 100), sollten in der PCR nach Konzentrierung und RNA Isolation abgeleitet vom der Detektion 1 K/R bei einer Flusswasserkontamination von 6412,5 K/ml theoretisch 0,16 K/R nachweisbar sein. Dieses Ergebnis schien zu niedrig für eine zuverlässige Quantifizierung in der PCR. Die entwickelte Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser war demzufolge nicht sicher in der Lage Viruskonzentrationen in Höhe der minimalen infektiösen Dosis zu detektieren.

Angenommen die aufgenommene Menge Oberflächenwasser betrug beim Schwimmen für Frauen durchschnittlich 18 ml (Duizer et al. 2016) anstelle von 100 ml, sollten in der PCR 0,87 K/R nachweisbar sein, also aufgerundet 1 K/R. Für dieses Szenario war die Methode fähig eine Poliovirus Typ 1 Konzentration in Höhe der MID zu detektieren.

Für die Risikobeurteilung sollten jedoch eher die überschätzten Grenzwerte gewählt werden mit einer Wasseraufnahme von 100 ml beim Schwimmen und einer MID von 10 infektiösen Viruspartikeln. Die Methode müsste dementsprechend in der Lage sein, bei der ermittelten Nachweisgrenze, 0,016 K/R Poliovirus Typ 1 zu detektieren. Die Methode war nicht sensitiv genug um dieses Ergebnis zuverlässig zu erzielen.

Abgeleitet vom akzeptablen Infektionsrisiko bei Schwimmern (1 infizierte Person/1000 Schwimmer/Jahr bei Wasseraufnahme von 100 ml/Schwimmaktion/Person/Tag) durften 10 l Flusswasser nur ein Tausendstel der initial kalkulierten Konzentration enthalten. Für eine Wasseraufnahme von 100 ml und eine MID von 10 infektiösen Viruspartikel entsprach das 0,0001 TCID<sub>50</sub>/ml und 0,1 K/ml. In der PCR sollten 0,000016 K/R detektiert werden. Es schien unwahrscheinlich dieses Risiko mit der entwickelten Nachweismethode sicher auszuschließen.

Insgesamt zeigten die Kalkulationen, dass die Nachweismethode nicht sensitiv genug war, eine Poliovirus Typ 1 Konzentration in Höhe der MID oder niedriger zu detektieren. Erfolgte jedoch der Nachweis mindestens 1 K/R mit der angewandten Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser, überschritt die Konzentration im untersuchten Oberflächenwasser die MID und es bestünde ein Infektionsrisiko. Mit Bezug auf den Manifestationsindex von Poliovirusinfektionen von 1 % wäre auch ein paralytischer Verlauf möglich.

### **5.2.3. Untersuchung der aus Flusswasser gewonnenen Gesamt-RNA auf Entero- und Poliovirus-RNA**

Die Konzentrierung des Flusswassers der dreizehn Standorte von 10 l auf ca. 500 µl, sowie die Isolation der RNA aus 140 µl mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit erfolgte durch Mitarbeiter des UFZ Leipzig (Department Umweltmikrobiologie, AG Mikrobielle Systemökologie). In diesen Flusswasserproben konnten dort bereits sehr kleine Viren, darunter auch RNA-Viren (z.B. des Genus Labrynavirus), nachgewiesen werden (Bakteriophagen der Familie Microviridae, die einen Durchmesser von 25–27 nm haben), was zeigt, dass Viren mit einer ähnlichen Größe und Morphologie wie Polioviren mithilfe der angewandten Methode molekularbiologisch detektiert werden konnten (nicht publizierte Daten von Kallies).

Kallies stellte die isolierte RNA zur zusätzlichen Testung in der Enterovirus- und der PanPolio-PCR im Rahmen dieser Arbeit freundlicherweise zur Verfügung. In keiner der Proben konnte

EV- und Poliovirus-spezifische RNA nachgewiesen werden. Die ermittelten Wiederfindungsraten der hier angewendeten Methode zum Nachweis von Polioviren und NPEV in Flusswasser waren zu gering, um das Vorhandensein von zumindest Enteroviren an den Standorten der Probennahme in der Holtemme auszuschließen. Infolge urbaner Zuflüsse könnten durchaus relevante Konzentrationen von Enteroviren enthalten sein.



## 6. Diskussion

### 6.1. Einordnung des Immunitätsstatus

Nachfolgende Ausführungen befassen sich mit der Einordnung des Immunitätsstatus der untersuchten Probanden unter Beantwortung der Fragestellungen **1a**, **b** und **c**.

Wie einführend erläutert, dienen Immunisierungen unter anderem der Gewährleistung der Herdenimmunität einer Bevölkerung. Nach Sauerbrei et al. (2004) und Diedrich und Schreier (2007) sei eine Populationsimmunität von 80 % ausreichend um die Verbreitung von Polioviren zu verhindern. Dabei nehmen sie Bezug auf die anhand der Basisreproduktionszahl und anderen Faktoren berechnete Seroprävalenz von 80–86 % (Fine 1993). Wird jedoch aufgrund der möglichen Verschiebung des Erkrankungszeitpunktes vom frühen Kindes- in das Jugend- und Erwachsenenalter mit einer höheren Basisreproduktionszahl kalkuliert, verschiebt sich der Schwellenwert zur Gewährleistung der Herdenimmunität auf 95 % (Fine 1993). Jüngeren Aussagen des Robert Koch Institutes zufolge, könne die Zirkulation des Poliovirus nur verhindert und die Eradikation erreicht werden, wenn der Schutz der Bevölkerung über 95 % läge (Robert Koch Institut 2012). Auch die WHO fordere aktuell Immunitätslevel von mindestens 95 % (Robert Koch Institut 2017). Eine Impfquote von mindestens 95 % sei laut RKI ein wichtiger Indikator zur Einschätzung des Risikos der Weiterverbreitung eines eingeschleppten Poliovirus in der Bevölkerung (Robert Koch Institut 2018a).

Es stellt sich die Frage (**1a**), wie die Seroprävalenz neutralisierender Antikörper gegen Polioviren in der untersuchten Probandengruppe im Hinblick auf die Gewährleistung einer ausreichenden Herdenimmunität, also einem Immunitätslevel von 95 %, einzuordnen ist.

Die ermittelten Seroprävalenzraten der 530 getesteten Probanden im Alter von 18–64 Jahren lagen insgesamt sowohl gegen Poliovirus Typ 1, 2 und 3 separat, als auch gesamt zunächst signifikant über 80 %. Damit war nach Sauerbrei et al. (2004) und Diedrich und Schreier (2007) zunächst eine ausreichende Populationsimmunität gegeben um die Verbreitung von Polioviren zu verhindern. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Seroprävalenzen der gesamten Stichprobe gegen Poliovirus Typ 1 und 2 signifikant höher als 95 % lagen, gegen Poliovirus Typ 3 und gegen alle drei Serotypen zugleich bestätigte sich das hingegen nicht. Trotz dessen die Seroprävalenzen bei Unterteilung nach Altersgruppen zunächst oft Werte über 95 % annahmen, konnte überwiegend, v.a. gegen Poliovirus Typ 3 und gegen alle drei Typen gesamt, kein

signifikantes Überschreiten der 95 % festgestellt werden. Dies deutet daraufhin, dass die untersuchten Probanden im Hinblick auf aktuell erforderliche Immunitätslevel von 95 % mitunter nicht ausreichend immunisiert waren.

Für Studien zur Seroprävalenz neutralisierender Antikörper gegen Polioviren ist nicht einheitlich festgelegt, welcher Titer protektiv gegen Polioviren ist. Im Rahmen dieser Arbeit galten Titer  $\geq 8$  entsprechend der WHO-Empfehlung als ausreichender Schutz. Die Verwendung unterschiedlicher Titer Cut-Offs bei serologischen Untersuchungen kann die Ergebnisse dahingehend beeinflussen, dass z.B. in einer Studie, die Titer  $\geq 4$  als protektiv bewertet, die gesamte Seroprävalenz höher ist, als in Studien, die Titer  $\geq 8$ , 10 oder 16 als protektiv annehmen. Die Ergebnisse der Studien können dann nur bedingt verglichen werden.

Letzte serologische Untersuchungen für Deutschland zeigten weitaus bedenklichere Immunitätslevel als die untersuchten Probanden. Bei einem Cut-Off von  $\geq 10$  lagen die Seroprävalenzen gegen alle drei Poliovirustypen für 290 getestete schwangere Frauen (1995–1996) bei 62,4–64,1 %, wobei wegen Herkunft der Frauen aus der ehemaligen DDR davon ausgegangen wurde, dass sie der Impfflicht unterlagen (Sauerbrei et al. 2004). Aufgrund des gewählten Cut-Offs  $\geq 10$  konnten die Seroprävalenzraten gegebenenfalls geringfügig höher liegen. Im Rahmen des Bundesgesundheits surveys von 1997/1998 untersuchte Seren gesunder Erwachsener ( $n=2564$ ), sowie Kinder und Jugendlicher unter 18 Jahren ( $n=881$ ) zeigten, dass 96,2 %, 96,8 % und 89,6 % ausreichend protektive Antikörper (Titer Cut-Off  $\geq 4$ ) gegen Poliovirus Typ 1, 2 und 3 hatten. Gegen alle drei Poliovirustypen waren 85 % geschützt (Diedrich et al. 2000). Die Immunitätslevel wären jedoch bei einem Cut-Off Titer  $\geq 8$  niedriger gewesen.

Speziell in Sachsen durchgeführte Studien zeigten ebenso unzureichende serologische Immunitätslevel gegen Polioviren. Bei der 1999 durchgeführten Testung von 1153 Seren von 0–über 70-Jährigen wiesen 82 % (64–91 %) der Seren ausreichend neutralisierende Antikörper (Cut-Off Titer  $\geq 4$ ) gegen alle drei Poliovirustypen auf (Sächsische Impfkommision 2000). In einer weiteren Publikation zum Immunitätsstatus gegen Polio im Freistaat Sachsen in der gleichen Altersgruppe von 1999/2000 (Roch 2002) hatten insgesamt 94 %, 93 % und 88 % ausreichende Titer gegen Poliovirus Typ 1, Typ 2 und Typ 3. 78 % (62,9 % bis 89,3 %) der 1626 Probanden waren gegen alle drei Serotypen geschützt. Bei einem Cut-Off von  $\geq 8$  wären die Seroprävalenzraten niedriger gewesen.

Insgesamt zeigte sich, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Probanden im Vergleich zu herausgegriffenen Vorresultaten der letzten 20 Jahre überwiegend besser immunisiert waren.

Bei der Betrachtung der Seroprävalenzraten gegen die Serotypen 1, 2 und 3 konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Insgesamt fiel auf, dass der Immunitätslevel gegen Poliovirus Typ 1 signifikant (5 %-Signifikanzniveau) höher lag als gegen alle drei Serotypen gemeinsam. Bei Differenzierung zwischen den Altersgruppen zeigte sich für Poliovirus Typ 1 im Gegensatz zu den anderen Serotypen, dass jede Altersgruppe eine Prävalenz neutralisierender Antikörper >95 % (nur teilweise signifikant) erreichte. Mögliche Erklärungsansätze sind ein besseres Ansprechen auf die Typ 1 Komponente der Vakzine oder gerade bei den Probanden mit Wildvirkontakt in endemischen Zeiten (ältere Jahrgänge) ein Boost durch natürliche Immunität gegen das vorherrschende Poliovirus Typ 1.

Weiterhin schienen die Seroprävalenzen gegen Poliovirus Typ 2 in den meisten Altersgruppen höher als gegen Poliovirus Typ 1 und 3 zu sein, wobei die Werte für Poliovirus Typ 3 überwiegend niedriger lagen als für Typ 1. Diedrich und Schreier stellten 1995 niedrigere Seroprävalenzraten gegen Poliovirus Typ 3 (79 %) im Gegensatz zu Typ 1 (92 %) und 2 (94 %) fest. Sie führten als mögliche Ursachen bezogen auf die orale Poliovirus Vakzine unter anderem eine verminderte Immunogenität, sowie eine stärkere Thermolabilität der Typ 3 Komponente an (Diedrich und Schreier 1995). Auch im Bundesgesundheitsurvey von 1997/1998 lagen die Seroprävalenzen gegen Poliovirus Typ 3 niedriger als gegen Typ 1 und 2 (Diedrich et al. 2000). Franck et al. (1999) bestätigten in ihrer Analyse des Immunitätsstatus in Deutschland nach dem Ende der Anwendung der OPV signifikant niedrigere Seroprävalenzen gegen Poliovirus Typ 3 und führten die gleichen möglichen Ursachen wie Diedrich und Schreier (1995) an. Auch die Seroprävalenzstudie für den Freistaat Sachsen von Roch (2002) zeigte niedrigere Werte für Poliovirus Typ 3 im Gegensatz zu Typ 1 und 2. In einer jüngeren Studie untersuchten Wicker et al. (2007) Seren von 270 Medizinstudenten. Dabei stellten sie ebenfalls signifikant niedrigere Immunitätslevel gegen Poliovirus Typ 3 fest, diskutierten aber lediglich, dass es nicht möglich sei zu behaupten, diese Differenzen hingen mit der Umstellung von OPV auf IPV zusammen (Wicker et al. 2007).

Zudem sollte zwischen Publikationen unterschieden werden, die über Seroprävalenzraten berichten und denen, die den Immunstatus anhand erhobener Impfanamnesen definieren. Im

direkten Vergleich konnte festgestellt werden, dass die Rate des impfanamnestischen Schutzes oftmals höher ist, als die Seroprävalenz neutralisierender Antikörper gegen Polioviren (Sauerbrei et al. 2004, Nijsten et al. 2015). Sauerbrei et al. (2004) verzeichneten einen signifikanten Unterschied bei einer Differenz von ca. 20 %. Ausgehend davon ist es möglich, dass erhobene Daten zur Immunität einer Bevölkerung basierend auf Impfanamnesen den tatsächlichen Schutz durch vorhandene Antikörper überschätzen. Vor allem für Kinder beruhen die Aussagen zum Immunitätslevel auf Impfdaten, die im Rahmen von Schuleingangsuntersuchungen regelmäßig erhoben und deutschlandweit gesammelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass der überwiegende Teil der Probanden mit unzureichender serologischer Immunität laut STIKO-Empfehlung vollständig immunisiert war. In diesen Fällen hätte ebenfalls nicht direkt von erfolgten Schutzimpfungen auf das Vorhandensein ausreichend neutralisierender Antikörper geschlossen werden können.

Laut Empfehlung der Ständigen Impfkommission für 2016/2017 (Sächsische Impfkommission 2017) erfolgt die Grundimmunisierung für Kinder zwischen dem 2. und 14. Lebensmonat mit drei Dosen IPV bei Einzelimpfstoffen und vier Dosen bei Kombinationspräparaten. Ab dem 9. Lebensjahr sollte eine einmalige Auffrischung mit IPV erfolgen. Bei Erwachsenen besteht die Indikation zur Impfung bei fehlender oder unvollständiger Grundimmunisierung und bei allen Personen ohne einmalige Auffrischung. Eine routinemäßige Auffrischung für Erwachsene empfiehlt die STIKO nicht.

Die aktuellsten Immunitätsdaten gehen aus der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ hervor (Poethko-Müller und Schmitz 2013). Die erste Erhebungswelle von 2008 bis 2011 umfasste die Impfdaten von einem Teil der 18–79-Jährigen deutschlandweit. 85,6 % der Erwachsenen waren vollständig gegen Poliomyelitis immunisiert. Vor dem Hintergrund, dass die Seroprävalenzraten der deutschlandweiten Studie möglicherweise niedriger gewesen sein könnten als die Ergebnisse der Impfanamnese es vorgeben, hatten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Probanden mit 93,6 % Seroprävalenz gegen alle drei Serotypen mit hoher Wahrscheinlichkeit einen höheren Immunitätslevel.

Unabhängig vom Immunitätslevel der untersuchten Probanden könnten veränderte Polioviren, die nicht durch Impfantikörper (wie herkömmliche Polioviren) neutralisiert werden, eine Gefahr darstellen. Die Untersuchung von Seren vollständig immunisierter Personen ergab, dass jede 5. Person zwar das Impfvirus nicht jedoch eine 2010 im Kongo isolierte Poliovirus

Typ 1 Variante neutralisierte und damit keinen ausreichenden Schutz gegen dieses Virus aufwies (Drexler et al. 2014). Auch Lukashev et al. (2016) testeten Seren mit ähnlichem Ergebnis eines mangelnden Schutzes gegen das Isolat aus dem Kongo.

Weiterhin stellt sich die Frage (**1b**), ob alters- oder geschlechtsspezifische Unterschiede der Immunitätslevel gegen Polioviren vorliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Vergleich der GMTs der 39–45-Jährigen und der Probanden ab 53 Jahren (mittlerer Altersunterschied von 15 Jahren). Es konnte kein signifikanter Unterschied ( $n_{39-45 \text{ Jahre}} = 47$ ;  $n_{\geq 53 \text{ Jahre}} = 44$ ;  $p \text{ (PV1)} = 0,785$ ;  $p \text{ (PV2)} = 0,262$ ;  $p \text{ (PV3)} = 0,323$ ) zwischen den Titern der jüngeren und älteren Probanden festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte die serologische Untersuchung von Blutspendern in Berlin (Stark et al. 1999) einen signifikanten Abfall ( $p < 0,0001$ ) der Seroprävalenz neutralisierender Antikörper gegen alle drei Poliovirustypen gesamt zwischen  $<30$ -Jährigen (62 %) im Vergleich zu  $\geq 50$ -Jährigen (48 %). Auch Diedrich et al. (2000) stellten im Rahmen des Bundesgesundheits surveys von 1997/1998 signifikant niedrigere Seroprävalenzraten bei Kleinkindern und in der Gruppe der 50–70-Jährigen fest. Gründe dafür werden jedoch nicht explizit angeführt (Diedrich et al. 2000). Bigl und Roch (2001) konnten die gleiche Feststellung in einer serologischen Untersuchung in Sachsen machen. Es zeigten sich vor allem bei Kleinkindern (0 bis 3 Jahre) und bei über 60-Jährigen niedrigere Seroprävalenzraten von 79 % und 64–70 % gegen alle drei Poliovirustypen (Bigl und Roch 2001). Sie schlussfolgerten, dass die Impfeempfehlungen der Sächsischen Impfkommision (SIKO), v.a. die Auffrischimpfung aller 10 Jahre, ihre volle Berechtigung besitzen, gehen aber nicht weiter auf mögliche Ursachen für niedrigere Seroprävalenzraten bei älteren Probanden ein. Auch in der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ zeichnete sich ein Abfall der Prävalenzen mit steigendem Alter ab (Poethko-Müller und Schmitz 2013).

Robertson (1993) führt das Waning der Immunität neben einem primären Impfversagen als Ursache für niedrigere Impfquoten vor allem gegen Poliovirus Typ 3 aber auch allgemein für Impflücken in unterschiedlicher Altersgruppen an.

Im Rahmen der Entwicklung eines Modells zur Übertragung von Polioviren gingen Duintjer Tebbens et al. (2013) davon aus, dass das Waning der Immunität in Abwesenheit von natürlicher Infektion oder Auffrischung der Immunisierung ein biologisches Phänomen darstellt. Van Spaendonck et al. (2001) stellten fest, dass bei Personen mit natürlich erworbener Immunität durch Wildviruskontakt kein sinkender Titer neutralisierender Antikörper gegen Polioviren im

Sinne eines Waning der Immunität vorliegt. Hingegen zeigen serologische Untersuchungen geimpfter Probanden mit mutmaßlich entsprechend der epidemiologischen Situation fehlendem Wildviruskontakt ein Waning des Titers über die Zeit (Van Spaendonck et al. 2001).

Kim et al. (2015) führen niedrigere GMTs bei älteren Probanden auf ein Waning der Immunität zurück und stellten ebenso fest, dass der Teil der älteren Probanden mit mutmaßlichem Wildviruskontakt weniger oder nicht abnehmende Titer zeigt. Die verringerte Zirkulation von Polioviren in vielen Teilen der Welt, sowie unzureichende Impfabdeckungen seien ursächlich für Immunitätslücken und Poliovirusausbrüche, die vor allem Erwachsene betreffen, wie beispielsweise in Tajikistan 2010 und im Kongo 2010 (Blake et al. 2014).

Waning v.a. der intestinalen Immunität geimpfter Personen mit dem Alter reduziert den Schutz vor Infektion mit Polioviren und nachfolgender Ausscheidung und kann zur Übertragung auf Erwachsene führen (Blake et al. 2014). Auch Thompson et al. (2013) nehmen Bezug auf Waning der Immunität bei nicht natürlich erworbenen Antikörpern gegen Polioviren. Sie betonen, dass die Abnahme der Antikörper bisher nicht ausreichend charakterisiert ist und im Hinblick auf den Rückgang des Kontaktes mit Wildviren im Zuge der Eradikation eine immer größere Rolle spielt (Thompson et al. 2013). Impfstrategien würden sich vor allem auf Kinder beziehen und bisher die erforderlichen Auffrischungen gerade bei Erwachsenen ausklammern.

Laut Fine et al. (2011) erfordert schwindende impferworbene Immunität im Allgemeinen höhere Immunitätslevel der Bevölkerung bzw. reguläre Auffrischungsimpfungen vor allem im Hinblick auf die Akkumulation gefährdeter Individuen in höherem Alter. Nach Shulman et al. (2006) seien vor allem ältere Personen mit abnehmender Immunität ein Risiko für die Wiedereinschleppung von Impfstämmen revertierter neurovirulenter VDPVs.

In einigen Bundesländern, wie zum Beispiel Baden-Württemberg und Sachsen, werden die Empfehlungen der STIKO nicht uneingeschränkt übernommen (Ledig et al. 2009). Für den Freistaat Sachsen wurde 1991 die Sächsische Impfkommission (SIKO) berufen. Sie „trifft ihre Empfehlungen auf der Grundlage der Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) beim Robert Koch Institut entsprechend § 20 Abs. 3 IfSG unter Berücksichtigung der epidemiologischen und historischen Besonderheiten im Freistaat Sachsen“ (Sächsische Impfkommission 2017). Abweichend von der STIKO, empfiehlt die SIKO eine Auffrischung der Impfung gegen Poliomyelitis aller 10 Jahre für alle Personen bis zur weltweiten Polioeradikation (Sächsische

Impfkommission 2017). Es ist jedoch nicht bekannt, ob dieser Empfehlung in Sachsen auch nachgegangen wird.

Eine repräsentative Seroprävalenzstudie in Sachsen zeigte niedrige Immunitätslevel bei Kleinkindern und über 60-Jährigen (Roch 2002). Roch (2002) stellte einen Zusammenhang zwischen dem Abstand zur letzten Impfung und dem Titer für Poliovirus Typ 1 und 2 fest. Der Titer sank mit zunehmendem Abstand. Bei vielen der älteren Personen lag die letzte Impfung schon länger zurück oder es erfolgte keine Grundimmunisierung, wobei bekannt ist, dass diese wirksamer ist, als erstmalig im Erwachsenenalter durchgeführte Impfungen. Roch (2002) schlussfolgerte, dass die Auffrischimpfung im Abstand von 10 Jahren weiterhin empfohlen werden soll. Sie trage dazu bei, in allen Altersgruppen eine hohe Antikörperprävalenz zu gewährleisten und so der Zirkulation importierter WPVs oder VDPVs vorzubeugen.

Vor dem Hintergrund der Verschiebung des Erkrankungszeitpunktes vom Kindes- in das Erwachsenenalter mit einer höheren Rate an fatalen Krankheitsverläufen der Poliomyelitis, erscheint es demnach sinnvoll, durch Auffrischungen aller 10 Jahre andere nicht entdeckte Impflücken deutschlandweit zu schließen. Damit wird auch zur Gewährleistung einer erforderlichen Herdenimmunität von über 95 % beigetragen.

In Bezug auf geschlechtsspezifische Unterschiede der Immunitätslevel gegen Polioviren kommen Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten, wie auch in der Untersuchung von Roch (2002) für Sachsen, keine signifikanten Unterschiede ( $n_m = 18$ ;  $n_w = 73$ ;  $p(PV1) = 0,833$ ;  $p(PV2) = 0,904$ ;  $p(PV3) = 0,535$ ) der GMTs weiblicher und männlicher Probanden festgestellt werden. Die Resultate des Bundesgesundheitsveys Erwachsener ergaben ebenfalls keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede (Diedrich et al. 2000). Selbiges traf im Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS) (2003–2006) für Kinder und Jugendliche von 0–17 Jahren zu (Poethko-Müller et al. 2007). Im Gegensatz dazu zeigte eine Untersuchung von Blutspendern in Berlin (Stark et al. 1999) signifikant höhere Immunitätslevel bei Frauen. Voigt et al. (2008) bestätigten dieses Resultat in einer Impfbefragung von Ärzten, Medizinstudierenden und Krankenpflegeauszubildenden und führten als mögliche Ursache den Trend der stärkeren Inanspruchnahme medizinischer Vorsorgeuntersuchungen durch Frauen an. Auch aus der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (Poethko-Müller und Schmitz 2013) gehen höhere Impfquoten für Frauen im Vergleich zu Männern hervor.

Nicht zu vernachlässigen ist, dass in den hier untersuchten zwei Altersgruppen die Verteilung männlicher und weiblicher Probanden unausgeglichen war, wobei vor allem die älteren Probanden weiblich waren und es insgesamt weniger männliche Probanden gab. Daraus könnte sich ergeben, dass nur deshalb kein signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen bestand, weil die älteren Probanden vor allem weiblich waren und Frauen eine höhere Seroprävalenz neutralisierender Antikörper gegen Polioviren haben. Mithilfe einer multiplen linearen Regression konnte hier nicht gezeigt werden, dass die Zugehörigkeit zur Altersgruppe oder zum Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf den Titer hat.

Letzten Endes stellt sich die Frage, inwiefern von den untersuchten Probanden auf Erwachsene in Deutschland geschlossen werden kann (Frage **1c**).

Die verwendeten Serumproben stammten von Mitarbeitern der Uniklinik Leipzig und der Sportmedizinischen Ambulanz der Universität Leipzig. Die Stichprobe setzt sich aus Klinikmitarbeitern, aber auch Studenten, Doktoranden und Praktikanten zusammen. Es sind im Allgemeinen gesunde Probanden, die sich zu arbeitsmedizinischen Einstellungs-, Folge- und Entlassungsuntersuchungen bei dem Betriebsarzt vorstellten. Im Rahmen dieser Konsultationen sollte der Impfstatus der Probanden überprüft und gegebenenfalls entsprechend der besonderen Impfeempfehlungen für medizinisches Personal (Sächsische Impfkommision 2017) aufgefrischt worden sein. Das durchschnittliche Alter der Probanden betrug 32,74 Jahre mit 42,3 % männlichen und 57,7 % weiblichen Probanden. Der große Anteil vor allem junger Erwachsener (18–30 Jahre) war am ehesten durch Auszubildende und Studierende bedingt. In der Vergangenheit durchgeführte Studien (Wicker et al. 2007, Voigt et al. 2008, Külshammer et al. 2013, Robert Koch Institut 2013a) wiesen, entgegen der Erwartung eines gesteigerten Bewusstseins für die Bedeutung und Inanspruchnahme von Immunisierungen (Krieg 2016), auf unzureichende Immunitätslevel bei v.a. Ärzten, Medizinstudierenden und Krankenpflegepersonal hin. Külshammer et al. (2013) untersuchten beispielsweise Seren von Medizinstudierenden (2004–2006, n = 424; 2008–2010, n = 427), wobei die Prävalenz neutralisierender Antikörper (Cut-Off  $\geq 10$ ) gegen Poliovirus Typ 1, 2 und 3 gesamt bei 57,1 % und 63,9 % lag. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Probanden zeigten im Vergleich deutlich höhere Immunitätslevel. Wicker et al. (2007) und Külshammer et al. (2013) waren der Meinung, dass die untersuchten Studenten aus Bonn und Frankfurt am Main die allgemeine Bevölkerung Deutschlands sehr gut repräsentieren, da bei zukünftigen Ärzten davon ausgegangen werden könne, dass sie nicht zu den Impfgegnern zählten. Aus diesem Grund kann aber umgekehrt



auch argumentiert werden, dass die geschätzten 3–5 % Impfgegner in der deutschen Bevölkerung (Meyer und Reiter 2004) nicht abgebildet werden.

Für die hier untersuchten Probanden liegt weiterhin nahe, dass vor allem die Älteren vermutlich in der ehemaligen DDR mit einer Impfpflicht aufwuchsen. Zudem empfiehlt die SIKO im Gegensatz zur STIKO eine Auffrischimpfung aller 10 Jahre. In der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ waren die Impfraten in ehemals Ost- und Westdeutschland nicht eindeutig verschieden (Poethko-Müller und Schmitz 2013). Bei Impfraten von meist >95 % in Schuleingangsuntersuchungen scheinen die Kinder in den neuen Bundesländern häufiger (nicht signifikant) vollständig grundimmunisiert zu sein (Poethko-Müller et al. 2007). Vor allem aber für Auffrischimpfungen zeichnete sich im KiGGS (Poethko-Müller et al. 2007) eine signifikant höhere Inanspruchnahme in den neuen Bundesländern ab. Weigel et al. (2014) bestätigten höhere Durchimpfungsraten in den neuen im Gegensatz zu den alten Bundesländern und führten als mögliche Begründung die Impfpflicht der Kinder in der ehemaligen DDR an. Gesammelte Daten des RKIs für das Jahr 2014 weisen ebenfalls auf höhere Impfquoten der Kinder in den neuen Bundesländern hin (Robert Koch Institut 2016b).

Aufgrund des guten Gesundheitszustandes, des medizinischen Hintergrundes, der recht jungen Altersstruktur, der vermuteten Herkunft aus der ehemaligen DDR und dem aktuellen Wohnsitz in Sachsen scheinen die Probanden nicht ohne Einschränkung repräsentativ für Erwachsene in Deutschland zu sein. Würde von dieser Stichprobe auf die Gesamtbevölkerung geschlossen werden, könnte der tatsächliche Immunitätsstatus der deutschen Bevölkerung mithin tendenziell überschätzt werden.

## **6.2. Eignung der Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser**

Dieser Abschnitt der vorliegenden Arbeit diskutiert die Eignung der angewendeten Methode zum Nachweis von Polioviren und NPEV in Flusswasser unter Beantwortung der Fragen **2a** und **b**.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung von Flusswasser als denkbare Medium zur Übertragung von Polioviren in der Umwelt. In der Regel sind die Konzentrationen zirkulierender Enteroviren in Oberflächenwasser gering (Bosch et al. 2008) und werden durch Faktoren wie Witterung, urbane Zuflüsse und saisonale Erkrankungshäufung vor allem in den Som-

mermonaten (Hamborsky et al. 2015) beeinflusst. Das Ausgangsvolumen muss für die Anreicherung der Viren konzentriert werden. Dies erfolgt meistens in zwei Schritten. Zu den grundlegenden Prinzipien zählen Adsorption und Elution, Zwei-Phasen-Separation, Zentrifugierung und Filtration (Percival 2004), die als primäre und sekundäre Konzentrierung kombiniert werden können.

Bei Adsorptions- und Elutions-Methoden binden Viren basierend auf Ladungsunterschieden an einen Filter und werden nach Entfernung des Wassers wieder in ein kleineres Volumen gelöst (Winona et al. 2001). Wegen der negativ geladenen Virusoberfläche müssen abhängig vom verwendeten Filter (elektronegativ oder elektropositiv) entweder der Filter oder das Wasser für die Adsorption vorbehandelt werden (Cashdollar und Wymer 2013). Für die Lösung der Viren vom Filter werden Rinderextrakt oder aber auch Lösungen mit Aminosäuren und Salzen genutzt (Cashdollar und Wymer 2013). Bei der Anwendung elektronegativer Filter erfolgt die Anpassung des pH-Wert und des Salzgehaltes des Wassers (Cashdollar und Wymer 2013). Diese Methode erzielt hohe Wiederfindungsraten, ist günstig und breit verfügbar (Cashdollar und Wymer 2013). Da große Wasservolumina konditioniert (Bosch et al. 2008), oder aber die Filter gleichmäßig vorbehandelt werden müssen, ist die Reproduzierbarkeit nicht optimal (Cashdollar und Wymer 2013). Elektropositive Filter ermöglichen die zuverlässige Prozessierung großer Volumina, sind aber sehr teuer (Bosch et al. 2008). Alternativ kommen von Hand hergestellte günstigere elektropositive Glaswollensäulen zum Einsatz (Cashdollar und Wymer 2013). Trotz hoher Wiederfindungsraten kann die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wegen stark schwankender Filterleistung nicht gewährleistet werden (Bosch et al. 2008). Ein weiterer Nachteil sind mit schlechterer Wasserqualität abnehmende Filtrationsleistungen (Winona et al. 2001).

Zwei-Phasen-Separations-Methoden basieren auf der Trennung der Probe durch Zugabe unterschiedlicher organischer Polymere (z.B. Natrium-Dextran-Sulfat und Polyethylenglykol), wodurch sich die Viren in einer Phase sammeln und das Volumen durch Abtrennung der anderen virusfreien Phase reduziert wird (Percival 2004). Die Methoden eignen sich für besonders verschmutzte Proben, die Filterporen frühzeitig verstopfen würden (Bosch et al. 2008). Die verwendeten Chemikalien können jedoch toxisch und inhibierend für weitere Untersuchungsmethoden im Anschluss an die Konzentrierung sein (Bosch et al. 2008).

Basierend auf guten Erfahrungen von Arbeitsgruppen des UFZ Leipzig erfolgte die primäre und sekundäre Konzentrierung hier mit Tangentialflussultrafiltration und Ultrazentrifugierung, gefolgt vom direkten Nachweis der Polioviren und NPEVs in einer quantitativen Real Time RT-PCR.

Die Ultrafiltration ist ein rein physikalisches Verfahren und basiert auf Größenausschluss (Winona et al. 2001). Sie ist vor allem für „saubere“ Wassermatrizes, wie Oberflächenwasser geeignet (Bosch et al. 2008). Zu den wenigen Nachteilen zählen die Kosten für die verwendeten Filter, sowie der erhebliche Zeitaufwand für größere Probenvolumina (Bosch et al. 2008). Positiv hervorzuheben ist, dass die Filtration im Gegensatz zu Adsorptions- und Elutions-Methoden unabhängig von variierenden Ladungseigenschaften der Virusoberflächen funktioniert (Cashdollar und Wymer 2013). Abgesehen von den Kosten für die Anschaffung der Filtrationssysteme, überzeugen diese durch konstante Leistungen und Wiederverwendbarkeit, wodurch reproduzierbare Resultate möglich sind (Winona et al. 2001). Da die Konzentrierung der Wassermatrix zunächst nicht selektiv ist, können die Analysen auch auf andere Pathogene ausgeweitet werden (Furtak et al. 2016). Furtak et al. (2016) führten beispielsweise eine Hochdurchsatz-Sequenzierung mit deep sequencing und direkter Metagenomanalyse durch. Dieser Ansatz würde eine schnelle Umweltüberwachung von Viren ermöglichen, ein Zentraldepot des gesamten Viroms (alle Viren in einem Lebensraum, in Anlehnung an den Begriff „Mikrobiom“) liefern und Aufschluss über die Epidemiologie bieten (Furtak et al. 2016).

Die Ultrazentrifugierung basiert ebenfalls auf physikalischen Eigenschaften. Unterschiedliche Sedimentationskonstanten ermöglichen die Konzentrierung von Viren in einer bestimmten Phase (Bosch et al. 2008). Die speziellen Zentrifugen sind wie auch Ultrafiltrationssysteme teuer in der Anschaffung, können aber ebenfalls lange verwendet werden (Bosch et al. 2008).

Die Etablierung der Konzentrierungsmethode im UFZ erfolgte in Anlehnung an die Anleitung des „Virus Ecology Workshops“ in Plymouth 2006 (Marine Biological Association (MBA) 2006). Diese beschreibt die Verwendung der „Cross Flow Filtration“, also der Tangentialflussfiltration (TFF). Im Gegensatz zur einfachen Ultrafiltration zirkuliert die Flüssigkeit dabei mehrfach gleichmäßig über die Filteroberfläche, wodurch die Poren der Membran länger durchgängig bleiben und eine konstante Filtration während des gesamten Durchlaufs möglich wird (Polaczyk et al. 2008). Furtak et al. (2016) zeigten zudem, dass die TFF in der Lage ist, die meisten Verunreinigungen inklusive der PCR-Inhibitoren zu entfernen. Da der Hersteller, der im Rah-

men dieser Arbeit verwendeten Filterkassetten angibt, dass die Virusadsorption der Membranoberfläche minimal sei (Sartorius Stedim Biotech GmbH 2010), wurde zunächst auf eine Vorbehandlung der Filter mit FKS oder einen zusätzlichen Elutionsschritt mit Glycin zur Steigerung der Wiederfindungsraten (Winona et al. 2001) verzichtet. Auch die Arbeitsgruppen des UFZ verwenden das Filtrationssystem ohne Zusätze. Die Zugabe proteinhaltiger Lösungen wie beispielsweise FKS könnte zudem inhibierend auf angeschlossene Nachweismethoden wirken. Winona et al. (2001) verzeichneten niedrigere Wiederfindungsraten bei schlechterer Wasserqualität, also Oberflächenwasser im Vergleich zu Leitungswasser. Die Viren lägen häufiger an Partikel gebunden vor, die mit konzentriert würden (Winona et al. 2001). Der verwendete Versuchsaufbau beinhaltete aus diesem Grund eine Vorfiltration mit einem groben Sieb und in der TFF Filterkassetten zweier verschiedener Porengrößen (Wommack et al. 2010). Huminsäuren, die zu bekannten Inhibitoren molekularer Nachweismethoden zählen, haben eine Größe von ca. 1 kDa, sind also deutlich kleiner als Polioviren. Durch die Verwendung der zwei verschiedenen Filtergrößen sollten diese entfernt werden (Hata et al. 2015).

Untersuchungen von Cashdollar und Wymer (2013) zu verwendeten Probenvolumina zeigten, dass Volumina <10 l und >100 l schlechtere Wiederfindungsraten boten als 10–100 l. Aufgrund der Handhabbarkeit der Probennahme und der Kapazitäten im UFZ betrug das Volumen für diese Arbeit auch 10 l. Ein weiterer Nachteil größerer Probenvolumina ist, dass entsprechend mehr inhibitorische Substanzen mitkonzentriert werden (Gibson et al. 2012).

Inhibierende Einflüsse auf die Nachweismethoden im Anschluss an die Konzentrierung können zu falsch-negativen Resultaten führen (Dreier et al. 2005, Gibson et al. 2012). Das Infektionsrisiko ausgehend von einer Wasserquelle könnte unterschätzt werden (Gibson et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung eines Kits zur Nukleinsäure-Extraktion ein Großteil der Inhibitoren entfernt wird (Gibson et al. 2012, Cashdollar und Wymer 2013, Hata et al. 2015). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die RNA-Isolation mit einem der beschriebenen Kits (QIAamp® Viral RNA Mini Kit).

Im Anschluss an die Isolation der viralen RNA erfolgte der direkte Nachweis in der PCR in Anlehnung an die in Israel entwickelte WPV1-SOAS spezifische qRT-PCR (Hindiyeh et al. 2014). Ziel war es schneller als mit zellkulturbasierten Methoden ein Resultat zu erhalten (Hindiyeh et al. 2014), den sensitiven Nachweis infektiöser und nicht-infektiöser Viruspartikel zu führen und damit auch Hinweise auf eine virale Kontamination zu detektieren (Fong und Lipp 2005).

Die Verwendung eines quantitativen Real Time RT-PCR Protokolls ermöglicht zudem die Quantifizierung der nachweisbaren Virusmengen im Hinblick auf eine Risikoabschätzung (Fong und Lipp 2005).

Mit Bezug auf das angewendete Versuchsprotokoll stellen sich die Fragen **(2a)**, mit welcher Sensitivität und Spezifität der Poliovirusnachweis in Flusswasser erfolgt und **(2b)** ob Polioviren oder NPEV in der Holtemme nachgewiesen werden können.

Die Validierung der Methode zum Virusnachweis in Flusswasser erfolgte mit Spikeversuchen in Fluss- und Reinstwasser mit dem Ziel, die zugegebene Menge Poliovirus Typ 1 bzw. Baculovirus nach Durchlaufen der Konzentrierung mit einer möglichst geringen Verlustrate in der jeweils spezifischen PCR nachzuweisen. Die Wiederfindungsrate in Prozent entsprach dem Quotienten der amplifizierten Virusmenge in der PCR und der eingangs zugegebenen Menge. Sie umfasste das gesamte Protokoll und nicht jeden einzelnen Schritt separat (Cashdollar und Wymer 2013).

Um Sicherheitsstandards bei der Durchführung der Versuche im Umweltforschungszentrum einzuhalten, mussten die Polioviruszellkulturüberstände im Gegensatz zu nicht humanpathogenen Baculoviren durch Hitze inaktiviert (Strazynski et al. 2002) werden. Der Vergleich zwischen RNA aus Zellkulturüberständen, die bei Hitze inkubierten und RNA aus nicht inaktivierten Überständen zeigte im Durchschnitt keine Verluste. Aufgrund des Einflusses auf die Struktur der RNA, waren andere Verfahren zur Inaktivierung von Polioviren wie Bestrahlung mit UV-Licht oder Anwendung von Desinfektionsmitteln für den anschließenden molekularen Nachweis mittels PCR ungeeignet.

Die von Hindiyyeh et al. (2014) ermittelte Nachweisgrenze der WPV1-SOAS spezifischen PCR lag bei 0,1 pfu/Reaktion, bzw. 20 pfu/ml. Umgerechnet entspricht 1 pfu ca. 1,43 TCID<sub>50</sub>. Bei dem in dieser Arbeit ermittelten Faktor 1000 zwischen infektiösen Polioviruspartikeln (in TCID<sub>50</sub>) und in der PCR detektierten Kopien, ergibt sich daraus eine Nachweisgrenze von 143 K/R bzw. 28600 K/ml. Insofern der Vergleich zulässig ist, scheint die Sensitivität der PanPolio-PCR mit 36,7 K/R bzw. 4240 K/ml für isolierte RNA aus Zellkulturüberstände zunächst besser zu sein. Unabhängig davon ist anzumerken, dass eine niedrigere Sensitivität des PanPolio-PCR Protokolls durch eine geringere Spezifität erklärt werden kann. Die PCR von Hindiyyeh et al. (2014) hat ein spezifisches Poliovirus Isolat als Zielsubstanz, während die PanPolio-PCR ein möglichst breites Spektrum an Poliovirusisolaten detektieren soll. Die verwendeten Primer

und Sonden (Kilpatrick et al. 2009) enthalten aus diesem Grund degenerierte Basen. Die allein für die PanPolio-PCR unabhängig von der Konzentrierung ermittelte Sensitivität und Spezifität ist vor diesem Hintergrund als sehr gut einzuschätzen.

Da aufgrund der epidemiologischen Situation in Deutschland und auch der WHO-Region Europa primär nicht mit dem Vorkommen von Polioviren gerechnet wird, erfolgte parallel die Testung isolierter RNA aus Flusswasser in der Enterovirus-PCR. Diese ist in der Lage neben Polioviren auch NPEV zu detektieren und somit, auch in Abwesenheit von Polioviren, eine Kontamination des Flusswassers anzuzeigen. Die rein physikalischen Methoden zur Konzentrierung der Flusswasserproben sind bis auf die Größe und Sedimentationskonstanten recht unspezifisch und ermöglichen somit die Ausweitung der Analysen der untersuchten Wassermatrix über Polioviren hinaus.

Die mittels TFF und Ultrazentrifugierung erreichte Volumenreduktion von 10 l auf ca. 500 ml war geeignet und ausreichend, um anschließend wie hier die RNA-Isolation und PCR oder alternativ eine Anzucht auf permissiven Zellkulturen durchzuführen. Jedes gemessene positive Fluoreszenzsignal bzw. jede eindeutige Bande auf Höhe des spezifischen Produktes im Agarose-Gel zählte in der Auswertung als erfolgreicher Nachweis. Die ermittelten Konzentrationen waren teils so gering, dass jedoch von einer unzulässigen Quantifizierung ausgegangen werden musste. Die erzielten Wiederfindungsraten lagen deutlich niedriger als erwartet.

Beispielsweise ermittelten Winona et al. (2001) bei einer Spikekonzentration von ca. 1000 pfu/ml Poliovirus Typ 2 (Sabin) in 2 l Oberflächenwasser mittels TFF, Vorbehandlung der Filter mit 5 % FKS, zusätzlicher Rezirkulation des Filtrates und Elution membrangebundener Polioviren in 100 ml 0,05 % FKS in 0,05 M Glycin eine Wiederfindungsrate von 77 %. Vergleichend betrug die Spikekonzentration von Poliovirus Typ 1 in 10 l Flusswasser versetzt mit 500 µl virushaltigem Zellkulturüberstand 6,41 TCID<sub>50</sub>/ml, also ca. 4,5 pfu/ml. Die Spikekonzentration war deutlich niedriger, das Probenvolumen das Fünffache und es kamen keine zusätzlichen Filterbehandlungen oder Elutionsschritte zum Einsatz. Auch Cashdollar und Wymer (2013) zitieren variierende aber höhere Wiederfindungsraten für Spikeversuche mit Polioviren von 16–97 % in 100 l Oberflächen-, Grund- oder Leitungswasser mit verschiedenen Spikekonzentrationen und Konzentrierungs- und Nachweismethoden. Die Wiederfindungsraten unterschiedlicher Studien sind wegen abweichender Methoden nur bedingt direkt vergleichbar.

In der PanPolio-PCR zeigten sich im Rahmen dieser Arbeit für keine der konzentrierten Flusswasserproben Fluoreszenzsignale. Hingegen gelang die Detektion geringer Mengen RNA aus Flusswasser- und Reinstwasserproben in der EV-PCR. Die Wiederfindungsrate betrug max. 0,001 %. Die jeweils durch Quantifizierung mithilfe des mitgeführten Plasmid-Standards ermittelte Konzentration der positiven Proben war zu gering für eine Sequenzierung zur Identifikation der Isolate. Als mögliche Ursachen für die sehr niedrigen Wiederfindungsraten und Fluoreszenzsignale in der PCR kamen eine sehr starke Inhibition durch Eigenschaften oder Bestandteile des Flusswassers oder aber hohe Verluste während der Konzentrierung und dafür zu niedrig kalkulierte Konzentrationen des Spikematerials in Frage. Ausgehend von der Annahme einer weitestgehend verlustfreien Konzentrierung des Flusswassers, leiteten sich die gewählten Konzentrationen des Spikematerials primär von der Nachweisgrenzen der PanPolio- und EV-PCR ab.

Um inhibierende Faktoren des Flusswassers, wie beispielsweise den Verdau von RNA durch RNasen zu detektieren, erfolgten die Tests zusätzlich mit Baculovirus-Zellkulturüberständen. Baculoviren sind am Institut für Virologie für verschiedene molekulare Nachweismethoden als interne Kontrolle etabliert.

Interne Kontrollen (konkurrierend oder nicht konkurrierend) werden entweder bereits vor der Konzentrierung, der Extraktion der Nukleinsäure oder der Amplifikation in der PCR zur Probe hinzugefügt. Nicht konkurrierende interne Kontrollen haben eine andere Nukleinsäuresequenz und damit andere Primer- und Sondenbindungsstellen als die Zielsequenz, wodurch sie nicht exakt die gleiche Amplifikation darstellen (Dreier et al. 2005). Konkurrierende Kontrollen hingegen haben die gleichen Primer- und Sondenbindungsstellen wie das Substrat, sodass eine unabhängige Quantifizierung des Substrates nicht möglich ist (Dreier et al. 2005). Der Vergleich der Zyklusanzahl der Amplifikation der internen Kontrolle in der zu untersuchenden Probe und einer parallel durchgeführten Amplifikation der Kontrolle in z.B. Wasser zeigt an, ob eine Inhibition (Abweichung von  $>1-3$  Zyklen (in Ct) (Gibson et al. 2012, Hindiye et al. 2014)) vorliegt.

Für Baculoviren wird am Institut für Virologie eine sequenzielle PCR durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgt die Baculovirus-PCR in der zu untersuchenden Probe. Zeigt sich dabei eine Zyklusdifferenz von  $< 1,75$  Ct im Vergleich zur Referenz, so gilt die Probe als nicht inhibiert. Liegt

eine Differenz von  $> 1,75$  Ct vor, ist die Probe teilinhibiert. Wird kein Fluoreszenzsignal gemessen, liegt vollständige Inhibition vor. Im zweiten Schritt erfolgt die Testung derselben Probe und Verdünnungen dieser Probe in der spezifischen PCR des humanpathogenen Virus.

Für die konzentrierten Flusswasserproben konnte kein Fluoreszenzsignal in der Baculovirus-spezifischen PCR gemessen werden. Möglicherweise war die Konzentration der eingesetzten Baculoviren zu niedrig. Inhibition konnte nicht sicher ausgeschlossen werden. Da parallel durchgeführte Untersuchungen für Poliovirus Typ 1 in Reinstwasser nur sehr niedrige Wiederfindungsraten zeigten, schien der Virusverlust, unabhängig von einer möglichen Inhibition der Extraktion oder der PCR durch Flusswasserbestandteile, sehr hoch zu sein. Eine Verdünnung der isolierten Nukleinsäure aus Flusswasser zur Reduktion inhibitorischer Einflüsse von Flusswasserbestandteilen und damit Steigerung des Fluoreszenzsignals in der PCR erschien nicht sinnvoll. Allgemein kann die Verdünnung der Zielsubstanz vor allem bei geringen Konzentrationen auch zu falsch-negativen Resultaten führen (Gibson et al. 2012, Cashdollar und Wymer 2013, Hata et al. 2015).

Üblicherweise wird eine Probe bei festgestellter Inhibition entweder pauschal 1:5, 1:10, 1:25 oder 1:100 verdünnt oder versucht durch Zugabe von beispielsweise 0,5 % BSA die Inhibition zu unterdrücken (Gibson et al. 2012, Cashdollar und Wymer 2013, Hindiyeh et al. 2014, Hata et al. 2015). Gibson et al. (2012) entwickelten eine spezielle Formel für die Berechnung eines probenspezifisch ausreichenden Verdünnungsfaktors anhand der Ct-Differenz. Es zeigte sich, dass eine pauschale Verdünnung von 1:10 aller inhibierten Samples in 40 % der Fälle die Zielsequenz zu stark verdünnt hätte (Gibson et al. 2012).

Im Rahmen der Spikeversuche konnte weiterhin festgestellt werden, dass sowohl in der Pan-Polio- als auch der EV-PCR positive Fluoreszenzsignale (0,025–2010 K/R) für eigentlich verworfene Rückflüsse und Waschflüssigkeiten entstanden. Dabei waren die Fluoreszenzsignale in der PanPolio-PCR höher als in der Enterovirus-PCR. Es kann davon ausgegangen werden, dass Polioviren amplifiziert wurden. Analog zur Wiederfindungsrate betrug die ermittelte Verlustrate 0,017 % des ursprünglichen Spikematerials. Diese Erkenntnis kann die niedrigen Wiederfindungsraten in Fluss- und Reinstwasser jedoch nicht hinreichend erklären. Am ehesten waren die gewählten Konzentrationen der zugesetzten virushaltigen Zellkulturüberstände deutlich zu niedrig. Außerdem wahrscheinlich scheint, dass die Viren trotz der eigentlich geeigneten Filtereigenschaften an der Membranoberfläche hafteten und deshalb weder im Filtrat noch in den Rückflüssen konzentriert und nachgewiesen werden konnten.



Für den Fall, dass die Wiederfindungsraten nur im Flusswasser niedrig gewesen wären, könnte die Bindung von Polioviren an Schwebeteilchen oder Bakterien oder Aggregation mehrerer Viren ein Erklärungsansatz sein. Damit würden sich die Polioviren dem der Nachweismethode zugrundeliegenden Größenausschluss entziehen (Fleischer und Schneider 2012, Robinson und Pfeiffer 2014). Bakterielle Oberflächenpolysaccharide (wie Peptidoglykan und LPS) verstärken die Stabilität der Polioviruspartikel, sowie die Zellanhaftung durch stärkere Bindung an den hPVR, begrenzen die Hitzeinaktivierung und stabilisieren sie so bei wärmeren Umgebungstemperaturen. Es konnte gezeigt werden, dass Bakterien die Poliovirus-Infektion begünstigen (Mausmodelle mit Antibiotikabehandlung). Sie binden an Polioviren, um die vorzeitige RNA-Freisetzung und damit Destabilisierung des Virus zu verhindern (Robinson und Pfeiffer 2014). Neben Temperatur, UV-Exposition und Adsorption an Schwebeteilchen, haben in natürlichen Gewässern auch Fraß durch Geißeltierchen, extrazelluläre Proteasen, Nukleasen und andere Enzyme einen Einfluss auf die Viruspersistenz in der Umwelt (Fong und Lipp 2005). Im Rahmen der Spikeversuche spielt dies weniger eine Rolle als bei der tatsächlichen Testung von Umweltproben.

Insgesamt zeigt sich, dass die in den Versuchen im Rahmen der Arbeit erhobenen Daten keine zuverlässige Aussage über die Sensitivität und Spezifität der gesamten Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser von der Konzentrierung des Flusswassers bis zur Identifikation des Isolates erlauben (Frage **2a**).

In den bereits konzentrierten und isolierten Flusswasserproben aus der Holtemme konnte weder Entero- noch Poliovirus-RNA nachgewiesen werden (Frage **2b**). Wegen der niedrigen Sensitivität der entwickelten Nachweismethode konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest Enteroviren an den untersuchten Orten vorhanden waren. Einer der Gründe weshalb die Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser wie beschrieben erfolgte, waren vielversprechende Resultate der Arbeiten von Kallies. Er führte mit selbiger Konzentrierungsmethode andere Untersuchungen an den bereits genannten 13 Standorten der Holtemme durch. Bisher nicht publizierte Daten zur Untersuchung des Flusswassers der Holtemme (virale Metagenome, taxon-spezifische (RT)-PCR) zeigen, dass nach ebendieser Methode genetisches Material, sowohl DNA als auch RNA, nachgewiesen werden konnte.

### 6.3. Einschätzung der Infektionsgefährdung durch Polioviren in der Umwelt

Gegenstand des folgenden Abschnitts ist die Einschätzung der Infektionsgefährdung Erwachsener durch Polioviren in der Umwelt basierend auf dem Immunitätsstatus der untersuchten Probanden und der angewendeten Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser (Frage 3).

Nach Einschätzung des Robert Koch Instituts sei eine Poliovirus-Verbreitung nach möglicher Einschleppung bei ausreichendem Immunitätsstatus der Bevölkerung Deutschlands eher unwahrscheinlich (Diedrich et al. 2016, Robert Koch Institut 2016d). Die Aussagen zum Immunitätsstatus bezogen sich dabei weitestgehend auf Erhebungen des Impfstatus und Immunitätslevel von über 80 % wurden als ausreichend eingestuft. Erfolgte Impfungen sind jedoch wie sich in dieser Arbeit zeigte nicht sicher gleichbedeutend mit einem ausreichenden Titer neutralisierender Antikörper gegen Polioviren. Sauerbrei et al. (2004) und Nijsten et al. (2015) stellten zudem niedrigere tatsächliche serologische Immunitätslevel im Vergleich zum anamnестischen Impfschutz fest.

Laut Fine (1993) ist ein Schutz von 80–86 % der Bevölkerung für die Gewährleistung von Herdenimmunität erforderlich. Erkrankten Menschen aber wie bereits bei einigen Ausbrüchen beobachtet zunehmend im Jugend- und Erwachsenenalter verschiebt sich die erforderliche Immunität auf > 95 %. Auch die WHO fordere aktuell mindestens 95 % Durchimpfung der Bevölkerung im Hinblick auf das Ziel der Eradikation der Poliomyelitis. Eine Impfquote von mindestens 95 % sei laut RKI ein wichtiger Indikator zur Einschätzung des Risikos der Weiterverbreitung eines eingeschleppten Poliovirus in der Bevölkerung (Robert Koch Institut 2018a). Inwiefern aktuell tatsächlich serologische Immunitätslevel über 95 % in der deutschen Bevölkerung gewährleistet werden, scheint aufgrund weniger aktueller Erhebungen des Immunitätsstatus nicht hinreichend untersucht.

Der Immunitätslevel der untersuchten Stichprobe war insgesamt hoch (signifikant > 80 %). Ein signifikantes Überschreiten der erforderlichen 95 % konnte für Seroprävalenzen gegen Poliovirus Typ 1 und 2, nicht aber gegen Typ 3 und gegen alle drei Serotypen gesamt gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass die untersuchten Probanden mitunter nicht ausreichend immunisiert waren.

Weiterhin könnte der Immunitätslevel der untersuchten Stichprobe (wegen der beschriebenen Besonderheiten (1c)) den tatsächlichen Immunitätsstatus der deutschen Bevölkerung

mithin tendenziell überschätzen. Dafür spricht außerdem, dass Risikogruppen wie u.a. Neugeborene und Säuglinge, Schwangere, deutlich ältere Menschen, chronisch Kranke und durch z.B. AIDS oder nach Organtransplantation Immunkompromittierte (Walter 2013) im Rahmen dieser Untersuchung nicht erfasst wurden. Sie machen allerdings ca. 20 % der Bevölkerung in entwickelten Ländern aus (Walter 2013) und sind besonders auf den Schutz durch eine ausreichende Herdenimmunität angewiesen.

Über die Herkunft der getesteten Probanden lagen keine Informationen vor. Untersuchungen in der jüngsten Vergangenheit zeigten vergleichbar hohe, sehr gute und zum Teil bessere Impfquoten von Menschen mit Migrationshintergrund im Vergleich zu Einheimischen (Bigl und Roch 2001, Roch 2002, Diedrich und Schreier 2007, Schenk et al. 2008).

Ausgehend vom Polio-Ausbruch in Syrien 2013, bedingt durch einen starken Einbruch in der Bevölkerungsimmunität während des Bürgerkriegs auf <70 %, wuchs zeitweise die Besorgnis der Polio-Einschleppung nach Deutschland bei steigender Zahl der Asylsuchenden aus Syrien (Robert Koch Institut 2013b, Zeitlmann et al. 2016). Das 2013/2014 durchgeführte Stuhlscreening bei aus Syrien eintreffenden nach 2010 geborenen Kindern (n = 445) zeigte schließlich keine WPV-Ausscheider, lediglich 2,7 % der Stuhlproben enthielten Sabin-ähnliche Polioviren, vereinbar mit einer erfolgten OPV-Immunsierung im Herkunftsland (Böttcher et al. 2015).

Vor diesem Hintergrund wird für asymptomatische Personen aus polioendemischen Ländern weder ein Stuhlscreening auf Poliovirus-Ausscheidung noch eine serologische Untersuchung auf Poliovirus-Antikörper empfohlen (Robert Koch Institut 2014a). Laut Empfehlung der STIKO 2016/2017 sind Indikationsimpfungen bei Reisenden in Regionen mit Infektionsrisiko (laut aktuellen Informationen der WHO) erforderlich, zudem bei Aussiedlern oder Geflüchteten die in Gemeinschaftsunterkünften leben bei Einreise aus Gebieten mit Poliomyelitisrisiko (Sächsische Impfkommision 2017).

Eine Eintragung von Infektionserregern, auch Polioviren, durch Reisende, Aussiedler oder Geflüchtete kann schlussendlich aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Robert Koch Institut 2015b).

Aufgrund der ermittelten Daten war es nicht möglich, die Sensitivität und Spezifität der gesamten Methode zum Poliovirusnachweis in Flusswasser zu definieren. Durchgeführte Kalkulationen zeigten, dass die Nachweismethode nicht sensitiv genug war, eine Poliovirus Typ 1 Konzentration in Höhe der MID oder niedriger zu detektieren. Erfolgte jedoch der Nachweis

mindestens 1 K/R mit der angewendeten Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser, überschritt die Konzentration im untersuchten Oberflächenwasser die MID und bei oraler Aufnahme von mindestens 100 ml bestünde ein Infektionsrisiko. Mit Bezug auf den Manifestationsindex von Poliovirusinfektionen von 1 % wäre auch ein paralytischer Verlauf möglich. Zu beachten ist, dass gerade bei niedrigen Viruskonzentrationen („Low-level“) Exponierte nur gelegentlich erkranken. Durch die Ausscheidung der Viren nach Infektion ist jedoch eine weitere Verbreitung auf andere Personen wahrscheinlich und das Risiko neuer Krankheitswellen erhöht („ripple-effect“) (Walter 2013).

In einem Model zur Kalkulation der Tage die vergehen bis eine Wiedereinschleppung von Polioviren in Europa detektiert wird und der Anzahl der Personen die bis dahin infiziert sind, variierten die Zahlen zwischen 326–512 Tagen und 235–1439 infizierten Personen bis zum Nachweis der Polioviren (Bencsko und Ferenci 2016). Die Berechnungen bezogen Impfquoten sowie das Impfgemeinschaft vor allem im Hinblick auf die reine IPV-Immunsierung oder die Umstellung von OPV auf IPV in den unterschiedlichen europäischen Ländern ein.

Bencsko und Ferenci (2016) zeigten, dass die stumme Zirkulation von Polioviren in Ländern mit hohen Impfquoten und vor allem hohem Anteil an IPV-Immunsierungen länger ist und eine mangelnde Überwachung die Anzahl der Tage und der Infizierten bis zur Feststellung der Zirkulation durch Detektion eines AFP-Falles weiter steigert.

Die verlängerte unentdeckte Zirkulation begünstigt zudem wegen der hohen Mutations- und Rekombinationsrate von Polioviren (Wimmer et al. 1993, Liu et al. 2003, Paximadi et al. 2008) das Auftreten genetisch veränderter Isolate. Unter Umständen sind herkömmliche Impfkörper nicht in der Lage diese zu neutralisieren (Drexler et al. 2014, Lukashev et al. 2016), sodass es trotz ausreichender Bevölkerungsimmunität zu erneuten Polioerkrankungen kommen könnte.

Neben mangelnder Immunität, Einschleppung von Polioviren aus endemischen Ländern durch z.B. Reisende mit nachfolgender stummer Zirkulation in der Umwelt und dem möglichen Auftreten genetisch abweichender Poliovirusisolate, kann menschliches Versagen im Umgang mit Polioviren in z.B. Labors oder Produktionsstellen von Impfstoffen ein weiteres Risiko für das Auftreten erneuter Poliofälle in poliofreien Regionen darstellen. Duizer et al. (2016) berichten beispielsweise über die akzidentielle Freisetzung von  $10^{13}$  infektiösen WPV Typ 3 Partikeln in einer Impfstoffproduktionsfirma in Belgien Ende 2014. Es folgten Sicherheitsvorkehrungen

wie Badeverbote in betroffenen angeschlossenen Gewässern, sowie zusätzliche IPV-Immunsierungen (Duizer et al. 2016). Später publizierte Daten zeigten, dass weder in Gewässern, noch in Meeresfrüchten oder Routineabwasseruntersuchungen Polioviren detektiert wurden (Duizer et al. 2016). Unabhängig davon sei das Infektionsrisiko beim Schwimmen sehr hoch, das Risiko an paralytischer Poliomyelitis zu erkranken wegen des niedrigen Manifestationsindex trotzdem sehr gering gewesen (Duizer et al. 2016).

Vor allem in den verbleibenden Poliovirus-endemischen Ländern Afghanistan, Pakistan und Nigeria zählen mangelnde Ressourcen, instabile politische Situationen, anhaltende Bevölkerungsbewegungen aus und in endemische Regionen und Opposition gegenüber Impfstrategien (Stefanelli et al. 2016) zu den bleibenden Herausforderungen. Die Vorgaben des Global Action Plan 2013-2018 (World Health Organization 2013) mit dem Ziel der Eradikation der Poliomyelitis können besonders dort kaum eingehalten werden, sodass weiterhin mit der Einschleppung von Polioviren in bereits poliofreie Regionen der Welt gerechnet werden muss.

Eine verlässliche Einschätzung der Infektionsgefährdung Erwachsener durch Polioviren in der Umwelt war anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Basierend auf dem Immunitätsstatus der untersuchten Probanden kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass Erwachsene in Deutschland aktuell ausreichend gegen ein erneutes Auftreten von Poliovirusinfektionen geschützt sind. Die angewendete Methode zum PCR-basierten Nachweis von Polioviren in Flusswasser eignete sich nicht um das Vorkommen von Polio- oder NPEV in der Holtemme auszuschließen. Wegen fehlender Umweltüberwachung in Deutschland kann eine stumme Zirkulation von WPVs, VDPVs oder OPV-like PVs weiterhin nicht sicher ausgeschlossen werden.

#### **6.4. Limitationen**

Die Arbeit unterliegt verschiedenen Limitationen, die die Beantwortung der initial abgeleiteten Fragestellungen einschränkten.

Die Standardabweichung der GMTs der virushaltigen Zellkulturüberstände für Poliovirus Typ 1, 2 und 3 spiegelte im Rahmen dieser Arbeit tolerierte experimentelle Schwankungen wieder. Die Zellkulturüberstände dienten der Beimpfung der RD-Zellen im Rahmen der VNTs. Bei strengerer Betrachtung hätten wenige der durchgeführten VNTs wegen einer Abweichung der

Poliovirustiter der Zellkulturüberstände nicht in die Gesamtwertung einbezogen werden dürfen. Gleiches galt für Abweichung der Titer der Serumkontrolle. Die ermittelten Standardabweichungen der GMTs des Kontrollserums wurden ebenfalls akzeptiert und als vertretbar gewertet. Die daraus resultierende vermutlich geringe Verschiebung der Resultate sollte nicht ignoriert, aber auch nicht überbewertet werden. Die vorliegenden Abweichungen schienen sich auszugleichen.

Basierend auf Resultaten von Seroprävalenzstudien der jüngsten Vergangenheit stellte sich auch im Rahmen dieser Arbeit die Frage, ob altersspezifische Unterschiede der Titer vorliegen. Hierfür erfolgte stellvertretend der direkte Vergleich der GMTs zweier Altersgruppen mit einer durchschnittlichen Altersdifferenz von 15 Jahren. Fraglich ist, inwiefern diese Differenz geeignet war, um Unterschiede festzustellen. Es kann abschließend nicht ausgeschlossen werden, ob Unterschiede zwischen z.B. 18–31-jährigen und älter als 53-jährigen Probanden vorlagen. Weiterhin war die Verteilung von weiblichen und männlichen Probanden zugunsten der Frauen in den zwei Altersgruppen unausgeglichen. In dieser Konstellation konnten weder alters- noch geschlechtsspezifische Unterschiede gezeigt werden. Limitierend ist, dass diese Feststellung durch die inhomogene Zusammensetzung bedingt sein könnte. Mithilfe einer multiplen linearen Regression konnte zumindest nicht gezeigt werden, dass die Zugehörigkeit zur Altersgruppe oder zum Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf den Titer hat. Dies schließt jedoch nicht aus, dass andere hier nicht untersuchte Einflussfaktoren oder direkte oder indirekte Zusammenhänge zwischen den Einflussfaktoren vorliegen.

Da über die genaue berufliche Tätigkeit und Herkunft der Probanden keine Informationen vorlagen, wurde lediglich angenommen, dass ein Großteil in der Gesundheitsversorgung tätig war und in der DDR aufwuchs. U.a. daraus leitete sich die Schlussfolgerung ab, dass die untersuchte Stichprobe nur bedingt repräsentativ für Erwachsene in Deutschland war. Einschränkend konnte das aber nicht mit Fakten gezeigt werden.

Das Plasmid (Konzentration:  $10^6$  K/R) diente in jedem Ansatz als Standard und aufgrund der Stabilität und Reproduzierbarkeit im Rahmen der Flusswasseruntersuchungen gleichzeitig als Positivkontrolle. Korrekterweise hätte zusätzlich dazu, bzw. als Positivkontrolle wie auch bei der initialen Einstellung der PanPolio-PCR isolierte Poliovirus-RNA aus Zellkulturüberständen verwendet werden müssen, um vor allem den Schritt der Reversen Transkription zu kontrollieren.

Eine gravierendere Einschränkung war, dass schlussendlich keine interne Kontrolle zum Nachweis oder Ausschluss einer Inhibition in der Konzentrierung, Extraktion der Nukleinsäure und der PCR vorlag. Die zusätzliche Verwendung der Baculovirus-DNA erfolgte nur für einen Teil der Versuche mit Flusswasser, nicht aber für die Testungen von Reinstwasser. Weiterhin war die Nukleinsäure-Extraktion wegen unterschiedlicher Methoden für Polio- und Baculoviren nicht vergleichbar. Die Isolation der Baculoviren aus konzentriertem Flusswasser erfolgte nicht mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit, sondern parallel zu den RNA Viren mit dem MagNA Pure 96 System und dem dazugehörigen Kit (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche).

Im Rahmen der Auswertung der Spikeversuche zur Validierung der Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser zählte jedes eindeutig positive Fluoreszenzsignal und jede Bande auf der Höhe des spezifischen Produktes im Agarose-Gel als erfolgreiche Detektion. Die Quantifizierung der gemessenen Signale ergab oftmals weniger als 1 K/R. Eine zuverlässige Quantifizierung ist nur bis zur Nachweisgrenze der jeweiligen PCR anzunehmen. Diese war unter Umständen hier nicht gewährleistet. Dieser Aspekt schränkt die Aussagekraft des Messergebnisses in Höhe von ca. 1 K/R ein, welches den Kalkulationen für die Einschätzung der Gefährdung durch Polioviren in der Umwelt zugrunde lag. Weiterhin konnte dieses Messergebnis bei wiederholter Testung in der PCR nicht reproduziert werden.

Die von Kallies und seinen Kollegen freundlicherweise bereitgestellten Ressourcen waren durch parallel anstehende Projekte des UFZ Leipzig begrenzt und bedingen den bisher gering erscheinenden Probenumfang der Flusswasseruntersuchungen. Dies schränkt die Relevanz der erzielten Ergebnisse im Hinblick auf die Einschätzung der Infektionsgefährdung durch Polioviren in der Umwelt selbstredend ein.

Weiterhin waren die gemessenen Fluoreszenzsignale in den Spikeversuchen zu gering, um die Sequenzierung und Identifikation der Isolate anzuschließen. Damit ist keine abschließende Aussage über die Sensitivität und Spezifität der vollständigen Methode zum Nachweis von Polioviren in der Umwelt möglich.

Bezüglich der Einschätzung der Infektionsgefährdung als zentrale Fragestellung der Arbeit ist zu kritisieren, dass kein räumlicher Zusammenhang zwischen den untersuchten Probanden aus dem Raum Leipzig und dem Flusswasser der Holtemme in Sachsen-Anhalt vorliegt. Zudem kann keine zuverlässige Aussage über die Nutzung der Holtemme als Badegewässer oder für

den Wassersport getroffen werden. Die durchgeführten Kalkulationen nehmen eine orale Aufnahme des untersuchten Oberflächenwassers an. Der Immunitätsstatus der Probanden, sowie die Nachweisgrenze der angewendeten Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser dienen im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellvertretend für die angenommene Exposition Erwachsener gegenüber Polioviren in der Umwelt mit einer resultierenden Infektionsgefährdung.

### **6.5. Ausblick**

Ausgehend von der vorliegenden Arbeit ergeben sich weitere interessante Aspekte, die im Rahmen zukünftiger Projekte bearbeitet werden könnten.

Die GMTs der untersuchten Altersgruppen unterschieden sich nicht signifikant. Seroprävalenzstudien und Impfstatuserhebungen der jüngsten Vergangenheit (Stark et al. 1999, Diedrich et al. 2000, Bigl und Roch 2001, Roch 2002, Poethko-Müller und Schmitz 2013) stellten hingegen niedrigere Immunitätslevel mit zunehmendem Alter fest. Aus diesem Grund scheint es nutzenstiftend für die Probanden nochmals exakte Titer zu bestimmen und über die bisher herausgegriffenen zwei Altersgruppen hinaus, auf signifikante Unterschiede der GMTs zu analysieren. Ergänzend könnte das thematisierte Waning neutralisierender Antikörper mit steigendem Alter durch Längsschnittuntersuchungen von Probandenseren über mehrere Jahre untersucht werden. Sollten dabei signifikant niedrigere bzw. sinkende Immunitätslevel im Alter vorliegen, würde dies die Berechtigung der von der SIKO empfohlenen Auffrischimpfung gegen Poliomyelitis aller 10 Jahre bekräftigen. Nach aktuellem Kenntnisstand fehlen weiterhin Zahlen, inwiefern die Auffrischimpfung in Sachsen tatsächlich angeboten und durchgeführt wird.

Weiterführend wäre es mithilfe von Informationen zur Herkunft der Probanden, gerade in Bezug auf alte und neue Bundesländer oder Migrationshintergrund, möglich, anhand von Regressionsmodellen die Beeinflussung des Immunitätsstatus darzustellen. Eventuell können dadurch Ursachen für Impflücken aufgedeckt und Impfeempfehlungen mit dem Ziel einer flächendeckend ausreichenden Herdenimmunität abgeleitet werden.

Zukünftig durchgeführte Seroprävalenzstudien für Erwachsene in Deutschland werden entsprechend der Geburtsjahrgänge auch mehrere Probanden einschließen, die nach 1998 gebo-



ren und rein mit IPV immunisiert wurden. Bereits im KiGGS von 2003–2006 deuteten niedrigere Impfquoten in den Jahrgängen 1997/1998 auf Umsetzungsschwierigkeiten bei der Umstellung von OPV auf IPV hin (Poethko-Müller et al. 2007). Dieser Aspekt sollte dann auch konkret untersucht werden, um eventuell entstandene Immunitätseinbrüche aufzudecken und zukünftig zu beheben.

Nicht außer Acht zu lassen sind signifikante Unterschiede zwischen impfanamnestischem Schutz und der Seroprävalenz neutralisierender Antikörper gegen Polioviren, wie sie von Sauerbrei et al. (2004) und Nijsten et al. (2015) in der Vergangenheit feststellten. Die Aussagen über den Immunitätsstatus von Kindern und Jugendlichen beruhen beispielsweise im Wesentlichen auf Impfanamnesen im Rahmen von Schuleingangsuntersuchungen. Sollte durch parallel zur serologischen Testung erhobene Impfanamnesen wiederholt bestätigt werden können, dass erfolgte Schutzimpfungen nicht verlässlich auf einen ausreichenden serologischen Schutz schließen lassen, scheint es unabdinglich zu diskutieren, inwiefern Erhebungen des Impfstatus ausreichend sind, um den Immunitätsstatus der Bevölkerung als ausreichend einzustufen.

Da von den untersuchten Probanden nur bedingt auf Erwachsene in Deutschland geschlossen werden kann, empfiehlt es sich für eine repräsentativere Stichprobe in nachfolgenden Projekten beispielsweise auch Risikogruppen wie Schwangere oder Immunkompromittierte einzuschließen. Am Institut für Virologie erfolgt derzeit bereits eine Seroprävalenzuntersuchung von Schwangeren in Anlehnung an Sauerbrei et al. (2004). Die Ergebnisse sind noch nicht publiziert.

Für die Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser existierte abschließend keine validierte interne Kontrolle. Für weiterführende Projekte ist diese jedoch unverzichtbar. Zunächst sollte Baculovirus-DNA, als bereits etablierte Kontrolle am Institut für Virologie, auf die gesamte Prozessierung des Flusswassers übertragen werden. Dies erfordert, dass auch die Poliovirus-RNA mit dem MagNA Pure 96 System extrahiert wird. Damit gäbe es eine interne nicht konkurrierende Kontrolle für die Nukleinsäure-Extraktion und die PCR. Alternativ könnte in Anlehnung an die Stuhluntersuchungen bei syrischen Geflüchteten (Böttcher et al. 2015) MS 2 Bakteriophage als interne Kontrolle eingeführt werden, da Böttcher et al. (2015) ebenfalls das QIAamp® Viral RNA Mini Kit (siehe Poliovirus RNA Extraktion) für die RNA-Isolation verwendeten.

Abschließend konnte keine konkrete Aussage über die Ursachen für niedrige Wiederfindungsraten der Methode zum Nachweis von Polioviren und NPEV getroffen werden. Das Vorgehen zur Konzentrierung des Flusswassers erscheint dennoch plausibel. Zunächst ist die Wiederholung der Spikeversuche mit höheren Viruskonzentrationen im Hinblick auf die Ermittlung der Nachweisgrenze bei zuverlässiger Quantifizierung sinnvoll. Zur Optimierung der Resultate könnte weiterhin eine Vorbehandlung der Filterkassetten mit beispielsweise FKS, sowie ein zusätzlicher Elutionsschritt durch rezirkulierendes Glycin in Erwägung gezogen werden. Auch wenn die Hersteller der Filter von verschwindend geringer Virusadsorption ausgehen, sollten dadurch bedingte Virusverluste experimentell ausgeschlossen werden.

Durch ein schrittweises Vorgehen zur Ermittlung der Sensitivität sollte es möglich sein, die Fehlerquellen aufzudecken. Stokdyk et al. (2016) führten z.B. die Spikeversuche ausgehend von der PCR in umgekehrter Reihenfolge durch. Ziel der Untersuchungen war es, die Konzentration des Spikematerials zu ermitteln, bei der 95 % der Proben positiv, also mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit ein Virusnachweis möglich war (Stokdyk et al. 2016). Sie fügten zuerst die Menge zu, die in der PCR nachweisbar war, anschließend entsprechend in der Extraktion, der sekundären Konzentrierung und zuletzt in der primären Konzentrierung. Die Spikeversuche erfolgten erst, als sicher war, dass weder die PCR noch die Extraktion oder die zweite Konzentrierung ursächlich für Virusverluste sind. Dieses kleinerschrittige Vorgehen könnte es ermöglichen, jeden Abschnitt des in der vorliegenden Arbeit angewendeten Protokolls isoliert zu beurteilen, die notwendigen Spikekonzentrationen realistischer einzuschätzen und Quellen für den Virusverlust frühzeitig zu identifizieren. Zu beachten ist, dass dieser Ansatz mit einem erheblichen Zeitaufwand in Verbindung steht.

Mit Bezug auf die Anwendung einer verhältnismäßig breiten PCR, wie der PanPolio-PCR im Vergleich zur WPV1-SOAS spezifischen PCR (Hindiyeh et al. 2014), beschreiben Hindiyeh et al. (2014) eine der PCR vorausgehende Anzucht der konzentrierten Flusswasserproben auf Zellkulturen zur Erhöhung der Virustiter als Option zur Reduktion der Sensitivitätseinbußen. Auch das könnte versucht werden, ein klares Argument gegen dieses Vorgehen bleibt aber die Zeitersparnis des direkten molekularen Virusnachweises im Flusswasser gegenüber herkömmlichen zellkulturbasierten Vorgehensweisen.

Die erzielte In-vitro-Spezifität der PanPolio-PCR war zufriedenstellend, könnte aber sicherlich um einige VDPVs oder Wildviren ergänzt werden. Die Eignung des Protokolls könnte darüber

hinaus beispielsweise durch Testung positiver Isolate anderer Institute, z.B. aus den Niederlanden oder Israel die eine routinemäßige Umweltuntersuchung durchführen, weiter evaluiert werden.

Weiterführend wäre die Probennahme in Kläranlagen, also die Untersuchung von Abwasser zur Validierung der Nachweismethode interessant. Da dort mit höheren Konzentrationen enteraler Pathogene zu rechnen ist, wird erwartungsgemäß die Rate positiver Nachweise von vor allem NPEV steigen.

Ein anderer entscheidender und im Rahmen der zukünftigen Arbeit mit Polioviren nicht außer Acht zu lassender Aspekt, ist die schrittweise Durchführung des Laborcontainments von Polioviren. Zum Zeitpunkt der durchgeführten Untersuchungen war die Arbeit mit Poliovirus Typ 1, 2 und 3 bis auf übliche Sicherheitsvorkehrungen im Labor mit Biosicherheitsstufe (BSL) 2 noch möglich. Bis zur geplanten weltweiten Einstellung der Anwendung der OPV werden die geforderten Sicherheitsstufen auf BSL-3 für Polioimpfviren und BSL-4 für Poliowildviren angehoben (Robert Koch Institut 2016c). Es gelten zudem strenge Vorschriften zur Verwendung, Lagerung, Zugangsbeschränkung, Entsorgung und auch Vernichtung von Polioviren, sowie zu Impfangeboten für Personal, das mit Polioviren arbeitet (Robert Koch Institut 2016c). Nach dem „Global Action Plan III (GAPIII)“ der WHO (World Health Organization 2015) sind Tätigkeiten mit Poliowildvirus Typ 2 und Polioimpfvirus Typ 2 außerhalb speziell dafür zertifizierter Labors nicht mehr erlaubt (Robert Koch Institut 2016c). Am Institut für Virologie erfolgen entsprechend keine serologischen Versuche mehr mit Poliovirus Typ 2. Die Ausweitung des Containments auf die Typen 1 und 3 ist für 2019 geplant (Robert Koch Institut 2016c).

Insgesamt liefert die vorliegende Arbeit einen Überblick zur Poliosituation und mit den Ergebnissen der Untersuchungen konnte ein Beitrag zur Überwachung der Polioeradikation in Deutschland und damit in der WHO-Region Europa geleistet werden.

## 7. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Infektionsgefährdung Erwachsener durch Polioviren in der Umwelt

eingereicht von Lisa Töpel

angefertigt am Institut für Virologie der Universität Leipzig

betreut von Prof. Dr. Uwe Gerd Liebert

Mai 2018

Die Poliomyelitis, im Volksmund als Kinderlähmung bekannt, ist eine potentiell tödliche Erkrankung. Erklärtes Ziel der WHO ist die weltweite Eradikation der Polioviren. Die Entwicklung effektiver Impfstoffe (IPV und OPV) führte weltweit bereits zu einem starken Rückgang der Fallzahlen (>90 %). Die vier WHO-Regionen Region of the Americas (1994), Western Pacific Region (2000), European Region (2002) und zuletzt die South-East Asia Region (2014) sind von der WHO bereits poliofrei zertifiziert. Es verbleiben die African Region und die Eastern-Mediterranean Region, dort insbesondere die drei endemischen Länder Afghanistan, Pakistan und Nigeria.

Aufgrund ihrer umweltresistenten Eigenschaften können Polioviren nach Ausscheidung durch infizierte Personen unbemerkt in der Umwelt zirkulieren und Ursprung neuer Epidemien sein. Bei unzureichender Immunität der Bevölkerung und unbemerkter Zirkulation von Polioviren in der Umwelt besteht das Risiko der Wiedereinschleppung von Polioviren in bereits poliofreie Länder, auch Deutschland. Der Nachweis von vermehrungsfähigem Poliovirus in der Umwelt, wie z.B. 2012–2014 in Klärschlämmen in Israel (seit 2002 poliofrei zertifiziert) verdeutlicht die Notwendigkeit einer zuverlässigen Umweltüberwachung.

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Verschiebung des Erkrankungszeitpunktes für Poliomyelitis in das Erwachsenenalter, wenigen aktuellen Zahlen zum serologischen Immunitätsstatus Erwachsener und der bisher nicht etablierten Umweltüberwachung in Deutschland, stellt sich die Frage ob die deutsche Bevölkerung einen ausreichenden Impfschutz gegen Poliomyelitis aufweist und ob hierzulande Polioviren in der Umwelt nachweisbar sind.

Da gerade auch bei Mitarbeitern im Gesundheitswesen ein unzureichender Schutz gegen Polioviren festgestellt wurde, erfolgten für die Erhebung aktueller Zahlen zum Immunitätsstatus Erwachsener in Deutschland stellvertretend Untersuchungen bereits gewonnener Serumproben von Mitarbeitern der Uniklinik Leipzig. Mithilfe des Virusneutralisationstests wurde die Seroprävalenzrate neutralisierender Antikörper gegen Poliovirus Typ 1, 2 und 3 für 530 Probanden im Alter von 18–64 Jahren bestimmt und statistisch im Hinblick auf die Gewährleistung einer ausreichenden Herdenimmunität und alters- oder geschlechtsspezifische Unterschiede analysiert.

Flusswasser der Holtemme (in den Landkreisen Harz und Börde in Sachsen-Anhalt), als ein mögliches Übertragungsmedium in der Umwelt, wurde in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig, das auch für andere Projekte Analysen in der Holtemme durchführte, auf das Vorkommen von Polio- und Enteroviren untersucht. Es erfolgte die Validierung eines direkten PCR-basierten Nachweises viraler RNA nach Konzentrierung der Flusswasserprobe mittels Tangentialflussfiltration und Ultrazentrifugierung. Weiterhin wurde bereits aus Proben der Holtemme isolierte RNA auf das Vorkommen von Polio- und Enterovirus-RNA untersucht.

Der Immunitätslevel der Stichprobe war mit signifikant  $> 80\%$  ( $p < 0,05$ ) hoch. Nach Sauerbrei et al. (2004) und Diedrich und Schreier (2007) sei eine Populationsimmunität von  $80\%$  (Fine 1993) ausreichend um die Verbreitung von Polioviren zu verhindern. Aufgrund der möglichen Verschiebung des Erkrankungszeitpunktes vom frühen Kindes- in das Jugend- und Erwachsenenalter, verschiebt sich der Schwellenwert zur Gewährleistung der Herdenimmunität auf  $95\%$  (Fine 1993). Auch die WHO fordere aktuell Immunitätslevel von mindestens  $95\%$  (Robert Koch Institut 2017). Eine Impfquote von mindestens  $95\%$  sei laut RKI ein wichtiger Indikator zur Einschätzung des Risikos der Weiterverbreitung eines eingeschleppten Poliovirus in der Bevölkerung (Robert Koch Institut 2018a). Ein signifikantes Überschreiten der  $95\%$  konnte für die Seroprävalenzen gegen Typ 1 ( $98,1\%$ ;  $95\%$  - KI:  $96,7\%$  -  $99,3\%$ ;  $p_{PV1} = 0,0002$ ) und 2 ( $97,6\%$ ;  $95\%$  - KI:  $96,2\%$  -  $98,9\%$ ;  $p_{PV2} = 0,0024$ ), nicht aber gegen Typ 3 ( $95,3\%$ ;  $95\%$  - KI:

93,5 % - 97,1 %;  $p_{PV3} = p = 0,43$ ) und gegen alle drei Serotypen gesamt (93,6 %; 95 % - KI: 91,5 % - 95,7 %;  $p_{PV1,2,3} = 0,085$ ) gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass die untersuchten Probanden mitunter nicht ausreichend immunisiert waren. Weiterhin konnten keine signifikanten alters- ( $n_{39-45 \text{ Jahre}} = 47$ ;  $n_{\geq 53 \text{ Jahre}} = 44$ ;  $p(PV1) = 0,785$ ;  $p(PV2) = 0,262$ ;  $p(PV3) = 0,323$ ) oder geschlechtsspezifischen ( $n_m = 18$ ;  $n_w = 73$ ;  $p(PV1) = 0,833$ ;  $p(PV2) = 0,904$ ;  $p(PV3) = 0,535$ ) Unterschiede der GMTs festgestellt werden. Aufgrund von Besonderheiten der Stichprobe, wie dem jungen Alter, dem Gesundheitszustand, dem medizinischen Hintergrund und der Impfempfehlungen der ehemaligen DDR und jetzt der SIKO, könnte der tatsächliche Immunitätsstatus der deutschen Bevölkerung mithin tendenziell überschätzt werden. Es kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass Erwachsene in Deutschland aktuell erforderliche Immunitätslevel von 95 % erreichen.

Die in den Versuchen im Rahmen der Arbeit erhobenen Daten erlauben keine zuverlässige Aussage über die Sensitivität und Spezifität der gesamten Methode zum Nachweis von Polioviren in Flusswasser. In keiner der bereits isolierten RNA-Proben aus Flusswasser der Holtemme konnte EV- oder Poliovirus-spezifische RNA nachgewiesen werden. Die ermittelten Wiederfindungsraten zum Nachweis von Polio- und NPEVs in Flusswasser waren zu gering, um das Vorhandensein von zumindest Enteroviren an den Standorten der Probennahme auszuschließen. Infolge urbaner Zuflüsse könnten durchaus relevante Konzentrationen von Enteroviren enthalten sein. Durchgeführte Kalkulationen zeigten, dass die Nachweismethode nicht sensitiv genug war, eine Poliovirus Typ 1 Konzentration in Höhe der MID oder niedriger zu detektieren. Erfolgte jedoch der Nachweis mindestens 1 K/R mit der angewendeten Methode, überschreitet die Konzentration im untersuchten Oberflächenwasser die MID und bei oraler Aufnahme von mindestens 100 ml, bestünde ein Infektionsrisiko. Mit Bezug auf den Manifestationsindex von Poliovirusinfektionen von 1 % wäre auch ein paralytischer Verlauf möglich. Wegen fehlender Umweltüberwachung in Deutschland kann eine stumme Zirkulation von WPVs, VDPVs oder OPV-like PVs weiterhin nicht sicher ausgeschlossen werden.

Eine verlässliche Einschätzung der Infektionsgefährdung Erwachsener durch Polioviren in der Umwelt war anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

Insgesamt liefert die vorliegende Arbeit einen Überblick zur Poliosituation und mit den Ergebnissen der Untersuchungen konnte ein Beitrag zur Überwachung der Polioeradikation in Deutschland und damit in der WHO-Region Europa geleistet werden.

## Literaturverzeichnis

- Al-Hello H, Jorba J, Blomqvist S, Raud R, Kew O und Roivainen M 2013. Highly Divergent Type 2 and 3 Vaccine-Derived Polioviruses Isolated from Sewage in Tallinn, Estonia. *J Virol*, 87, 13076-13080.
- Alam MM, Shaikat S, Sharif S, Angez M, Khurshid A, Malik F, Rehman L und Zaidi SSZ 2014. Detection of Multiple Cocirculating Wild Poliovirus Type 1 Lineages Through Environmental Surveillance: Impact and Progress During 2011–2013 in Pakistan. *J Infect Dis*, 210, S324-S332.
- Anderson RM und May RM 1990. Modern Vaccines - Immunisation and herd immunity. *Lancet*, 335, 641-645.
- Anis E, Kopel E, Singer SR, Kaliner E, Moerman L, Moran-Gilad J, Sofer D, Manor Y, Shulman LM, Mendelson E, Gdalevich M, Lev B, Gamzu R und Grotto I 2013. Insidious reintroduction of wild poliovirus into Israel, 2013. *Euro Surveill*, 18, 2-6.
- Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G, Malik F, Shetty S, El Bassioni L, Akande AO, Al Maamoun E, Zaidi S, Adeniji AJ, Burns CC, Deshpande J, Oberste MS und Lowther SA 2014. Environmental Surveillance for Polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *J Infect Dis*, 210 Suppl 1, S294-303.
- Bahl S, Kumar R, Menabde N, Thapa A, McFarland J, Swezy V, Tangermann RH, Jafari HS, Elsner L, Wassilak SG, Kew OM und Cochi SL 2014. Polio-Free Certification and Lessons Learned—South-East Asia Region, March 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 63, 941-946.
- Battistone A, Buttinelli G, Fiore S, Amato C, Bonomo P, Patti AM, Vulcano A, Barbi M, Binda S, Pellegrinelli L, Tanzi ML, Affanni P, Castiglia P, Germinario C, Mercurio P, Cicala A, Triassi M, Pennino F und Fiore L 2014. Sporadic Isolation of Sabin-Like Polioviruses and High-Level Detection of Non-Polio Enteroviruses During Sewage Surveillance in Seven Italian Cities, after Several Years of Inactivated Poliovirus Vaccination. *Appl Environ Microbiol*, 80, 4491-4501.
- Behrend MR, Hu H, Nigmatulina KR und Eckhoff P 2014. A quantitative survey of the literature on poliovirus infection and immunity. *Int J Infect Dis*, 18, 4-13.
- Bencsko G und Ferenci T 2016. Effective case/infection ratio of poliomyelitis in vaccinated populations. *Epidemiol Infect*, 144, 1933-1942.
- Bernier RH 1984. Some observations on poliomyelitis lameness surveys. *Rev Infect Dis*, 6 Suppl 2, S371-375.
- Bienz K und Bourquin C 2003. Die Labordiagnostik von Polioviren nach der Eradikation der Poliomyelitis in Europa. *Schweiz Arzteztg*, 9, 407-408.
- Bigl S und Roch M 2001. Stand und Probleme der Poliomyelitiseradikation in Deutschland. *Ärzteblatt Sachsen*, 7, 331-333.
- Blake IM, Martin R, Goel A, Khetsuriani N, Everts J, Wolff C, Wassilak S, Aylward RB und Grassly NC 2014. The role of older children and adults in wild poliovirus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 10604-10609.
- Blomqvist S, El Bassioni L, El Maamoun Nasr EM, Paananen A, Kaijalainen S, Asghar H, De Gourville E und Roivainen M 2012. Detection of Imported Wild Polioviruses and of Vaccine-Derived Polioviruses by Environmental Surveillance in Egypt. *Appl Environ Microbiol*, 78, 5406-5409.

- Bosch A, Guix S, Sano D und Pintó RM 2008. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr Opin Biotechnol*, 19, 295-301.
- Böttcher S, Neubauer K, Baillot A, Rieder G, Adam M und Diedrich S 2015. Stool screening of Syrian refugees and asylum seekers in Germany, 2013/2014: Identification of Sabin like polioviruses. *Int J Med Microbiol*, 305, 601-606.
- Botzenhart K 2013. Trinkwasser. In: WALTER R (ed.) *Umweltvirologie: Viren in Wasser und Boden*. Wien: Springer-Verlag.
- Brown B, Oberste MS, Maher K und Pallansch MA 2003. Complete Genomic Sequencing Shows that Polioviruses and Members of Human Enterovirus Species C are Closely Related in the Noncapsid Coding Region. *J Virol*, 77, 8973-8984.
- Burns CC, Diop OM, Sutter RW und Kew OM 2014. Vaccine-Derived Polioviruses. *J Infect Dis*, 210 Suppl 1, S283-293.
- Cashdollar JL und Wymer L 2013. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. *J Appl Microbiol*, 115, 1-11.
- De Oliveira Pereira JS, Da Silva LR, De Meireles Nunes A, De Souza Oliveira S, Da Costa EV und Da Silva EE 2016. Environmental Surveillance of Polioviruses in Rio de Janeiro, Brazil, in Support to the Activities of Global Polio Eradication Initiative. *Food Environ Virol*, 8, 27-33.
- Diedrich S, Claus H und Schreier E 2002. Immunity status against poliomyelitis in Germany: Determination of cut-off values in International Units. *BMC infectious diseases*, 2, 2.
- Diedrich S, Claus H, Thierfelder W, Bellach BM und Schreier E 2000. Bundesgesundheitsurvey 1997/98: Immunitätslage gegen Poliomyelitis. *Dtsch Med Wochenschr*, 125, 584-588.
- Diedrich S, Falkenhorst G und Wichmann O 2016. Polio-Impfung. Eine Stellungnahme. *Dtsch Med Wochenschr*, 141, 1407-1408.
- Diedrich S und Schreier E 1995. Immunitätslage gegen Poliomyelitis. Polio-Serosurveillance 1993. *Dtsch Med Wochenschr*, 120, 239-244.
- Diedrich S und Schreier E 2007. Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS): Immunitätslage gegen Poliomyelitis. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 50, 771-774.
- Dittmann S und Thilo W 1986. *Vademekum für Impfärzte*, Jena, VEB Gustav Fischer Verlag.
- Dreier J, Störmer M und Kleesiek K 2005. Use of Bacteriophage MS2 as an Internal Control in Viral Reverse Transcription-PCR Assays. *J Clin Microbiol*, 43, 4551-4557.
- Drexler HG und Uphoff CC 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39, 75-90.
- Drexler JF, Grard G, Lukashev AN, Kozlovskaya LI, Böttcher S, Uslu G, Reimerink J, Gmyl AP, Taty-Taty R, Lekana-Douki SE, Nkoghe D, Eis-Hübinger AM, Diedrich S, Koopmans M, Leroy EM und Drosten C 2014. Robustness against serum neutralization of a poliovirus type 1 from a lethal epidemic of poliomyelitis in the Republic of Congo in 2010. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 12889-12894.



- Duintjer Tebbens RJ, Pallansch MA, Kalkowska DA, Wassilak SG, Cochi SL und Thompson KM 2013. Characterizing Poliovirus Transmission and Evolution: Insights from Modeling Experiences with Wild and Vaccine-Related Polioviruses. *Risk Anal*, 33, 703-749.
- Duizer E, Rutjes S, De Roda Husman AM und Schijven J 2016. Risk assessment, risk management and risk-based monitoring following a reported accidental release of poliovirus in Belgium, September to November 2014. *Euro Surveill*, 21, 30169.
- Fiedler K. 2017. *Eradikation* [Online]. Medizinische Fachredaktion Pschyrembel. URL: <https://www.pschyrembel.de/Eradikation/S00R2/doc/> aufgerufen am 02.05.2018.
- Fine PEM 1993. Herd Immunity: History, Theory, Practice. *Epidemiol Rev*, 15, 265-302.
- Fine PEM, Eames K und Heymann DL 2011. "Herd immunity": A Rough Guide. *Clin Infect Dis*, 52, 911-916.
- Fleischer J und Schneider O 2012. Enterale oder enteropathogene Viren. In: FEUERPFIL I und BOTZENHART K (eds.) *Hygienisch-mikrobiologische Wasseruntersuchung in der Praxis*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Fong TT und Lipp EK 2005. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69, 357-371.
- Franck S, Allwinn R, Rabenau HF und Doerr HW 1999. Epidemiological Analysis of Immunity to Poliovirus after Termination of an Era of Vaccination with OPV in Germany. An Analysis of the German Association Against Viral Diseases (DVV). *Zentralbl Bakteriol*, 289, 475-481.
- Furtak V, Roivainen M, Mirochnichenko O, Zagorodnyaya T, Laassri M, Zaidic SZ, Rehman L, Alam MM, Chizhikov V und Chumakov K 2016. Environmental surveillance of viruses by tangential flow filtration and metagenomic reconstruction. *Euro Surveill*, 21, 1-11.
- Gibson KE, Schwab KJ, Spencer SK und Borchardt MA 2012. Measuring and mitigating inhibition during quantitative real time PCR analysis of viral nucleic acid extracts from large-volume environmental water samples. *Water Res* 46, 4281-4291.
- GPEI. 2017. *History of Polio* [Online]. GPEI. URL: <http://polioeradication.org/polio-today/history-of-polio/> aufgerufen am 29.01.18.
- Groppelli E, Levy HC, Sun E, Strauss M, Nicol C, Gold S, Zhuang X, Tuthill TJ, Hogle JM und Rowlands DJ 2017. Picornavirus RNA is protected from cleavage by ribonuclease during virion uncoating and transfer across cellular and model membranes. *PLoS Pathog*, 13, e1006197.
- Gstraunthaler G und Lindl T 2013. *Zell-und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Auflage. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Hamborsky J, Kroger A und Wolfe C 2015. Poliomyelitis. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 13th ed. Atlanta, USA: Centers for Disease Control and Prevention.
- Hata A, Katayama H und Furumai H 2015. Organic Substances Interfere with Reverse Transcription-Quantitative PCR-Based Virus Detection in Water Samples. *Appl Environ Microbiol*, 81, 1585-1593.
- Hay RJ, Macy ML und Chen TR 1989. Mycoplasma infection of cultured cells. *Nature*, 339, 487-488.

- Hindiyeh M, Moran-Gilad J, Manor Y, Ram D, Shulman L, Sofer D und Mendelson E 2014. Development and validation of a real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay for investigation of wild poliovirus type 1-South Asian (SOAS) strain reintroduced into Israel, 2013 to 2014. *Euro Surveill*, 19, 1-7.
- Hogle J, Chow M und Filman D 1985. Three-Dimensional Structure of Poliovirus at 2.9 Å Resolution. *Science*, 229, 1358-1365.
- Hovi T, Paananen A, Blomqvist S, Savolainen-Kopra C, Al-Hello H, Smura T, Shimizu H, Nadova K, Sobotova Z, Gavrillin E und Roivainen M 2013. Characteristics of an Environmentally Monitored Prolonged Type 2 Vaccine Derived Poliovirus Shedding Episode that Stopped without Intervention. *PLoS One*, 8, e66849.
- Hovi T, Shulman LM, Van der Avoort H, Deshpande J, Roivainen M und De Gourville EM 2012. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. *Epidemiol Infect*, 140, 1-13.
- Jorba J, Campagnoli R, De L und Kew O 2008. Calibration of Multiple Poliovirus Molecular Clocks Covering an Extended Evolutionary Range. *J Virol*, 82, 4429-4440.
- Kaliner E, Moran-Gilad J, Grotto I, Somekh E, Kopel E, Gdalevich M, Shimron E, Amikam Y, Leventhal A, Lev B und Gamzu R 2014. Silent reintroduction of wild-type poliovirus to Israel, 2013 - risk communication challenges in an argumentative atmosphere. *Euro Surveill*, 19, 54-60.
- Kärber G 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162, 480-483.
- Kew OM, Sutter RW, De Gourville EM, Dowdle WR und Pallansch MA 2005. Vaccine-Derived Polioviruses and the Endgame Strategy for Global Polio Eradication. *Annu Rev Microbiol*, 59, 587-635.
- Kilpatrick DR, Ching K, Iber J, Chen Q, Yang SJ, De L, Williams AJ, Mandelbaum M, Sun H, Oberste MS und Kew OM 2014. Identification of vaccine-derived polioviruses using dual-stage real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, 197, 25-28.
- Kilpatrick DR, Yang CF, Ching K, Vincent A, Iber J, Campagnoli R, Mandelbaum M, De L, Yang SJ, Nix A und Kew OM 2009. Rapid Group-, Serotype-, and Vaccine Strain-Specific Identification of Poliovirus Isolates by Real-Time Reverse Transcription-PCR Using Degenerate Primers and Probes Containing Deoxyinosine Residues. *J Clin Microbiol*, 47, 1939-1941.
- Kim H-J, Hwang S, Lee S, Kwon Y, Park K, Park YJ, Bae GR, Lee SW, Jeong YS und Hyeon JY 2015. A national cross-sectional study for poliovirus seroprevalence in the Republic of Korea in 2012: implication for deficiency in immunity to polio among middle-aged people. *BMC Infectious Diseases*, 15, 164.
- Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emini EA, Hanecak R, Lee JJ, van der Werf S, Anderson CW und Wimmer E 1981. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291, 547-553.
- Klein S. 2013. *Zusammenhang zwischen Impfungen und Inzidenz und Mortalität von Infektionskrankheiten. Zeitreihenanalysen mit Meldedaten zu Diphtherie, Pertussis, Poliomyelitis und Tetanus von 1892 bis 2011 in Deutschland*. Dr. rer. medic., Medizinische Fakultät Charité–Universitätsmedizin Berlin.

- Krieg J. 2016. *Untersuchungen zur Immunitätslage junger Erwachsener gegen Masern, Mumps und Röteln*. Dr. med. vet., Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.
- Külshammer M, Winke U, Frank M, Skali-Lami U, Steudel H, Schilling G, Drexler JF, Eis-Hubinger AM und Matz B 2013. Poor immunity status against poliomyelitis in medical students: a semi-anonymous study. *Med Microbiol Immunol*, 202, 63-65.
- Kuryk L, Wieczorek M, Diedrich S, Bottcher S, Witek A und Litwinska B 2014. Genetic Analysis of Poliovirus Strains Isolated from Sewage in Poland. *J Med Virol*, 86, 1243-1248.
- Landsteiner K und Popper E 1909. Übertragung der Poliomyelitis acuta auf Affen. *Z Immunitats*, 2, 377-390.
- Ledig T, Egidi G, Schneider-Rathert W und Uebel T 2009. Impfen um jeden Preis? Impfmüdigkeit in Deutschland? *Z Allg Med*, 85, 94-96.
- Lindner U 2004. *Gesundheitspolitik in der Nachkriegszeit. Großbritannien und die Bundesrepublik im Vergleich*, München, Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH.
- Lindner U und Blume SS 2006. Vaccine Innovation and Adoption: Polio Vaccines in the UK, the Netherlands and West Germany, 1955-1965. *Med Hist*, 50, 425-446.
- Liu HM, Zheng DP, Zhang LB, Oberste MS, Kew OM und Pallansch MA 2003. Serial Recombination During Circulation of Type 1 Wild-Vaccine Recombinant Polioviruses in China. *J Virol*, 77, 10994-11005.
- Löffler M 2004a. Kurs zur Auswertung medizinischer Daten unter Verwendung des Statistikprogrammes SPSS. *IMISE-Reports*. Universität Leipzig: Medizinische Fakultät.
- Löffler M 2004b. Methodensammlung zur Auswertung klinischer und epidemiologischer Daten. *IMISE-Reports*. Universität Leipzig: Medizinische Fakultät.
- Lukashev AN, Yarmolskaya MS, Shumilina EY, Sychev DA und Kozlovskaya LI 2016. Antibody titers against vaccine and contemporary wild poliovirus type 1 in children immunized with IPV+OPV and young adults immunized with OPV. *Virus Res*, 213, 162-164.
- Manor Y, Handsher R, Halmut T, Neuman M, Bobrov A, Rudich H, Vonsover A, Shulman L, Kew O und Mendelson E 1999. Detection of Poliovirus Circulation by Environmental Surveillance in the Absence of Clinical Cases in Israel and the Palestinian Authority. *J Clin Microbiol*, 37, 1670-1675.
- Manor Y, Shulman LM, Kaliner E, Hindiyeh M, Ram D, Sofer D, Moran-Gilad J, Lev B, Grotto I, Gamzu R und Mendelson E 2014. Intensified environmental surveillance supporting the response to wild poliovirus type 1 silent circulation in Israel, 2013. *Euro Surveill*, 19, 20708.
- Marine Biological Association (MBA). 2006. Using Cross Flow Filtration. In: WHARAM S, ed. *Virus Ecology Workshop*, 23.07.06-28.07.06 2006 Plymouth, UK. Marine Biological Association (MBA), 19-27.
- Mayr CF. 2003. *Nachweis von luftgetragenen Viren an Standorten der Abfall- und Abwasserentsorgung*. Dr. der Agrarwissenschaften, Universität Hohenheim.
- Meyer C und Reiter S 2004. Impfgegner und Impfskeptiker. Geschichte, Hintergründe, Thesen, Umgang. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, 47, 1182-1188.

- Miko I. 2014. *Plasmid/Plasmids* [Online]. Nature Education. URL: <http://www.nature.com/scitable/definition/plasmid-plasmids-28> aufgerufen am 29.01.18.
- Minor PD 2016. An Introduction to Poliovirus: Pathogenesis, Vaccination, and the Endgame for Global Eradication. In: MARTÍN J (ed.) *Poliovirus. Methods and Protocols*. New York: Springer Science+Business Media.
- Morales M, Tangermann RH und Wassilak SG 2016. Progress Toward Polio Eradication - Worldwide, 2015-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 65, 470-473.
- Moser-Danhel SP und Meyer J 2008. Angewandte virologische Untersuchungen bei der Bodensee-Wasserversorgung. *Wissensdurst*, 3, 2-13.
- Mueller S, Wimmer E und Cello J 2005. Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Res*, 111, 175-193.
- Nationale Kommission für die Polioeradikation in der Bundesrepublik Deutschland und NRZ PE am Robert Koch Institut. 2011. *Leitfaden für Gesundheitsämter zum Vorgehen bei Fällen von Poliomyelitis in der Bundesrepublik Deutschland* [Online]. Robert Koch Institut. URL: [http://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/Poliokommission/Dokumente/Leitfaden.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/Poliokommission/Dokumente/Leitfaden.pdf?__blob=publicationFile) aufgerufen am 29.01.18.
- Nijsten D, Carrillo-Santistevé P, Miglietta A, Ruitenberg J und Lopalco PL 2015. Is EU/EEA population protected from polio? *Hum Vaccin Immunother*, 11, 2123-2131.
- Nix WA, Oberste MS und Pallansch MA 2006. Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*, 44, 2698-2704.
- Ohlbaum A, Figueroa F, Grado C und Contreras G 1970. Target Molecular Weight of Foot-and-Mouth Disease Virus and Poliovirus. *J Gen Virol*, 6, 429-432.
- Pan American Health Organization. 2014. *Detection of imported wild poliovirus in environmental samples* [Online]. URL: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=25921&Itemid=](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=25921&Itemid=) aufgerufen am 29.01.18.
- Parker EP und Grassly NC 2016. Unravelling mucosal immunity to poliovirus. *Lancet Infect Dis*, 16, 1310-1311.
- Parker EP, Molodecky NA, Pons-Salort M, O'Reilly KM und Grassly NC 2015. Impact of inactivated poliovirus vaccine on mucosal immunity: implications for the polio eradication endgame. *Expert Rev Vaccines*, 14, 1113-1123.
- Paximadi E, Karakasiliotis I, Papaventsis D, Papageorgiou G und Markoulatos P 2008. Recombinant Sabin environmental isolates in Greece and Cyprus. *J Appl Microbiol*, 104, 1153-1162.
- Percival S 2004. Methods for the detection of waterborne viruses. In: PERCIVAL S, CHALMERS R, EMBREY M, HUNTER P, SELLWOOD J und WYN-JONES P (eds.) *Microbiology of Waterborne Diseases*. 1<sup>st</sup> Edition. Elsevier Ltd.
- Plans-Rubió P 2012. Evaluation of the establishment of herd immunity in the population by means of serological surveys and vaccination coverage. *Hum Vaccin Immunother*, 8, 184-188.

- Platt LR, Estivariz CF und Sutter RW 2014. Vaccine-Associated Paralytic Poliomyelitis: A Review of the Epidemiology and Estimation of the Global Burden. *J Infect Dis*, 210 Suppl 1, S380-389.
- Poethko-Müller C, Kuhnert R und Schlaud M 2007. Durchimpfung und Determinanten des Impfstatus in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, 50, 851-862.
- Poethko-Müller C und Schmitz R 2013. Impfstatus von Erwachsenen in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, 56, 845-857.
- Polaczyk AL, Narayanan J, Cromeans TL, Hahn D, Roberts JM, Amburgey JE und Hill VR 2008. Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples. *J Microbiol Methods*, 73, 92-99.
- Polio Molecular Diagnostic Development Lab. 2011. *Poliovirus rRT-PCR 2011 Training Manual* [Online]. URL: [http://www.wpro.who.int/immunization/meetings/2012/polio\\_rtpcr\\_training\\_2012\\_meeting\\_report\\_annex5.pdf?ua=1](http://www.wpro.who.int/immunization/meetings/2012/polio_rtpcr_training_2012_meeting_report_annex5.pdf?ua=1) aufgerufen am 29.01.18.
- Robert Koch Institut 2002. WHO-Region Europa frei von autochthoner Poliomyelitis. *Epidemiol Bull* 26:211. *Epidemiologisches Bulletin*, 26, 211.
- Robert Koch Institut 2010a. Bundesweite Enterovirus-Surveillance im Rahmen der Polioeradikation: Ergebnisse aus den ersten vier Projektjahren. *Epidemiologisches Bulletin*, 1, 1-12.
- Robert Koch Institut 2010b. Poliomyelitis-Ausbruch in Tadschikistan – erste Wildviruseinschleppung nach Europa seit der „poliofrei Zertifizierung“ im Jahr 2002. *Epidemiologisches Bulletin*, 18, 166.
- Robert Koch Institut 2011a. Dramatischer Polioausbruch in der Republik Kongo. *Epidemiologisches Bulletin*, 3, 18-19.
- Robert Koch Institut 2011b. Einschleppung von Polioviren in poliofreie Regionen – eine stetige Gefahr! *Epidemiologisches Bulletin*, 42, 383-384.
- Robert Koch Institut. 2012. *Schutzimpfung gegen Poliomyelitis: Häufig gestellte Fragen und Antworten* [Online]. Robert Koch Institut. URL: [https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Poliomyelitis/FAQ-Liste\\_Poliomyelitis\\_Impfen.html](https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Poliomyelitis/FAQ-Liste_Poliomyelitis_Impfen.html) aufgerufen am 24.02.17.
- Robert Koch Institut 2013a. Impfschutz bei Erwachsenen in Schleswig-Holstein 2011 – ein Update nach acht Jahren. *Epidemiologisches Bulletin*, 22, 197-203.
- Robert Koch Institut 2013b. Poliomyelitis-Fälle in Syrien. *Epidemiologisches Bulletin*, 45, 468.
- Robert Koch Institut. 2014a. *Poliomyelitis-Ausbruch in Syrien: Beendigung der Stuhl-Surveillance bei Asylbewerbern. Empfehlung des Robert Koch-Instituts* [Online]. Robert Koch Institut. URL: [http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/P/Polio/Ausbruch\\_Syrien/Polio\\_Syrien\\_Empfehlung\\_Beendigung\\_Surveillance.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/P/Polio/Ausbruch_Syrien/Polio_Syrien_Empfehlung_Beendigung_Surveillance.pdf?__blob=publicationFile) aufgerufen am 02.03.17.
- Robert Koch Institut 2014b. Welt-Poliotag 2014. *Epidemiologisches Bulletin*, 43, 419-420.
- Robert Koch Institut 2015a. Einführung des inaktivierten Polioimpfstoffs vor 60 Jahren. *Epidemiologisches Bulletin*, 20, 166.

- Robert Koch Institut. 2015b. *Eingangsscreening bei Asylsuchenden auf eine Poliovirus-Ausscheidung oder einen Nachweis von Poliovirus-Antikörpern* [Online]. Robert Koch Institut. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/Poliokommission/Screening\\_Asylsuchende.html](https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/Poliokommission/Screening_Asylsuchende.html) aufgerufen am 29.01.18.
- Robert Koch Institut. 2015c. *Nationales Referenzzentrum für Poliomyelitis und Enteroviren (NRZ PE)* [Online]. Robert Koch Institut. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/Polio/Polio\\_node.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/Polio/Polio_node.html) aufgerufen am 29.01.18.
- Robert Koch Institut. 2015d. *Poliomyelitis* [Online]. Robert Koch Institut. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Poliomyelitis.html;jsessionid=B370CAA1D27AFAA3778CC79AB907B6C4.2\\_cid381-doc2374544bodyText2](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Poliomyelitis.html;jsessionid=B370CAA1D27AFAA3778CC79AB907B6C4.2_cid381-doc2374544bodyText2) aufgerufen am 29.01.18.
- Robert Koch Institut 2015e. Poliomyelitis-Fälle in der Ukraine. *Epidemiologisches Bulletin*, 38, 411-418.
- Robert Koch Institut 2016a. Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut – 2016/2017. *Epidemiologisches Bulletin*, 34, 301-340.
- Robert Koch Institut 2016b. Impfquoten bei der Schuleingangsuntersuchung in Deutschland 2014. *Epidemiologisches Bulletin*, 16, 129-132.
- Robert Koch Institut 2016c. Laborcontainment von Polioviren: Der WHO Global Action Plan zur Polioeradikation und Konsequenzen für die Labore in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin*, 24, 205-212.
- Robert Koch Institut 2016d. Weltpoliotag 2016. Die WHO hoffte in diesem Jahr die Poliomyelitis besiegen zu können. *Epidemiologisches Bulletin*, 42, 465-470.
- Robert Koch Institut. 2017. *Welt-Poliotag 2017: Die Polioeradikation ist ohne Laborcontainment chancenlos* [Online]. Robert Koch Institut. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2017/43/Art\\_01.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2017/43/Art_01.html) aufgerufen am 02.05.2018.
- Robert Koch Institut 2018a. Aktuelles aus der KV-Impfsurveillance – Impfquoten ausgewählter Schutzimpfungen in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin*, 1, 1-14.
- Robert Koch Institut 2018b. Impfquoten bei der Schuleingangsuntersuchung in Deutschland 2016. *Epidemiologisches Bulletin*, 16, 151-156.
- Robertson S. 1993. *The Immunological Basis for Immunization Series. Module 6: Poliomyelitis* [Online]. World Health Organization. URL: <http://www.who.int/ihr/polio1993en.pdf> aufgerufen am 29.01.18.
- Robinson CM und Pfeiffer JK 2014. Viruses and the Microbiota. *Annu Rev Virol*, 1, 55-69.
- Roch M 2002. Untersuchungen zum Immunstatus gegen die Kinderlähmung im Freistaat Sachsen. *Ärzteblatt Sachsen*, 8, 389-394.
- Sächsische Impfkommission 2017. Empfehlungen der Sächsischen Impfkommission zur Durchführung von Schutzimpfungen im Freistaat Sachsen vom 02.09.1993; Stand: 01.01.2017.

- Sächsische Impfkommision 2000. Empfehlungen der Sächsischen Impfkommision zur Immunisierung gegen Kinderlähmung und zur Realisierung des nationalen Eradikationsprogrammes im Freistaat Sachsen (Poliomyelitis-Schutzimpfung und -Eradikation). Stand: 01.01.2000. *Ärzteblatt Sachsen*, 1, 15-17.
- Salk JE, Krech U, Youngner JS, Bennett BL, Lewis LJ und Bazeley PL 1954. Formaldehyde Treatment and Safety Testing of Experimental Poliomyelitis Vaccines. *Am J Public Health Nations Health*, 44, 563-570.
- Sartorius Stedim Biotech GmbH. 2010. Products and Solutions for the Biopharmaceutical Industry. 468-469,474-475, 486-487.
- Sauerbrei A, Prager J, Bischoff A und Wutzler P 2004. Antikörper gegen impfpräventable Erkrankungen bei Schwangeren und deren Neugeborenen. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, 47, 10-15.
- Savolainen-Kopra C und Blomqvist S 2010. Mechanisms of genetic variation in polioviruses. *Rev Med Virol*, 20, 358-371.
- Schenk L, Neuhauser H, Ellert U, Poethko-Müller C, Kleiser C und Mensink G 2008. Kinder-und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS) 2003-2006: Kinder und Jugendliche mit Migrationshintergrund in Deutschland. Berlin: Robert Koch Institut.
- Shulman LM, Gavrilin E, Jorba J, Martin J, Burns CC, Manor Y, Moran-Gilad J, Sofer D, Hindiyeh MY, Gamzu R, Mendelson E und Grotto I 2014. Molecular epidemiology of silent introduction and sustained transmission of wild poliovirus type 1, Israel, 2013. *Euro Surveill*, 19, 20709.
- Shulman LM, Manor Y, Sofer D, Handsher R, Swartz T, Delpyroux F und Mendelson E 2006. Neurovirulent Vaccine-Derived Polioviruses in Sewage from Highly Immune Populations. *PLoS One*, 1, e69.
- Smith PG 2010. Concepts of herd protection and immunity. *Procedia Vaccinol*, 2, 134-139.
- Stark K, Schönfeld C, Barg J, Molz B, Vornwald A und Bienzle U 1999. Seroprevalence and determinants of diphtheria, tetanus and poliomyelitis antibodies among adults in Berlin, Germany. *Vaccine*, 17, 844-850.
- Stefanelli P, Buttinelli G und Rezza G 2016. Poliomyelitis: residual hurdles to global eradication. Commentary. *Ann Ist Super Sanita*, 52, 469-471.
- Stein K. 2014. *Entwicklung und Implementierung einer internen Kontrolle für die PCR-Diagnostik humanpathogener DNA-Viren*. Dr. med., Medizinische Fakultät der Universität Leipzig.
- Stokdyk JP, Firnstahl AD, Spencer SK, Burch TR und Borchardt MA 2016. Determining the 95% limit of detection for waterborne pathogen analyses from primary concentration to qPCR. *Water Res*, 96, 105-113.
- Strazynski M, Krämer J und Becker B 2002. Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. *Int J Food Microbiol*, 74, 73-78.
- TAG on Vaccine-Preventable Disease 2013. Vaccination: A shared responsibility. *Technical Advisory Group on Vaccine-Preventable Disease XXI Meeting*. Quito, Ecuador: Technical Advisory Group on Vaccine-Preventable Disease.

- Thermo Fisher Scientific Inc. 2016. *Sanger Sequencing Method* [Online]. Thermo Fisher Scientific Inc. URL: [https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger\\_sequencing\\_method.html](https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger_sequencing_method.html) aufgerufen am 24.02.17.
- Thompson KM, Pallansch MA, Tebbens RJ, Wassilak SG und Cochi SL 2013. Modeling Population Immunity to Support Efforts to End the Transmission of Live Polioviruses. *Risk Anal*, 33, 647-663.
- Toyoda H, Kohara M, Kataoka Y, Suganuma T, Omata T, Imura N und Nomoto A 1984. Complete Nucleotide Sequences of All Three Poliovirus Serotype Genomes. Implication for Genetic Relationship, Gene Function and Antigenic Determinants. *J Mol Biol*, 174, 561-585.
- Van Spaendonck M, De Melker HE, Abbink F, Elzinga-Gholizadea N, Kimman TG und van Loon T 2001. Immunity to poliomyelitis in the Netherlands. *Am J Epidemiol*, 153, 207-214.
- Voigt K, Kühne F, Twork S, Göbel A, Kugler J und Bergmann A 2008. Aktueller Impfstatus in unterschiedlichen medizinischen Berufsgruppen in Brandenburg, Sachsen und Sachsen-Anhalt. *Gesundheitswesen*, 70, 408-414.
- Walter R 2013. Allgemeine Grundlagen der Umweltvirologie. In: WALTER R (ed.) *Umweltvirologie: Viren in Wasser und Boden*. Wien: Springer-Verlag.
- Weigel M, Bruns R, Weitmann K und Hoffmann W 2014. Durchimpfungsraten bei der Schuleingangsuntersuchung 2012. *Dtsch Arztebl*, 46, 788-794.
- Wicker S, Rabenau HF, Gottschalk R, Doerr HW und Allwinn R 2007. Seroprevalence of vaccine preventable and blood transmissible viral infections (measles, mumps, rubella, polio, HBV, HCV and HIV) in medical students. *Med Microbiol Immunol*, 196, 145-150.
- Wimmer E, Hellen CU und Cao X 1993. Genetics of Poliovirus. *Annu Rev Genet*, 27, 353-436.
- Windorfer A und Feil F 2000. Der Kampf gegen Poliomyelitis – die Ausrottung einer Zivilisationsseuche. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 43, 2-6.
- Winona L, Ommani A, Olszewski J, Nuzzo J und Oshima K 2001. Efficient and predictable recovery of viruses from water by small scale ultrafiltration systems. *Can J Microbiol*, 47, 1033-1041.
- Wommack KE, Sime-Ngando T, Winget DM, Jamindar S und Helton RR 2010. Filtration-based methods for the collection of viral concentrates from large water samples. *Manual of Aquatic Viral Ecology (MAVE)*, 110-117.
- Wong-Lee JG und Lovett M 1993. Rapid and sensitive PCR method for identification of Mycoplasma species in tissue culture. In: PERSING DH, SMITH TF, TENOVER FC und WHITE TJ (eds.) *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*. Washington DC: American Society for Microbiology: Persing, D H.
- World Health Assembly 1974. WHA Resolution 27.57. WHO Expanded Programme on Immunization. Geneva: World Health Organization.
- World Health Assembly 1988. WHA Resolution 41.28. Global Eradication of Poliomyelitis by the Year 2000. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization 1997. Manual for the virological investigation of poliomyelitis. Geneva: World Health Organization.



- 
- World Health Organization 2003. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization 2004a. *Guidelines for Drinking-Water Quality*, Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization 2004b. Polio laboratory manual. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. 2013. *Polio Eradication & Endgame Strategic Plan 2013 – 2018* [Online]. GPEI. URL: <http://polioeradication.org/who-we-are/strategy/> aufgerufen am 29.01.18.
- World Health Organization 2015. Global Action Plan for poliovirus containment (GAPIII). Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. 2017a. *About WHO - WHO regional offices* [Online]. World Health Organization. URL: <http://www.who.int/about/regions/en/> aufgerufen am 29.01.18.
- World Health Organization. 2017b. *Global Circulating Vaccine-derived Poliovirus Cases, 2000-2017. Data in WHO HQ as of 04 April 2017* [Online]. World Health Organization. URL: <http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/this-week/circulating-vaccine-derived-poliovirus/> aufgerufen am 08.04.2017.
- World Health Organization. 2018. *Global Wild Poliovirus 2013-2018. Data in WHO HQ as of 24 January 2018* [Online]. World Health Organization. URL: <http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2018/01/global-weekly-update-20180124.pdf> aufgerufen am 29.01.2018.
- World Health Organization Geneva 2016. Polio vaccines: WHO position paper - March, 2016. *Wkly Epidemiol Rec*, 91, 145-168.
- Yakovenko ML, Gmyl AP, Ivanova OE, Eremeeva TP, Ivanov AP, Prostova MA, Baykova OY, Isaeva OV, Lipskaya GY, Shakaryan AK, Kew OM, Deshpande JM und Agol VI 2014. The 2010 outbreak of poliomyelitis in Tajikistan: epidemiology and lessons learnt. *Euro Surveill*, 19, 20706.
- Young L, Sung J, Stacey G und Masters JR 2010. Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nature protocols*, 5, 929-934.
- Yusuf N, De Wee R, Foster N, Watkins MA, Tiruneh D, Chauvin C, Bossarte R, Mandlhate C, Jack A, Gumede N, Mawela A, Burns CC, Pallansch MA, Allies T, Rainey J, Mataruse N und Nshimirimana D 2014. Outbreak of Type 1 Wild Poliovirus Infection in Adults, Namibia, 2006. *J Infect Dis*, 210 Suppl 1, S353-360.
- Zaidi SS, Asghar H, Sharif S und Alam MM 2016. Poliovirus Laboratory Based Surveillance: An Overview. In: MARTÍN J (ed.) *Poliovirus. Methods and Protocols*. New York: Springer Science+Business Media.
- Zeitlmann N, George M und Falkenhorst G 2016. Polioimpfung und Stuhlscreening in deutschen Erstaufnahmeeinrichtungen für Asylsuchende, November 2013–Januar 2014. Was wurde umgesetzt? *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, 59, 584-591.

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

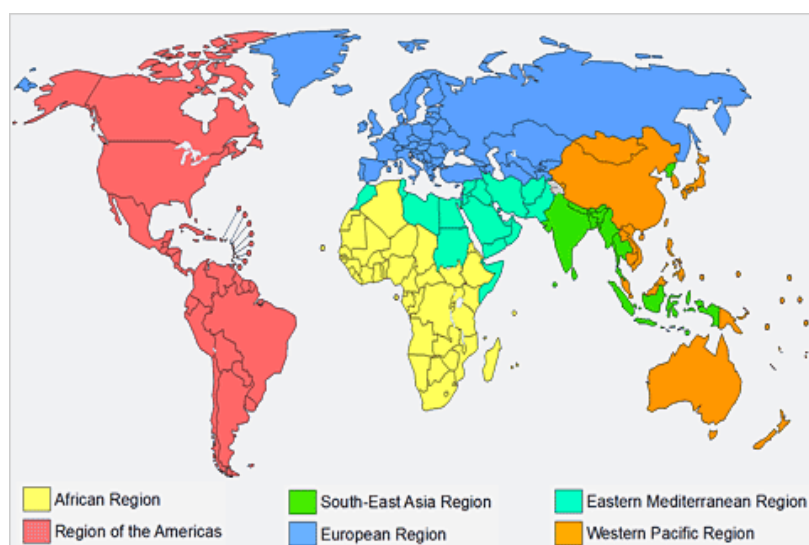
Abb. 1 Weltkarten mit Ländern in denen Polio 1988 und 2017 endemisch vorkam.....	7
Abb. 2 Hoechst 33258-Färbung kontaminationsfreier RD-Zellen. ....	22
Abb. 3 Analytisches Agarose-Gel zur Demonstration der Mycoplasmen-PCR. ....	23
Abb. 4 Standorte der Probennahme für den Nachweis von Polio- und Enteroviren in Flusswasser. ....	35
Abb. 5 Schemazeichnung des Filtrationssystems zur Konzentrierung von Flusswasserproben. ....	36
Abb. 6 Verteilung des Alters der untersuchten Probandengruppe (n = 530).....	40
Abb. 7 a) Virusneutralisationstest und b) Virustitration Poliovirus Typ 1. ....	42
Abb. 8 Prävalenz neutralisierender Antikörper gegen Poliovirus Typ 1, 2 und 3 gesamt. ....	43
Abb. 9 Prävalenz neutralisierender Antikörper gegen Polioviren Typ 1, 2 und 3 nach Altersgruppen.....	44
Abb. 10 Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe für das Plasmid von Poliovirus Typ 1 in der PanPolio-PCR mit TaqMan®-Sonde.....	48
Abb. 11 Standardkurve der PanPolio-PCR mit TaqMan®-Sonde für das Plasmid von Poliovirus Typ 1. ....	48
Abb. 12 Analytisches Agarose-Gel zur Demonstration der PanPolio-PCR mit Verdünnungsstufen des Plasmid Poliovirus Typ 1.....	49
Abb. 13 Amplifikationskurven verschiedener Proben in der PanPolio-PCR mit TaqMan®-Sonde.....	51
Abb. 14 Amplifikationskurven (1) verschiedener Proben in der EV-PCR mit TaqMan®-Sonde. ....	52
Abb. 15 Amplifikationskurven (2) verschiedener Proben in der EV-PCR mit TaqMan®-Sonde. ....	53
Abb. 16 Analytisches Agarose-Gel von Amplifikaten aus der Enterovirus-PCR. ....	54
Abb. 17 WHO Regionen.....	101
Abb. 18 Alignment der Primer PanPolio_s, PanPolio_as (sense und antisense) und der Sonde PanPolio_probe der PanPolio-PCR. ....	102
Abb. 19 Ausschnitt aus dem Vektor für das Plasmid Poliovirus Typ 1.....	102
Abb. 20 Schema des Vektors für Plasmid Poliovirus Typ 1, 2 und 3. ....	103
Abb. 21 Polio Umweltüberwachung weltweit. ....	103
Tab. 1 Zusammensetzung der Stichprobe für die Untersuchung des Antikörperstatus nach Altersgruppen und Geschlecht (n = 530).....	41
Tab. 2 Länder der WHO Regionen. ....	101
Tab. 3 Retrospektiv erhobene Impfanamnese bei Probanden (n = 30) mit mangelhaftem Immunstatus (Titer < 8).....	104
Tab. 4 Multiples lineares Regressionsmodell (abhängige Variable: Titer; unabhängige Variablen: Alter und Geschlecht). ....	105

## Anlagen

**Tab. 2 Länder der WHO Regionen.**

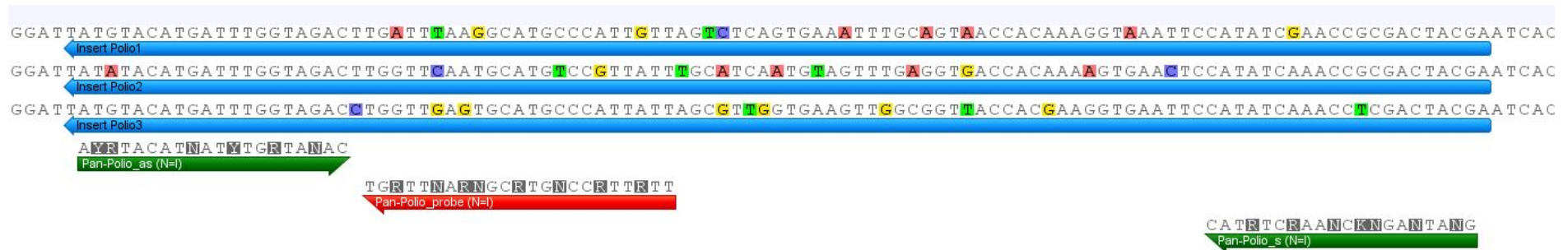
(World Health Organization, 2017a)

WHO Regions	Countries
Region of the Americas	Antigua and Barbuda, Argentina, Bahamas, Barbados, Belize, Bolivia (Plurinational State of), Brazil, Canada, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Dominica, Dominican Republic, Ecuador, El Salvador, Grenada, Guatemala, Guyana, Haiti, Honduras, Jamaica, Mexico, Nicaragua, Panama, Paraguay, Peru, Saint Kitts and Nevis, Saint Lucia, Saint Vincent and the Grenadines, Suriname, Trinidad and Tobago, United States of America, Uruguay, Venezuela (Bolivarian Republic of)
African Region	Algeria, Angola, Benin, Botswana, Burkina Faso, Burundi, Cameroon, Cabo Verde, Central African Republic, Chad, Comoros, Congo, Côte d'Ivoire, Democratic Republic of the Congo, Equatorial Guinea, Eritrea, Ethiopia, Gabon, Gambia, Ghana, Guinea, Guinea-Bissau, Kenya, Lesotho, Liberia, Madagascar, Malawi, Mali, Mauritania, Mauritius, Mozambique, Namibia, Niger, Nigeria, Rwanda, Sao Tome and Principe, Senegal, Seychelles, Sierra Leone, South Africa, South Sudan, Swaziland, Togo, Uganda, United Republic of Tanzania, Zambia, Zimbabwe
European Region	Albania, Andorra, Armenia, Austria, Azerbaijan, Belarus, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Croatia, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Georgia, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Israel, Italy, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Monaco, Montenegro, Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Republic of Moldova, Romania, Russian Federation, San Marino, Serbia, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, Switzerland, Tajikistan, The former Yugoslav Republic of Macedonia, Turkey, Turkmenistan, Ukraine, United Kingdom, Uzbekistan
Eastern Mediterranean Region	Afghanistan, Bahrain, Djibouti, Egypt, Iran (Islamic Republic of), Iraq, Jordan, Kuwait, Lebanon, Libya, Morocco, Oman, Pakistan, Qatar, Saudi Arabia, Somalia, Sudan, Syrian Arab Republic, Tunisia, United Arab Emirates, Yemen
South-East Asia Region	Bangladesh, Bhutan, Democratic People's Republic of Korea, India, Indonesia, Maldives, Myanmar, Nepal, Sri Lanka, Thailand, Timor-Leste
Western Pacific Region	Australia, Brunei Darussalam, Cambodia, China, Cook Islands, Fiji, Japan, Kiribati, Lao People's Democratic Republic, Malaysia, Marshall Islands, Micronesia (Federated States of), Mongolia, Nauru, New Zealand, Niue, Palau, Papua New Guinea, Philippines, Republic of Korea, Samoa, Singapore, Solomon Islands, Tonga, Tuvalu, Vanuatu, Viet Nam



**Abb. 17 WHO Regionen.**

Die Mitgliedstaaten der WHO werden in 6 Regionen unterteilt, denen jeweils ein Regional Office zugeordnet ist. Die Zertifizierung der Poliofreiheit erfolgt für gesamte WHO Region. Die einzelnen Länder sind in Tab. 2 aufgelistet. (World Health Organization, 2017a)



**Abb. 18 Alignment der Primer PanPolio\_s, PanPolio\_as (sense und antisense) und der Sonde PanPolio\_probe der PanPolio-PCR.**

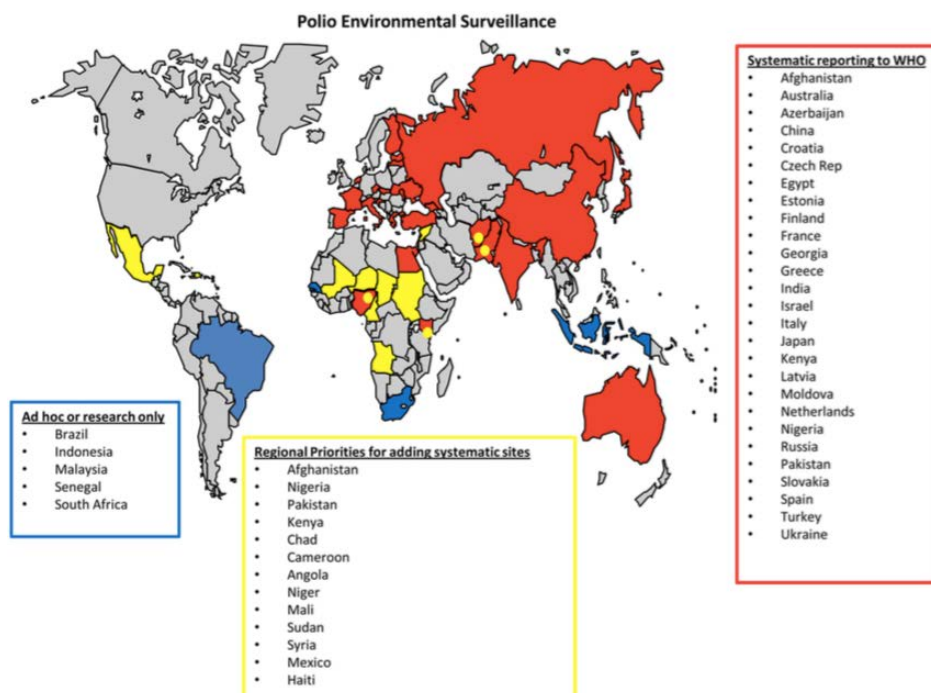
Basen: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin; Rot/Hellgrün/Gelb/Lila hinterlegt – Nicht übereinstimmende Basen; Grau hinterlegt - Degenerierte Basen nach IUPAC Codes für Eurofins: K = G/T, N = A/G/C/T, R = A/G, Y = C/T.

**Abb. 19 Ausschnitt aus dem Vektor für das Plasmid Poliovirus Typ 1.**

Hier ist als Beispiel ein Ausschnitt aus dem Vektor für das Plasmid Poliovirus Typ 1 gezeigt. Länge des Inserts: 103 bp. Der Auszug enthält das Insert (Polio 1) mit Primer- und Sondenbindungsstelle (PanPolio\_s/as/probe), die M13 forward Bindungsstelle, den T7 Promotor und den SP6 Promotor.

**Abb. 20 Schema des Vektors für Plasmid Poliovirus Typ 1, 2 und 3.**

Das Poliovirus-Insert ist spezifisch für die drei Virustypen mit einer Länge von 103 bp. Bestandteile des Vektors sind die Ampicillinresistenz (nur E.coli's die ein Plasmid enthalten, können auf dem Ampicillin-haltigen Agar wachsen), das Insert mit Primer- und Sondenbindungsstelle, M13 forward Bindungsstelle, T7 Promotor und SP6 Promotor. Gesamtlänge 3105 bp.



**Abb. 21 Polio Umweltüberwachung weltweit.**

Unterteilt wird in Länder, die systematisch an die WHO berichten (Rot), Ländern, die nach regionalen Prioritäten vorgehen (Gelb) und Ländern, die bei Bedarf und im Rahmen von Forschung Umweltüberwachungen durchführen (Blau). Die Karte wurde von Asghar et al. (2014) übernommen.

**Tab. 3 Retrospektiv erhobene Impfanamnese bei Probanden (n = 30) mit mangelhaftem Immunstatus (Titer < 8).**

Geburtsjahr	Alter <sup>1</sup>	Geschlecht <sup>2</sup>	Dokumentierte Impfungen und Anmerkungen	Titer gegen Poliovirus Typ 1	Titer gegen Poliovirus Typ 2	Titer gegen Poliovirus Typ 3
1956	58	m	Grundimmunisierung und eine Auffrischung (1974)	24	6	4
1957	57	m	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung 2005	> 32	6	> 32
1960	54	w	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung 2015	4	12	4
1964	50	m	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung (2014)	< 4	> 32	> 32
1969	45	w	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung (2010)	< 4	16	24
1970	45	w	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung 2008	> 32	> 32	< 4
1975	39	w	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung 2011	> 32	> 32	< 4
1977	37	w	Keine Angaben	16	16	4
1980	35	m	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung 1999	4	> 32	> 32
1985	30	w	Grundimmunisierung, letzte Auffrischung 2008	4	4	4
1986	28	m	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung 1996	12	12	4
1986	28	w	Keine Angaben, Empfehlung zur Immunisierung wurde ausgesprochen	6	6	< 4
1987	27	m	Keine Angaben, Empfehlung zur Immunisierung wurde ausgesprochen	> 32	6	< 4
1987	27	m	Keine Angaben, Empfehlung zur Immunisierung wurde ausgesprochen	> 32	4	16
1987	27	w	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung 1998	16	12	4
1987	27	w	Keine Angaben	> 32	16	4
1988	26	m	Keine Angaben	16	< 4	< 4
1988	26	w	Keine Angaben	16	6	< 4
1989	25	m	Keine Angaben	12	< 4	< 4
1989	25	w	Keine Angaben	< 4	8	< 4
1990	24	w	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung 1996	> 32	12	< 4
1992	22	m	Keine Angaben	> 32	> 32	6
1993	21	m	Keine Angaben	16	12	< 4
1993	21	m	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung (1995)	6	16	16
1993	21	w	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung 2005	192	192	< 4
1993	21	w	Keine Angaben	12	24	< 4
1994	20	m	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung 2005	16	> 32	< 4
1994	20	w	Grundimmunisierung, Letzte Auffrischung 2015	> 32	6	4
1995	19	w	Keine Angaben (wenige Impfungen)	< 4	12	< 4
1996	18	m	Grundimmunisierung und letzte Auffrischung (2007)	< 4	> 32	8

<sup>1</sup> Alter zum Zeitpunkt der Testung; <sup>2</sup> w = weiblich; m = männlich

**Tab. 4 Multiples lineares Regressionsmodell (abhängige Variable: Titer; unabhängige Variablen: Alter und Geschlecht).**

Poliovirustyp	R <sup>2</sup> (Gesamtmodell)	p-Wert (F-Test Gesamtmodell)	Koeffizienten	Regressionskoeffizient (Standardfehler)	p-Wert (T-Test Koeffizienten)
PV1	0,001	0,945	Konstante	378,77 (164,08)	0,023
			Alter	23,45 (73,05)	0,749
			Geschlecht	-2,16 (91,64)	0,981
PV2	0,003	0,863	Konstante	481,03 (177,81)	0,008
			Alter	-38,46 (79,16)	0,628
			Geschlecht	-4,53 (99,31)	0,964
PV3	0,016	0,496	Konstante	401,1 (174,31)	0,024
			Alter	88,75 (77,6)	0,256
			Geschlecht	-11,94 (97,35)	0,903

## **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

30.05.2018

Datum

Lisa Töpel

Unterschrift



## **Danksagung**

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Uwe Gerd Liebert für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, die gute Betreuung und die anregenden Gespräche während des Dissertationsvorhabens.

Grit Szczepankiewicz und Sandra Bergs für das Teilen ihrer wissenschaftlichen Erfahrungen, ihre fachliche Unterstützung bei praktischen Tätigkeiten im Labor und die entgegengebrachte Geduld und Hilfestellung bei kleinen oder größeren Problemen im Laboralltag.

Allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Virologie für den respektvollen, freundlichen Umgang, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Hilfsbereitschaft während meiner Zeit im Labor.

Weiterhin Herrn Dr. Rene Kallies und der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Antonis Chatzinotas vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung für die konstruktive Zusammenarbeit, fachliche Unterstützung, aufgewendeten Ressourcen und bereitgestellten Proben im Rahmen der Flusswasseruntersuchungen.

Frau Dr. Sabine Diedrich vom NRZ PE des Robert Koch Institutes für die Bereitstellung des WHO-Referenzserums und der internen Arbeitsvorschrift des RKI für den Virusneutralisationstest.

Frau Dr. med. Melanie Weiss vom betriebsärztlichen Dienst des Universitätsklinikum Leipzig für die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Erhebung von Patientendaten.

Abschließend ganz besonders meiner Familie und meinem Freund Matthias für den stetigen Rückhalt während des gesamten Studiums.