



(12) PATENT

(19) NO

(11) 335551

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/115 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/45 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20033272	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.01.18 PCT/NL2002/00040
(22)	Inng.dag	2003.07.18	(85)	Videreføringsdag	2003.07.18
(24)	Løpedag	2002.01.18	(30)	Prioritet	2001.01.19, EP, 01200213 2001.10.18, EP, 01203985
(41)	Alm.tilgj	2003.09.18			
(45)	Meddelt	2014.12.29			
(73)	Innehaver	Vironovative BV, Dr Molewaterplain 40, NL-3015 Rotterdam, NL-, Nederland			
(72)	Oppfinner	Jan Cornelius de Jong, Krugerlaan 205, NL-2806 EH Gouda, NL-, Nederland Ronaldus Adrianus Maria Fouchier, Essenburgsingel 44 A, NL-3021 AR Rotterdam, Nederland Bernadettu Gerarda van den Hoogen, Essenburgsingel 44 A, NL-3021 AR Rotterdam, Nederland Albertus Dominicus Marcellinus Erasmus Osterhaus, Dr Breveestraat 16, NL-3981 CH Bunnik, Nederland Jan Groen, Anholtkade 2, NL-3446 BM Woerden, NL-, Nederland			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Isolert negativt sense enkelttrådet RNA pattedyr metapneumovirus, isolert nukleinsyre,vektor, vertcelle, protein, antistoff og farmasøytisk sammensetning samt metoder for detektering og diagnostisering og et diagnostisk kit			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0020600 A1 BAYON-AUBOYER M.H. ET AL., "Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus.", ARCHIVES OF VIROLOGY, vol. 144, no. 6, 1999, s. 1091-1109 BAYON-AUBOYER M.H. ET AL., "Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup", Journal of General Virology, vol. 81, no. 11, 2000, s. 2723-2733 RANDHAWA J.S. ET AL., "Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus", Journal of Virology, vol. 71, no. 12, 1997, s. 9849-9854			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen vedrører feltet for virologi. Oppfinnelsen tilveiebringer et isolert essensielt pattedyr negativ sense enkelttrådet RNA-virus (MPV) innen underfamilien Pneumovirinae av familien Paramyxoviridae og er identifiserbart som fylogenetisk og korresponderer til arten 5 Metapneumovirus og komponenter av den.

Oppfinnelsen vedrører feltet virologi.

5 I de siste tiårene er flere etiologiske midler for pattedyrsykdom, spesielt sykdommer i luftveiene (RTI), spesielt hos mennesker identifisert⁷. Klassiske etiologiske midler for RTI hos pattedyr er luftveis synsytiøle virus som tilhører familien Pneumovirus som er funnet hos mennesker (hRSV) og ruminanter slik som storfe eller sau (bRSV og/eller oRSV). Hos mennesker blir RSV forskjeller i ensidige kryssnøytraliseringsanalyser, reaktiviteten av G-proteinene i immunologiske analyser og nukleotidsekvenser av G-genet anvendt for å definere 2 hRSV antigenet undergrupper. Innen undergruppene viser aa-sekvensene 94% (undergruppe A) eller 98% (undergruppe B) identitet, mens bare 53% aa-sekvensidentitet er funnet mellom undergruppene. Tilleggs variabilitet er observert innen undergruppene basert på monoklonale antistoffer. RT-PCR analyser og 15 RNase beskyttelsesanalyser. Virus fra begge undergruppene har en verdensomspennende distribuerings og kan finne sted i løpet av en enkelt sesong. Infeksjon kan finne sted i nærvær av på forhånd eksisterende immunitet og den antigene variasjonen er ikke strengt tatt nødvendig for å tillate re-infeksjon. Se for eksempel Sullender, W.M. Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. Clinical Microbiology Reviews, 2000. 13(1), s. 1-15; Collins, P.L. McIntosh, K. Og Chanock, R.M., Respiratory syncytial virus. Files Virology, red. B.N. Knipe, Howley, P.M. 1996, Philadelphia: lippencott-raven. 1313-1351; Johnson, P.R. et al., The G Glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgrupus A and B: extensive sequene divergence between antigenically related proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 20 84(16) s. 5625-9; Collins, P.L., The molecular Biology of Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) of the Genus Pneumovirus i The Paramyxoviruses, D.W. Kingsbury, utgiver, 1991, Plenum Press, New York, s. 103-153.

Et annet klassisk Pneumovirus er pneumonia viruset hos mus (PVM), som generelt bare 30 finnes hos laboratoriemus. Imidlertid kan en del av sykdommen som er observert blant pattedyr fremdeles ikke tilskrives kjente patogener.

WO 0020600 A1 beskriver en nukleinsyresekvens som koder for et fugle pneumovirus (APV) relatert polypeptid. Det APV relaterte proteinet kan anvendes for fremstilling av 35 en vaksine mot APV.

Bayon-Auboyer et al., Archives of Virology, vol. 144, no. 6, 1999, s. 1091-1109 omhandler karakterisering av rhinotracheitis virus fra kalkun (TRTV) som også tilhører Paramyxoviridae familien. Selv om TRTV tilhører Pneumovirusslekten i Pneumovirinae subfamilien, har viruset ingen strukturelle NS1 og NS 2 proteiner. Videre er genomet
5 organisert på en annen måte.

Bayon-Auboyer et al., Journal of General Virology, vol 81, no. 11, 2000, s. 2723-2733 beskriver sekvensanalyse utført på hele eller deler av genene som koder for fusjon F, polymerase L og G proteinene fra to fugle pneumovirus isolater.

10

Randhawa et al., Journal of Virology, vol. 71, no. 12, 1997, s. 9849-9854 viser at nukleotidsekvensen til regionene som ligger nærmest 3' og 5' områdene til N og L genene hos APV er bestemt.

15 Oppfinnelsen tilveiebringer et isolert essensielt pattedyr negativt sense enkelttrådet RNA-virus (MPV) som tilhører underfamilien Pneumovirinae til familien Paramyxoviridae og som er identifiserbar som at det fylogenetisk korresponderer til slekten Metapneumovirus. Nevnte virus er identifiserbar som at det fylogenetisk korresponderer til slekten Metapneumovirus ved å bestemme en nukleinsyresekvens hos
20 nevnte virus og å teste den i fylogenetiske analyser, for eksempel der hvor maksimale sannsynlighetstrær blir laget ved å anvende 100 programlaster og 3 "jumbles" og hvor man finner det til å være nærmere fylogenetisk korresponderende til et virusisolat oppbevart som I-2614 med CNCM, Paris enn det korresponderer til et essensielt fuglevirusisolat fra fugle pneumovirus (APV) også kjent som kalkun rhinotracheittvirus
25 (TRTV), det etiologiske middelet for fugle rhinotracheitt. For nevnte fylogenetiske analyser er det mest nyttig å skaffe tilveie nukleinsyresekvensen fra en ikke-MPV som fremmedgruppe som det skal sammenlignes med, et veldig nyttig fremmedgruppeisolat kan skaffes til veie fra fugle pneumovirus serotype C (APV-C), som for eksempel er vist i figur 5 her.

30

Selv om fylogenetiske analyser tilveiebringer en passende fremgangsmåte for å identifisere et virus som en MPV blir flere andre mulige mer rett frem enn selvfølgelig fremgangsmåter for å identifisere nevnte virus eller virale proteiner eller nukleinsyrer fra nevnte virus også tilveiebrakt her. Som en tommelfingerregel kan et
35 MPV identifiseres ved prosentene av en homologi av viruset, proteinene eller nukleinsyrene som skal identifiseres i sammenligning med isolatene, viralproteinene

eller nukleinsyrene identifisert her ved sekvens eller deponering. Det er generelt kjent at virusarter, spesielt RNA-virusarter, ofte inngår i kvasiarter hvor en gruppe med nevnte virus viser heterogenitet blant dens medlemmer. Dermed er det forventet at hvert isolat kan ha en noe forskjellig prosentselektskap med ett av de forskjellige isolatene som
5 tilveiebringes her.

Når man ønsker å sammenligne med det deponerte viruset I-2614, tilveiebringer oppfinnelsen et isolert essensielt pattedyr negativ sense enkelttrådet RNA-virus (MPV) som tilhører underfamilien Pneumovirinae av familien Paramyxoviridae og som er
10 identifiserbart ved at det fylogenetisk korresponderer til slekten Metapneumovirus ved å bestemme en aminosyresekvens fra nevnte virus og å bestemme at nevnte aminosyresekvens har en prosent aminosyrehomologi til et virusisolat deponert som I-2614 med CNCM, Paris, som er vesentlig høyere enn prosentene tilveiebrakt her for L-proteinet, M-proteinet, N-proteinet, P-proteinet eller F-proteinet, i sammenligning med
15 APV-C eller på samme måte så blir et isolert essensielt pattedyr negativt sense enkelttrådet RNA-virus (MPV) som tilhører underfamilien Pneumovirinae av familien Paramyxoviridae tilveiebrakt som identifiserbart ved at det fylogenetisk korresponderer til slekten Metapneumovirus ved å bestemme en nukleinsyresekvens som nevnte virus og å bestemme at nevnte nukleinsyresekvens har en prosent nukleinsyreidentitet til et
20 virusisolat deponert som I-2614 med CNCM, Paris, som er vesentlig høyere enn prosentene identifisert her for nukleinsyrene som koder for L-proteinet, M-proteinet, N-proteinet, P-proteinet eller F-proteinet som identifisert herunder i sammenligning med APV-C.

25 Igjen som en tommelfingerregel kan man betrakte et MPV som å tilhøre en av de to serologiske gruppene av MPV som identifisert her når isolatene eller de virale proteinene eller nukleinsyrene i isolatene som trenger å identifiseres har prosenthomologi som faller innen grensene og målene for prosenthomologier identifisert her for begge separate grupper ved å ta isolatene 00-1 eller 99-1 som de
30 respektive isolatene som skal sammenlignes. Når homologiprosentene er mindre eller det er et behov for å skille de virale isolatene fra for eksempel APV-C er det imidlertid mer veloverveid å gripe til de fylogenetiske analysene som er identifisert her.

Igjen bør man ha i mente at nevnte prosenter kan variere noe når andre isolater blir valgt
35 i bestemmelsen av homologiprosenten.

Foreliggende oppfinnelse omfatter isolert negativt sense enkelttrådet RNA pattedyr metapneumovirus, kjennetegnet ved at aminosyresekvensen til N proteinet fra nevnte negativt sense enkelttrådet RNA pattedyr metapneumovirus er minst 91 % identisk med aminosyresekvensen til N proteinet ifølge SEK ID NO:1, hvori sekvens identitet
5 bestemmes over hele lengden til N proteinet.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse isolert nukleinsyre, kjennetegnet ved at nukleinsyren koder for et virus ifølge hvilket som helst av kravene 1-4.

10 Omfatter av oppfinnelsen er også fremgangsmåte for å detektere et pattedyr metapneumovirus i en prøve fra et pattedyr, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter å bringe prøven i kontakt med en nukleinsyre som er minst 10 nukleinsyrer lang der nukleinsyren er minst 90% identisk med nukleotid sekvensen til humant MPV isolat 00-1 deponert ved CNCM, Institute Pasteur med aksjesjonsnummer I-2614.

15 Videre omfatter oppfinnelsen vektor, kjennetegnet ved at den omfatter nukleinsyren ifølge krav 5.

Omfattet av oppfinnelsen er også vertcelle, kjennetegnet ved at den omfatter
20 nukleinsyren ifølge krav 5.

Videre omfatter oppfinnelsen isolert protein, kjennetegnet ved at proteinet er avledet fra N, P, M, F, M2-1, M2-2, L, SH eller G proteinet til viruset i følge et hvilket som helst av kravene 1-4.

25 Omfattet av oppfinnelsen er også antistoff, kjennetegnet ved at antistoffet binder spesifikt til viruset ifølge hvilket som helst av kravene 1-4.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også fremgangsmåte for å detektere et pattedyr
30 metapneumovirus i en prøve, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter å bringe prøven i kontakt med antistoffet ifølge krav 11.

Videre omfatter oppfinnelsen fremgangsmåte for virologisk diagnostisering av metapneumovirus infeksjon i et pattedyr, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter
35 å bestemme, i en prøve fra nevnte pattedyr, tilstedeværelse av et viralt isolat eller komponent derav ved å bringe prøven i kontakt med nukleinsyren ifølge krav 5 eller

med en nukleinsyre som er minst 10 nukleinsyrer lang der nukleinsyren er minst 90% identisk med nukleotidsekvensen til humant MPV isolat 00-1 deponert ved CNCM, Institute Pasteur med aksjesjonsnummer I-2614.

5 Omfattet av oppfinnelsen er også fremgangsmåte for serologisk diagnostisering av metapneumovirus infeksjon i et pattedyr, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter å detektere, i en prøve fra nevnte pattedyr, tilstedeværelse av et antistoff spesifikt rettet mot et metapneumovirus eller en komponent derav ved å reagere nevnte prøve med proteinet ifølge krav 10.

10

Videre omfatter oppfinnelsen farmasøytisk sammensetning, kjennetegnet ved at den farmasøytisk sammensetning omfatter (i) et isolert negativt sense enkelttrådet RNA pattedyr metapneumovirus ifølge hvilket som helst av kravene 1-3; og (ii) en farmasøytisk akseptabel bærer.

15

Foreliggende oppfinnelse omfatter også diagnostisk kit for diagnostisering av en metapneumovirus infeksjon, kjennetegnet ved at det omfatter et virus ifølge hvilket som helst av kravene 1-3, en nukleinsyre ifølge krav 5, et protein eller fragment derav ifølge krav 10 eller et antistoff ifølge krav 11.

20

Ved anskaffelsen av dette MPV, tilveiebringer oppfinnelsen diagnostiske midler og fremgangsmåter og terapeutiske midler og fremgangsmåter som skal brukes i diagnosen og/eller behandling av sykdom, spesielt av luftveissykdom, spesielt hos pattedyr, aller helst i mennesker. På grunn av, selv om den er fjern, det genetiske slektskapet mellom

25 *det essensielle pattedyr MPV med det essensielle fugle APV, spesielt med APV-C, så er det mulig å tilveiebringe midler og fremgangsmåter til å brukes i diagnostisering og behandlingen av fuglesykdom. I virologi er det mest rådgivende at diagnose og/eller behandling av en spesifikk viral infeksjon blir utført med reagenser som er mest spesifikke for nevnte spesifikke virus som forårsaker nevnte infeksjon. I dette tilfellet*

30 *betyr det at det er å foretrekke at nevnte diagnose og/eller behandling av en MPV-infeksjon blir utført med reagenser som er mest spesifikke for MPV. Imidlertid ekskluderer dette ikke på noen måte at mindre spesifikke, men tilstrekkelig kryssreagerende reagenser blir brukt istedenfor, for eksempel fordi de er lettere tilgjengelige og på en tilstrekkelig måte adresserer problemstillingen der og da. Her blir*

35 *det for eksempel tilveiebrakt og utført virologisk og/eller serologisk diagnose av MPV-infeksjoner hos pattedyr med reagenser utledet fra APV, spesielt med reagenser utledet*

fra APV-C, i den detaljerte beskrivelsen her er det for eksempel vist at tilstrekkelig pålitelig serologisk diagnose av MPV-infeksjoner i pattedyr kan oppnås ved å anvende en ELISA spesifikt laget for å detektere APV antistoffer hos fugler. En spesiell nyttig test for dette formålet er en ELISA-test laget for deteksjonen av APV antistoffer (for eksempel i serum eller eggeplomme), en kommersielt tilgjengelig versjon av denne er kjent som APV-Ab SVANOVIR® som blir produsert av SVANOVA Biotech AB, Uppsala Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala, Sverige. Den reverse situasjonen er også tilfellet, her er det for eksempel tilveiebrakt å utføre virologisk og/eller serologisk diagnose av APV-infeksjoner i pattedyr med reagenser utledet fra MPV, i den detaljerte beskrivelsen her er det for eksempel vist at tilstrekkelig pålitelig serologisk diagnose av APV-infeksjoner hos fugler kan oppnås ved å anvende en ELISA laget for å detektere MPV-antistoffer. Ved å ta i betraktning at antigener og antistoffer har et lås- og nøkkelforhold, kan deteksjon av de forskjellige antigenene oppnås ved å velge det passende antistoffet som har tilstrekkelig kryssreaktivitet. For å stole på en slik kryssreaktivitet, er det selvfølgelig best å velge reagensene (slik som antigener eller antistoffer) under veiledning av aminosyrehomologier som eksisterer mellom de forskjellige (glyko)proteinene i de forskjellige virusene, hvor de reagensene som vedrører de mest homologe proteinene vil være mest nyttige å anvende i tester som er avhengig av nevnte kryssreaktivitet.

20

For nukleinsyredeteksjon er det enda mer rett frem, istedenfor å designe primere eller prober basert på heterologe nukleinsyresekvenser fra de forskjellige virusene og dermed detektere forskjeller mellom de essensielle pattedyr eller fugle metapneumovirusene er det tilstrekkelig å designe eller velge primere eller prober basert på de strekkene av virusspesifikk nukleinsyresekvenser som viser høy homologi. For nukleinsyresekvenser så vil homologiprosenter på 90% eller høyere generelt garantere tilstrekkelig kryssreaktivitet i diagnostiske tester som anvender stringente betingelser for hybridisering.

Oppfinnelsen tilveiebringer for eksempel en fremgangsmåte for å virologisk diagnostisere en MPV-infeksjon i et dyr, spesielt et pattedyr, mer bestemt et menneske, som omfatter å bestemme i en prøve fra nevnte dyr tilstedeværelsen av et viralt isolat eller komponent av det ved å la nevnte prøve reagere med en MPV-spesifikk nukleinsyre eller antistoff ifølge oppfinnelsen, og en fremgangsmåte for serologisk å diagnostisere en MPV-infeksjon i et pattedyr som omfatter å bestemme i en prøve av nevnte pattedyr tilstedeværelsen av et antistoff spesifikt rettet mot en MPV eller

35

komponent av det ved å la nevnte prøve reagere med et MPV-spesifikt proteinaktig molekyll eller fragment av det eller et antigen ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen tilveiebringer også et diagnostisk kitt for å diagnostisere en MPV-
5 infeksjon som omfatter en MPV, en MPV-spesifikk nukleinsyre, et proteinaktig
molekyll eller fragment av det, antigen og/eller et antistoff ifølge oppfinnelsen, og helst
midler for å detektere nevnte MPV, MPV-spesifikk nukleinsyre, proteinaktig molekyll
eller fragment av det, antigen og/eller et antistoff, nevnte midler omfatter for eksempel
en eksisterbar gruppe slik som en fluor for eller enzymatisk deteksjonssystem anvendt i
10 fagfeltet (eksempler på passende diagnostisk kittformat omfatter IF, ELISA,
nøytraliseringsanalyse, RT-PCR analyse). For å bestemme om en enda uidentifisert
viruskomponent eller syntetisk analog av det, slik som nukleinsyre, proteinaktig
molekyll eller fragment av det kan identifiseres som MPV-spesifikk, er det tilstrekkelig å
analysere nukleinsyren eller aminosyresekvensen av nevnte komponent, for eksempel
15 over et strekk med nevnte nukleinsyre eller aminosyre, helst på minst 10, mer ønskelig
minst 25, mer ønskelig minst 40 nukleotider eller aminosyrer (henholdsvis), ved
sekvenshomologisammenligning med kjente MPV-sekvenser og med kjente ikke-MPV-
sekvenser (APV-C blir helst anvendt) ved å anvende for eksempel fylogenetisk analyse
som tilveiebringes her. Avhengig av graden av slektskap med nevnte MPV eller ikke-
20 MPV-sekvenser kan komponenten eller den syntetiske analogen identifisere.

Oppfinnelsen tilveiebringer også fremgangsmåte for virologisk diagnostisering av en
MPV-infeksjon i et pattedyr som omfatter å bestemme i en prøve fra nevnte pattedyr
tilstedeværelsen av et viralt isolat eller komponent av det ved å la nevnte prøve reagere
25 med en kryssreagerende nukleinsyre utledet fra APV (helst serotype C) eller et
kryssreagerende antistoff som reagerer med nevnte APV, og en fremgangsmåte for å
serologisk diagnostisere en MPV-infeksjon i et pattedyr som omfatter å bestemme i en
prøve for nevnte pattedyr tilstedeværelsen av et kryssreagerende antistoff som også er
rettet mot en APV eller komponent av den ved å la nevnte prøve reagere med et
30 proteinaktig molekyll eller fragment av det, eller et antigen utledet fra APV. Videre
tilveiebringer oppfinnelsen anvendelsen av et diagnostisk kit som initielt ble laget for
APV eller APV-antistoffdeteksjon for å diagnostisere en MPV-infeksjon, spesielt for å
detektere nevnte MPV-infeksjon hos mennesker.

35 En fremgangsmåte beskrives heri som omfatter virologisk diagnostisering av en APV-
infeksjon i en fugl som omfatter å bestemme i en prøve av nevnte fugl tilstedeværelsen

av et viralisolat eller komponent av det ved å la nevnte prøve reagere med en kryssreagerende nukleinsyre utledet fra MPV eller et kryssreagerende antistoff som reagerer med nevnte MPV, og en fremgangsmåte for serologisk å diagnostisere en APV-infeksjon i en fugl som omfatter å bestemme i en prøve fra nevnte fugl

5 tilstedeværelsen av et kryssreagerende antistoff som også er rettet mot en MPV eller komponent av den ved å la nevnte prøve reagere med et proteinaktig molekyl eller fragment av det, eller et antigen utledet fra MPV. Videre er det mulig å anvende et diagnostisk kit som initielt ble laget for MPV eller MPV-antistoffdeteksjon for å diagnostisere en APV-infeksjon, spesielt for å detektere nevnte APV-infeksjon i fjærfe

10 slik som kylling, and eller kalkun.

Som nevnt ved behandling kan lignende anvendelse gjøres med det kryssreagerende funnet, spesielt når omstendighetene omkring gjør anvendelsen av den mer homologe tilnæringsmåten mindre rett frem. Vaksineringsmetoder som ikke kan vente, slik som

15 krisevaksineringsmetoder mot MPV-infeksjoner kan for eksempel utføres med vaksinepreparater utledet fra APV (helst type C) isolater når en mer homolog MVP-vaksine ikke er tilgjengelig og vise versa kan vaksinasjoner mot APV-infeksjoner overveies med vaksinepreparater utledet fra MPV. Reverse genetiske teknikker gjør det også mulig å lage kimere APV-MVP viruskonstruksjoner som er nyttige som en vaksine ved at de er

20 tilstrekkelig ulike feltisolatene for hver av de respektive stammene til å attenueres til et ønskelig nivå. Lignende reverse genetiske teknikker vil også gjøre det mulig å lage kimere paramyxovirus-metapneumovirus konstruksjoner, slik som RSV-MPV eller PI3-MPV-konstruksjoner for anvendelse i et vaksinepreparat. Slike konstruksjoner er spesielt nyttige som en kombinasjonsvaksine for å bekjempe luftveissykdommer.

25 Oppfinnelsen tilveiebringer dermed et nytt etiologisk middel, et isolert essensielt pattedyr negativt sense enkelttrådet RNA-virus (her også kalt MPV) som tilhører underfamilien Pneumovirinae av familien Paramyxoviridae, men som ikke er identifiserbart som et klassisk pneumovirus, og som tilhører arten Metapneumovirus og

30 MPV-spesifikke komponenter eller syntetiske analoger av den. Mammalske virus ligner metapneumoviruser, dvs. Metapneumovirus som kan isoleres fra pattedyr som essensielt fungerer som naturlig vert for nevnte virus, eller forårsaker sykdom i nevnte pattedyr, har inntil nå ikke blitt funnet. Metapneumovirus, som man generelt tror er essensielt begrenset til fjærfe som naturlig vert eller etiologisk middel for sykdom, er også kjent

35 som fugle pneumovirus. Nylig ble et APV-isolat fra and beskrevet (FR 2 801 607) som

videre demonstrerer at APV-infeksjoner essensielt er begrenset til fugler som naturlige verter.

Oppfinnelsen tilveiebringer et isolert pattedyr pneumovirus (her også kalt MPV) som
 5 omfatter en genrekkefølge og aminosyresekvens forskjellig fra den hos arten
 pneumovirus og som er nært beslektet og ved å betrakte dens fylogenetiske slektskap
 sannsynligvis tilhører arten Metapneumovirus innen underfamilien Pneumovirinae av
 familien Paramyxoviridae. Selv om metapneumovirus opp til nå bare er blitt isolert fra
 fugler, er det nå vist at beslektet, om enn fysisk forskjellig, kan viruset identifiseres i
 10 andre dyrearter slik som pattedyr. Her viser vi repetert isolering av MPV fra mennesker,
 mens ingen slike rapporter eksisterer fra APV. Videre, ulikt APV, replikerer MPV
 essensielt ikke eller bare i liten grad i kyllinger og kalkuner mens det lett replikerer i
 cynomolgous macaques. Ingen rapporter er blitt funnet på replikering av APV i
 pattedyr. I tillegg, mens spesifikke antisera mot MPV nøytraliserer MPV, så
 15 nøytraliserer ikke antisera mot APV A, B eller C MPV i samme grad, og denne mangel
 på fullstendig kryssreaktivitet tilveiebringer et annet bevis for at MPV er et forskjellig
 metapneumovirus. Videre, der hvor APV og MPV deler en lignende genrekkefølge, er
 G og SH-proteinene til MPV stort sett forskjellige fra de som er kjent fra APV i at de
 ikke viser noen signifikant sekvenshomologier på både aminosyre og nukleinsyrenivået.
 20 Diagnostiske analyser for å skille mellom APV og MPV-isolater eller antistoffer rettet
 mot disse forskjellige virus kan med fordel utvikles basert på en eller begge av disse
 proteinene (eksempler er IF, ELISA, nøytraliseringsanalyse, RT-PCR analyse). Også
 sekvens og/eller antigeninformasjon skaffet tilveie fra de mer beslektede N-, P-, M-, F-
 og L-proteinene til MPV og analyser av sekvenshomologien gjør med de respektive
 25 proteinene i APV, kan imidlertid også anvendes for å skille mellom APV og MPV. For
 eksempel avslørte fylogenetiske analyser av sekvensinformasjon skaffet tilveie fra MPV
 at MPV og APV er to forskjellige virus. Spesielt viser fylogenetiske trær at APV og
 MPV er to forskjellige linjer av virus. Vi har også vist at MPV har sirkulert i
 menneskepopulasjonen i minst 50 år, derfor har mellomartoverføring antagelig funnet
 30 sted for minst 50 år siden og er ikke en begivenhet som skjer hver dag. Fordi MPV CPE
 faktisk ikke var mulig å skilne fra den som ble forårsaket av hRSV eller hPIV-1 i tMK
 eller andre cellekulturer, kan MPV godt ha vært ubemerket inntil nå. tMK (tertiære ape
 nyreceller, dvs. MK-celler i en tredje passasje i cellekultur) blir helst anvendt på grunn
 av deres lave kostnader sammenlignet til primær eller sekundær kulturer. CPE er, så vel
 35 som for noen av de klassiske paramyxoviridae, karakterisert ved syncytiumdannelse
 hvoretter cellene viste hurtig intern ødeleggelse, etterfulgt av at cellene løsnet fra

monolaget. Cellene viste vanligvis (men ikke alltid) CPE etter tre passasjer av virus fra originalt materiale ved dag 10 til dag 14 etter inokulering, noe senere enn CPE forårsaket av andre virus slik som hRSV eller hPIV-1.

- 5 Som ødeleggende midler av sykdom står paramyxovirus for mange dyre- og menneskedød over hele verden hvert år. Paramyxoviridae danner en familie innen Monogavirales ordenen (negative sense enkelttrådet RNA-virus), som består av underfamiliene Paramyzovirinae og Pneumovirinae. Den siste underfamilien er på det nåværende tidspunkt taksonomisk delt i slektene pneumovirus og metapneumovirus¹.
- 10 Humant luftveis synsyttisk virus (hRSV), typeartene av pneumovirus slekten er den enkle mest viktige årsaken til lavere luftveisinfeksjoner under spedbarnsalderen og tidlig barndom over hele verden². Andre medlemmer av pneumovirus slekten inkluderer de bovine og ovine luftveis synsyttiske virus og pneumonia virus hos mus (PVM).
- 15 Fugle pneumovirus (APV) også kjent som kalkun rhinotrakeitisvirus (TRTV), det etiologiske middelet for fugle rhinotrakeitt, en øvre luftveisinfeksjon hos kalkun³, er det eneste medlem av det nylig utpekte Metapneumovirus slekten som, inntil nå som nevnt ikke var assosiert med infeksjoner, og videre med sykdommer hos pattedyr. Serologiske undergrupper av APV kan differensieres på basisen av nukleotid eller
- 20 aminosyresekvensene til G glykoproteinet og nøytraliserings tester ved å anvende monoklonale antistoffer som også gjenkjenner G glykoproteinet. Innen subgruppene A, B og D viser G-proteinet 98,5 til 99,7% aa sekvensidentitet med undergruppene mens mellom undergruppene er bare 31,2-38% aa identitet observert. Se for eksempel Collins, M.S., Gough, R.E. og Alexander, D.J., Antigenic differentiation of avian
- 25 pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. Avian Pathology, 1993, 22: s. 469-479; Cook, J.K.A., Jones, B.V., Ellis, M.M., Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. Avian Pathology, 1993. 22: s. 257-273; Bayon-Auboyer, M.H., et al., Nucleotid sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian
- 30 pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. J Gen Virol, 2000. 81 (Pt 11): s. 2723-33; Seal, B.S., Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. Virus Res, 1998. 58(1-2): s. 45-52; Bayon-Auboyer, M.H., et al., Comparison of T-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the
- 35 detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. Arch Virol, 1999. 144(6): s. 1091-109; Juhasz, K. Og A.J. Easton, Extensive sequence variation in the attachment (G)

protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J Gen Virol*, 1994. 75(Pt 11): s. 2873-80.

En videre serotype av APV er tilveiebrakt i WO 00/20600 som beskriver Colorado
 5 isolatet av APV og sammenlignet det med kjente APV- eller TRT-stammer med in vitro
 serum nøytraliseringstester. Først ble Colorado isolatet testet mot monospesifikke
 polyklonale antisera for å gjenkjenne TRT-isolater. Colorado-isolatet ble ikke
 nøytralisert ved monospesifikke antisera til noen av TRT-stammene. Det ble imidlertid
 nøytralisert med et hyperimmunt antiserum laget mot en undergruppe av stammen.
 10 Dette antiserum nøytraliserte det homologe viruset til et titer på 1:400 og Colorado-
 isolatet til et titer på 1:80. Ved å anvende den ovennevnte fremgangsmåten ble
 Colorado-isolatet så testet mot TRT monoklonale antistoffer. I hvert tilfelle var det
 resiproke nøytraliseringstiteret < 10 . Monospesifikke antiserum laget mot Colorado-
 isolatet ble også testet mot TRT-stammer i begge undergruppene. Ingen av TRT-
 15 stammene som ble testet ble nøytralisert med antiserumet mot Colorado-isolatet.

Colorado-stammen av APV beskytter ikke SPF kyllinger mot smitte med enten en
 undergruppe A eller en undergruppe B-stamme av TRT-viruset. Disse resultatene tyder
 på at Coloradoisolatet kan være det første eksempelet av en ytterligere serotype av fugle
 20 pneumovirus, som også er foreslått av Bayon-Auboyer et al (*J. Gen. Vir.* 81:2723-2733
 (2000)).

Det beskrives et isolert MPV som taksonomisk korresponderer til et (til nå ukjent
 pattedyr) metapneumovirus som omfatter en genrekkefølge som skiller seg fra den hos
 25 pneumovirus innen subfamilien Pneumovirinae av familien Paramyxoviridae.
 Klassifiseringen av de to slektene er basert primært på deres genkonstellasjon;
 metapneumovirus mangler generelt ikke strukturelle proteiner slik som NS1 eller NS2
 (se også Radhawa et al., *J. Vir.* 71:9849-9854 (1997) og genrekkefølgen er forskjellig
 fra den hos pneumovirus (RSV: '3-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-1-5', APV: '3-N-P-
 30 M-F-M-SH-G-L-5')^{4,5,6}. MPV som tilveiebrakt ved oppfinnelsen eller et virusisolat som
 taksonomisk korresponderer dertil er vist ved EM-analyse ved paramyxoviruslignende
 partikler. I overensstemmelse med klassifiseringen, er MPV, eller virusisolater som
 fylogenetisk korresponderer eller taksonomisk korresponderer dertil sensitive for
 behandling med kloroform; blir dyrket optimalt på tMK-celler eller celler som
 35 funksjonelt er ekvivalente til dem og er essensielt trypsinavhengig i de fleste
 cellekulturer. Videre tydet den typiske CPE og mangelen på hemagglutininaktivitet med

de fleste klassiske anvendte røde blodceller på at et virus som tilveiebrakt her er, om enn bare fjernt, beslektet med klassiske pneumovirus slik som RSV. Selv om de fleste paramyxovirus har hemagglutininaktivitet, har ikke de fleste pneumovirus det¹³. Et MPV inneholder også en andre overlappende ORF (M2-2) i nukleinsyrefragmentet som koder for M2-proteinet, som generelt i de fleste andre pneumovirus slik som for

5 eksempel også demonstrert i Ahmadian et al., J. Gen. Vir. 80:2011-2016 (1999).

For å finne ytterligere virale isolater som tilveiebrakt av oppfinnelsen er det tilstrekkelig å teste en prøve, som valgfritt er skaffet til veie fra et sykt dyr eller menneske, for

10 tilstedeværelsen av et virus av underfamilien Pneumovirinae, og teste et dermed tilveiebrakt virus for tilstedeværelsen av gener som koder for (funksjonelt) NS1 eller NS2 eller essensielt demonstrerer en genrekkefølge som er forskjellig fra den hos pneumovirus slik som RSV som allerede diskutert over. Videre kan et virusisolat som fylogenetisk korresponderer og dermed taksonomisk korresponderer med MPV finnes

15 ved krysshybridiseringseksperimenter ved å anvende nukleinsyre fra et her tilveiebrakt MPV-isolat, eller i klassiske kryss-serologiske eksperimenter ved å anvende monoklonale antistoffer spesifikt rettet mot og/eller antigener og/eller immunogener spesifikt utledet fra et MPV-isolat.

20 Nylig isolerte virus er fylogenetisk korresponderende til, og dermed taksonomisk korresponderende til MPV når de omfatter en genrekkefølge og/eller aminosyresekvens som er tilstrekkelig lik vår prototypiske MPV isolat eller isolater, og som er strukturelt korresponderende også, og viser nært slektskap til slekten Metapeumovirus innen underfamilien Pneumovirinae. Den høyeste aminosekvens homologien og å definere

25 den strukturelle overensstemmelsen på det individuelle proteinplanet mellom MPV og ethvert av de andre kjente virusene i den samme familien på det nåværende tidspunkt (APV undertype C) er for matriks 87%, for nukleprotein 88%, for fosforprotein 68%, for fusjonsprotein 81% og for deler av polymeraseproteinet 56 til 64%, noe som kan sluttes når man sammenligner sekvensene gitt i Figur 6 med sekvensene for andre virus,

30 spesielt for AVP-C. Individuelle proteiner eller hele virusisolat, henholdsvis høyere homologi til disse nevnte maksimumsverdiene blir betraktet som å være fylogenetisk i overensstemmelse og dermed taksonomisk i overensstemmelse med MPV og omfatter en nukleinsyresekvens som strukturelt er i overensstemmelse med en sekvens som vist i Figur 6. Hermed tilveiebringer oppfinnelsen et virus som fylogenetisk er i

35 overensstemmelse med det forekommende viruset. Det bør bemerkes at på samme måte som andre virus finnes det en viss grad av variasjon mellom forskjellige isolerte

essensielle pattedyr negativ sense enkelttrådede RNA-virusisolater som tilveiebrakt her. I fylogenetiske tærer har vi identifisert minst to genetiske klynger med virusisolater basert på komparative sekvensanalyser av deler av L, M, N og F-genene. Basert på nukleotid- og aminosyreforskjeller i de virale nukleinsyre eller aminosyresekvensene (de virale sekvensene), og i analogi til andre pneumovirus slik som RSV representerer disse MPV genotypene undergrupper av MPV. Innen hver av disse genetiske klyngene med MPV-isolater ble prosentidentiteten på nukleotidnivået funnet å være 94-100 for L, 91-100 for M, 90-100 for N og 93-100 for F og aminosyrenivået ble prosentidentiteten funnet til å være 91-100 for L, 98-100 for M, 96-100 for N og 98-100 for F. En ytterligere sammenligning kan finnes i figurene 18-28. Minimums prosentidentitet på nukleotidnivåer for hele gruppen av isolerte essensielle pattedyr negativ sense enkelttrådede RNA-virus blir tilveiebrakt her (MPV-isolater) identifisert så langt var 81 for L og M, 83 for N og 82 for F. På aminosyrenivået var denne prosenten 91 for L og N, 94 for M og 95 for F. Den virale sekvensen til et MPV-isolat eller et isolert MPV F-gen som tilveiebringes her for eksempel viser mindre enn 81% nukleotidsekvensidentitet eller mindre enn 82% (aminosyresekvensidentitet med den respektive nukleotid eller aminosyresekvensen til et APV-C fusjon (F) gen som for eksempel tilveiebrakt av Seal et al., *Vir. Res.* 66:139147 (2000).

Den virale sekvensen til et MPV-isolat eller et isolert MPV L-gen som tilveiebringes her for eksempel viser også mindre enn 61% nukleotidsekvensidentitet eller mindre enn 63% aminosyresekvensidentitet med den respektive nukleotid eller aminosyresekvensen til et APV-A polymerasegen som for eksempel tilveiebringes av Randhawa et al., *J. Gen. Vir.* 77:3047-3051 (1996).

Sekvens divergens av MPV-stammer rundt om i verden kan være noe høyere i analogi med andre virus. Som en konsekvens av dette er to potensielle genklynger identifisert ved analyser av delvise nukleotidsekvenser i N, M, F og L ORF'ene fra 9 virusisolater. 99-100% nukleotididentitet ble observert innen en klynge, og 81-88% identitet ble observert mellom klyngene. Sekvensinformasjon skaffet tilveie fra flere virusisolater bekreftet eksistensen til to genotyper. Virusisolat ned/00/01 som prototype på klynge A og virusisolat ned/99/01 som prototype på klynge B er blitt anvendt i kryssnøytraliseringsanalyser for å teste om genotypene er beslektet med forskjellige serotyper eller undergrupper. Fra disse dataene konkluderte vi at essensielle pattedyrisolater viser prosent aminosyre homologi høyere enn 64 for L, 87 for M, 88 for N, 68 for P, 81 for F, 84 for M2-1 eller 58 for M2-2 for isolatet I-2614 kan klassifiseres

som et isolert essensielt pattedyr negativt sense enkelttrådet RNA-virus som tilveiebrakt her. Spesielt så er de virusisolatene som generelt har en minimums prosentidentitet på nukleotidsekvensnivået med et prototype MPV isolat som tilveiebrakt her på 81 for L og M, 83 for N og/eller 82 for F medlemmer av gruppen med MPV isolater som tilveiebringes her. På aminosyrenivået er disse prosentene 91 for L og N, 94 for M og/eller 95 for F. Når prosent aminosyresekvenshomologi for et gitt virusisolat er høyere enn 90 for L og N, 93 for M eller 94 for F, ligner virusisolatene på gruppen med MPV-isolater som er vist i figur 5. Når prosenten av aminosyresekvenshomologien for et gitt virusisolat er høyere enn 94 for L, 95 for N eller 97 for M og F kan virusisolatet identifiseres til å tilhøre en av genotype klyngene representert i Figur 5. Det bør legges merke til at disse prosenthomologiene, som genetiske klynger er definert ved, ligner på graden av homologi som finnes blant genetiske klynger i de korresponderende genene til RSV.

Kort så tilveiebringer oppfinnelsen et isolert essensielt mammalsk negativ sense enkelttrådet RNA-virus (MPV) som tilhører underfamilien Pneumovirinae av familien Paramyxoviridae og som kan identifiseres som fylogenetisk i overensstemmelse til slekten Paramyxoviridae ved å bestemme en nukleinsyresekvens til et passende fragment av genomet til nevnte virus og å teste det i fylogenetiske tre analyser hvor maksimums sannsynlighetstrær blir laget ved å anvende 100 programlaster og 3 "jumbles" og å finne at det er nærmere fylogenetisk overensstemmende med et virusisolat som er deponert som I-2614 med CNCM, Paris enn at det er i overensstemmelse med et virusisolat fra fugle pneumovirus (APV) også kjent som kalkun rhinotrakeitis virus (TRTV), det etiologiske middelet for fugle rhinotrakeitt.

Passende nukleinsyre genomfragmenter som hver er nyttige for slike polygenetiske tre analyser er for eksempel ethvert av RAP-PCR fragmentene 1-10 som er fremlagt her i figurene 4 eller 5. Fylogenetiske tre analyser av genene for nukleoproteinet (N), fosfoproteinet (P), matriksproteinet (M) og fusjonsproteinet (F) hos MPV viste den høyeste graden av sekvenshomologi med APV serotype C, fugle pneumoviruset som primært finnes i fugler i USA.

I en foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert essensielt pattedyr negativ sense enkelttrådet RNA-virus (MPV) som tilhører underfamilien Pneumovirinae av familien Paramyxoviridae og som kan identifiseres som fylogenetisk i overensstemmelse med slekten Metapneumovirus ved å bestemme en

- nukleinsyresekvens fra et passende fragment i genomet til nevnte virus og å teste det i fylogenetiske tre analyser hvor maksimum sannsynlighetstrær blir laget ved å anvende 100 programlaster og 3 "jumbles" og å finne ut at det er nærmere fylogenetiske overensstemmelse med et virusisolat deponert som I-2614 med CNCM, Paris enn at det er i overensstemmelse med et virusisolat fra fugle pneumovirus (APV) også kjent som kalkun rhinotrakeitis virus (TRTV) det etiologiske middelet til fugle rhinotrakeitt hvor nevnte passende fragment omfatter en åpen leseramme som koder for et viralt protein fra nevnte virus.
- 10 En passende åpen leseramme (ORF) omfatter ORF som koder for N-proteinet. Når en samlet aminosyreidentitet på minst 91%, helst på minst 95% av det analyserte N-proteinet med N-proteinet fra isolat I-2614 blir funnet, omfatter det analyserte virusisolatet et foretrukket MPV-isolat ifølge oppfinnelsen. Som vist koder det første genet i det genomiske kartet til MPV for et 394 aminosyre (aa) protein og viser utbredt
- 15 homologi med N-proteinet til andre pneumovirus. Lengden av N ORF er identisk til lengden av N ORF til APV-C (tabell 5) og er mindre enn de hos andre paramyxovirus (Barr et al., 1991). Analyse av aminosyresekvensen viste den høyeste homologien med APV-C (88%) og bare 7-11% med andre paramyxovirus (tabell 6).
- 20 Barr et al. (1991) identifiserte 3 regioner med likhet mellom virus som tilhører klassen Monoegavirales: A, B og C (figur 8). Selv om likhetene er høyest innen en virusfamilie, er disse regionene meget konserverte mellom virus familier. I alle tre regionene viste MPV 97% aa sekvensidentitet med APV-C, 89% med APVB, 92 med APV-A og 66-73% med RSV og PVM. Regionen mellom aa-residiene 160 og 340 viser seg å være
- 25 meget konserverte blant metapneumovirus og i et noe mindre grad til Pneumovirinae (Miyahara et al., 1992; Li et al, 1996; Barr et al., 1991). Dette er i overensstemmelse med at MPV er metapneumovirus, denne bestemte regionen viser 99% likhet med APV C.
- 30 En annen passende åpen leseramme (ORF) som er nyttig i polygenetiske analyser omfatter ORF'en som koder for P-proteinet. Når en total aminosyreidentitet på minst 70%, helst på minst 85% av det analyserte P-proteinet med P-proteinet til isolat I-2614 finnes, omfatter det analyserte virusisolatet et foretrukket MPV-isolat ifølge oppfinnelsen. Den andre ORF'en i det genomiske kartet koder for et 294 aa protein som
- 35 deler 68% aa sekvenshomologi med P-protein til APV-C, og bare 22-26% med P-proteinet til RSV (Tabell 6). P-genet til MPV inneholder en vesentlig ORF og er med

hensyn til dette lik P fra mange andre paramyxoviruser (anmeldt i Lamb og Kolakofsky, 1996; Sedlmeier et al., 1988). I motsetning til APV A og B og PVM og i likhet med RSV og APV-C mangler MPV P ORF'en cysteinresidier. Ling (1995) foreslo at en region med høy likhet mellom alle pneumovirus (aa 185-241) spiller en rolle enten i
 5 RNA-synteseprosessen eller i opprettholdelsen av den strukturelle integriteten til nukleokapsidkomplekset. Denne regionen med høy likehet er også funnet i PMV (Figur 9), spesielt når man tar i betraktning konservative utskiftninger, som viser 100% likhet med APV-C, 93% med APV-A og B og ca. 81% med RSV. Den C-terminale delen av MPV P proteinet er rik på glutamatresidier som er blitt beskrevet for APV'er (Ling et
 10 al., 1995).

En annen passende åpen leseramme (ORF) som er nyttig i fylogenetiske analyser omfatter ORF'en som koder for M-protein. Når en total aminosyreidentitet på minst 94%, helst på minst 97% av det analyserte M-protein med M-protein fra isolat I-
 15 2614 finnes, omfatter det analyserte virusisolatet et foretrukket MPV isolat ifølge oppfinnelsen. Det tredje ORF'en i MPV-genomet koder for et 254 aa protein, som ligner M ORF'en hos andre pneumovirus. M ORF'en til MPV har eksakt den samme størrelsen som M ORF'ene til andre metapneumovirus (Tabell 5) og viser høy aa sekvenshomologi med matriksproteinene til APV (76-87%) lavere homologi med de fra
 20 RSV og PVM (37-38%) og 10% eller mindre homologi med de fra andre paramyxovirus (Tabell 6). Easton (1997) sammenlignet sekvensene for matriks proteinene til alle pneumovirus og fant et konserverte heksapeptid ved residie 14 til 19 som også er konserverte i MPV (Figur 10). For RSV, PVM og APV er små sekundære ORF'er innen eller overlappende med hoved ORF'en til M blitt identifisert (52 aa og 51
 25 aa i bRSV, 75 aa i RSV, 46 aa i PVM og 51 aa i APV). (Yu et al., 1992; Easton et al., 1997; Samal et al., 1991; Satake et al., 1984). Vi la merke til to små ORF'er i M ORF'en til MPV. En liten ORF på 54 aa residiver ble funnet innen hoved M ORF'en, som starter ved nukleotid 2281 og en liten ORF på 33 aa residiver ble funnet som overlapper med hoved ORF'en til M som starter ved nukleotid 2893 (data ikke vist). På
 30 samme måte som de sekundære ORF'ene til RSV og APV er det ingen signifikant homologi mellom disse sekundære ORF'ene og sekundære ORF'er til andre pneumovirus, og tilsynelatende mangler start og stoppsignaler. I tillegg har det ikke vært rapportert bevis for syntesen av proteiner som korresponderer til disse sekundære ORF'ene i APV og RSV.

En annen passende åpen leseramme (ORF) som er nyttig i fylogenetiske analyser omfatter ORF'en som koder for F-proteinet når en total aminosyreidentitet på minst 95%, helst på minst 97% av det analyserte F-proteinet med F-proteinet til isolat I-2614 finnes, omfatter det analyserte virusisolatet et foretrukket MPV-isolat ifølge

5 oppfinnelsen. F ORF'en til MPV er lokalisert tilstøtende til M ORF'en som er karakteristisk for medlemmer av Metapneumovirus slekten. F-genet til MPV koder for et 539 aa protein som er to aa residier lenger enn F hos APV-C (Tabell 5). Analyse av aa sekvensen viste 81% homologi med APV-C, 67% med APV-A og B 33-39% med pneumovirus F-proteiner og bare 10-18% med andre paramyxovirus (Tabell 6). Et av de

10 konserverte trekkene blant F-proteinene hos paramyxovirus og som også ses i MPV er fordelingen av cysteinresidier (Morrison, 1988; Uy et al., 1991). Metapneumovirus deler 12 cysteinresidier i F1 (7 er konserverte blant alle paramyxovirus) og 2 i F2 (1 er konserverte blant alle paramyxovirus). Av de 3 potensielle N-koblede glykosyleringssetene tilstede i F ORF'en hos MPV deles ingen med RSV og to

15 (posisjon 66 og 389) deles med APV. Det tredje unike potensielle N-koblede glykosyleringssetet for MPV er lokalisert ved posisjon 206 (Figur 11). Til tross for den lave sekvenshomologien med andre paramyxovirus viste F-proteinet til MPV typiske fusjonsproteinkarakteristikker som er i overensstemmelse med de som er beskrevet for F-proteiner hos andre Paramyxoviridae familiemedlemmer (Morrison, 1988). F-

20 proteinene til Paramyxoviridae medlemmer blir syntetisert som inaktive forløpere (F0) som kløyves ved hvert celleprotease som lager aminoterminal F2 subenheter og store karboksyterminale F1 subenheter. Det foreslåtte kløvningssetet (Collins et al., 1996) er konserverte blant alle medlemmer av Paramyxoviridae familien. Kløyvingssetet hos MPV inneholder residier RQSR. Begge arginin (R) residier deles med APV og RSV,

25 men glutamin (Q) og serin (S) residier deles med andre paramyxovirus slik som human parainfluenzavirus type 1, Sendai virus og morbillivirus (data ikke vist). Den hydrofobe regionen ved den aminoterminal delen av F1 tror man fungerer som membran fusjonsdomene og viser høy sekvenslikhet blant paramyxovirus og mobilivirus og i mindre grad til pneumovirus (Morrison, 1988). Disse 26 residier

30 (posisjon 137-163, Figur 11) er konserverte mellom MPV og APV-C, som er i overensstemmelse med at denne regionen er meget konserverte blant metapneumovirus (Naylor et al., 1998; Seal et al., 2000).

Som man ser for F2 subenheterne til APV og andre paramyxovirus viste MPV en

35 utsletting på 22 aa residier sammenlignet med RSV (posisjon 107-128, Figur 11). For RSV og APV ble det videre funnet at signalpeptidet og forankringsdomenet var

konserverte innen undertyper og de viste høy variabilitet mellom undertypene (Plows et al., 1995; Naylor et al., 1998). Signalpeptidet til MPV (aa 10-35, Figur 11) ved den aminoterminalen delen av F2 viser noe sekvenslikhet med APV-C (18 av 26 aa residier er like) og mindre konservering med andre APV'er eller RSV. Mye mer variabilitet ses i
 5 membranforankringsdomenet ved den karboksyterminale delen av F1, selv om noe homologi fremdeles ses med APV-C.

En annen passende åpen leseramme (ORF) som er nyttig i fylogenetiske analyser omfatter ORF som koder for M2-proteinet. Når en total aminosyreidentitet på minst
 10 85%, helst på minst 90% av det analyserte M2-proteinet med M2-proteinet fra isolat I-2614 finnes, omfatter det analyserte virusisolatet et foretrukket MVP-isolat ifølge oppfinnelsen. M2-genet er unikt for Pneumovirinae og to overlappende ORF'er er blitt observert i alle pneumovirus. Den første hoved ORF'en representerer M2-1 proteinet som forsterker prosessiviteten til den virale polymerasen (Collins et al., 1995; Collins,
 15 1996) og dets gjennomlesning av intergene regioner (Hardy et al., 1998; Fears et al., 1999). M2-1 genet for MPV lokalisert tilstøtende til F-genet, koder for et 187 aa-protein (Tabell 5), og viser den høyeste (84%) homologien med M2-1 hos APV-C (Tabell 6). Sammenligning av alle pneumovirus M2-1 proteiner viste den høyeste konserveringen i den aminoterminalen halvdel av proteinet (Collins et al., 1990; Zamora et al., 1992;
 20 Ahmadian et al., 1999) som er i overensstemmelse med observasjonen at MPV viser 100% likhet med APV-C i de første 80 aa residiene av proteinet (Figur 12A). MPV M2-1 proteinet inneholder 3 cysteinresidier lokalisert innen de første 30 aa-residiene som er konserverte blant alle pneumovirus. En slik konsentrasjon av cysteiner ble ofte funnet i sinkbindende proteiner (Ahmadian et al., 1991; Cuesta et al., 2000).

25

Den sekundære ORF'en (M2-2) som overlapper med M2-1 ORF'ene hos pneumovirus er konserverte med hensyn til lokalisering, men ikke sekvens, og antas å være involvert i kontrollen av switchen mellom virus RNA-replikering og transkripsjon (Collins et al., 1985; Elango et al., 1985; Baybutt et al., 1987; Collins et al., 1990; Ling et al., 1992;
 30 Zamora et al., 1992; Alansari et al., 1994; Ahmadian et al., 1999; Bermingham et al., 1999). For MPV starter M2-2 ORF'en ved nukleotid 212 i M2-1 ORF'en (Figur 7), som er nøyaktig den samme startposisjonen som for APV-C. Lengden av M2-2 ORF'ene er den samme for APV-C og MPV, 71 aa-residier (Tabell 5). Sekvenssammenligning av M2-2 ORF'en (Figur 12B) viste 56% aa-sekvenshomologi mellom MPV og APV-C og
 35 bare 26 til 27% aa-sekvenshomologi mellom MPV og APV-A og B (Tabell 6).

En annen passende åpen leseramme (ORF) som er nyttig i fylogenetiske analyser omfatter ORF'en som koder for L-proteinet. Når en total aminosyreidentitet på minst 91%, helst på minst 95% av det analyserte L-proteinet med L-proteinet til isolat I-2614 finnes, omfatter det analyserte virusisolatet en foretrukket MVP-isolat ifølge

5 oppfinnelsen. I analogi til andre negative trådvirus er den siste ORF'en i MVP-genomet den RNA-avhengige RNA-polymerasekomponenten til replikerings og transkripsjonskompleksene. L-genet til MPV koder for et 2005 aa-protein, som er et residiet lenger enn APV-A proteinet (Tabell 5). L-proteinet til MPV deler 64% homologi med APV-A, 42-44% med RSV og ca. 13% med andre paramyxovirus

10 (Tabell 6). Pach et al. (1989; 1990) identifiserte seks konserverte domener innen L-proteinene hos ikke-segmenterte negative tråd RNA-virus hvor domenet 3 inneholdt 4 kjernepolymerasemotiver som antas å være essensielle for polymerasefunksjon. Disse motivene (A, B, C og D) er godt konserverte i MPV L-proteinet: i motivene A, B og C: MPV deler 100% likhet med alle pneumovirus og i motiv D deler MPV 100% likhet

15 med APV og 92% med RSV'er. For hele domenet III (aa 625-847 i L ORF'en), deler MPV 83% identitet med APV, 67-68% med RSV og 26-30% med andre paramyxovirus (Figur 15). I tillegg til polymerasemotivene inneholder pneumovirus L-proteinene en sekvens som tilpasser seg til et konsensus ATP bindingsmotiv $K(X)_{21}GEGAGN(X)_{20}K$ (Stec, 1991). MPV L ORF'en inneholder et lignende motiv som APV, hvor

20 mellomrommet av intermediatmedisinet er av med en: $K(x)_{22}GEGAGN(X)_{19}K$.

En mye foretrukket passende åpen leseramme (ORF) som er nyttig i fylogenetiske analyser omfatter ORF'en som koder for SH-proteinet. Når en total aminosyreidentitet på minst 30%, helst på minst 50%, eller helst på minst 75% av det analyserte SH-

25 proteinet med SH-proteinet til isolat I-2614 finnes, omfatter det analyserte virusisolatet et foretrukket MV-isolat ifølge oppfinnelsen. Genet lokalisert tilstøtende til M2 i MPV koder for et 183 aa-protein (Figur 7). Analyse av nukleotidsekvensen og dens utledede aminosyresekvens viste ingen merkbar homologi med andre RNA-virusgener eller genprodukter. SH ORF'en til MPV er den lengste SH ORF'en som er kjent på det

30 nåværende tidspunkt (Tabell 5). Sammensetningen av aa-residiene til SH ORF'en er relativt lik til den hos APV, RSV og PVM, med en høy prosent av treonin og serin (22%, 18%, 19%, 20,0%, 21% og 28% serin/treonin innhold for henholdsvis MPV, APV, RSV A, RSV B, bRSV og PVM). SH ORF'en til MPV inneholder 10 cysteinresidier mens APV SH inneholder 16 cysteinresidier. Alle pneumovirus har

35 lignende antall med potensielle N-glykosylerings seter (MPV 2, APV 1, RSV 2, bRSV 3, PVM 4).

Hydrofobisitetetsprofilene til MPV SH-proteinet og SH til APV og RSV viste lignende strukturelle karakteristika (Figur 13B). SH ORF'ene til APV og MPV har en hydrofil N-terminal del (aa 1-30), et sentralt hydrofobt domene (aa 30-53) som kan tjene som et potensielt membrandekkende domene. Et andre hydrofobt domene rundt residiet 160 og en hydrofil C-terminal del. I motsetning til dette syntes det som om RSV SH mangler den C-terminale delen av APV og MPV ORF'en. I alle pneumovirus SH-proteiner er det hydrofobe domenet flankert av basiske aminosyrer, som også er funnet i SH ORF'en hos MPV (aa 29 og 54).

10

En annen mye foretrukket passende åpen leseramme (ORF) som er nyttig i fylogenetisk analyse omfatter ORF'en som koder for G-proteinet. Når en total aminosyreidentitet på minst 30%, helst på minst 50%, aller helst på minst 75% av det analyserte G-proteinet med G-proteinet av isolat I-2614 finnes, omfatter det analyserte virusisolatet et foretrukket MPV-isolat ifølge oppfinnelsen. ORF'en til MPV er lokalisert tilstøtende til SH-genet og koder for et 236 aminosyreprotein. En sekundær liten ORF er funnet som følger rett etter denne ORF'en, og som potensielt koder for 68 aa-residier (posisjon 6973 til 7179), men som mangler et startkodon. En tredje hoved ORF, i en forskjellig leseramme, på 194 aa-residier (fragment 4, Figur 7) overlapper med begge disse ORF'ene, men mangler også et startkodon (nukleotid 416 til 7 000). Denne hoved ORF'en etterfølges av en fjerde ORF i den samme leserammen (nt 7001-7198), og som mulig koder for 65 aa-residier, men som igjen mangler et startkodon. Til slutt er en potensiell ORF på 97 aa-residier (men som mangler et startkodon) funnet i den tredje leserammen (nt 6444-6737, Figur 1). Ulik den første ORF'en, har de andre ORF'ene ingen tydelige genstart eller gensluttsekvenser (se under). Selv om den 236 aa-residie G ORF'en muligvis representerer i det minste en del av MPV festeproteinet kan det ikke ekskluderes at kodende sekvenser i tillegg uttrykkes som separate proteiner eller som del av festeproteinet gjennom noen RNA redigeringsbegivenheter. Det bør legges merke til at for APV og RSV er ingen ORF'er etter den primære G ORF'en blitt identifisert, men at både APV og RSV har sekundære ORF'er innen hoved ORF'en til G. Bevis for ekspresjon av disse ORF'ene er imidlertid ikke tilstede og der er ingen homologi mellom de forutsagte aa-sekvensene hos forskjellige virus (Ling et al., 1992). De sekundære ORF'ene i MVP G viser ingen karakteristikk til andre G-proteiner og om tilleggs ORF'er blir uttrykt krever ytterligere undersøkelser. Blast-analyser med alle fire ORF'ene viste ingen merkbar homologi på nukleotid eller aa-sekvensnivå med andre kjente virusgener eller genprodukter. Dette er i overensstemmelse med lave

35

sekvenshomologier funnet for andre G-proteiner som hRSV A og B (53%) (Johnson et al., 1987) og APV A og B (38%) (Juhasz et al., 1994). Mens de fleste av MPV ORF'ene ligner de hos APV både i lengde og sekvens, er G ORF'en til MPV betydelig mindre enn G ORF'en til APV (Tabell 5). Aa-sekvensen viste et serin- og treoninnhold på 34% som er enda høyere enn de 32% for RSV og 24% for APV. G ORF'en inneholder også 8,5% prolinresidier, som er høyere enn de 8% for RSV og 7% for APV. Den uvanlige rikeligheten av prolinresidier i G-proteinet til APV, RSV og MPV er også blitt observert i glykoproteiner med slimet opphav hvor den er en hovedbestemmende faktor for proteinenes tredimensjonale struktur (Collins et al., 1983; Werz et al., 1985; Jentoft, 1990). Antallet potensielle N-koblede glykosyleringsseter i G hos MPV er lignende til andre pneumovirus: MPV har 5 mens hRSV har 7, bRSV har 5 og APV har 3 til 5.

Den forutsagte hydrofobisitetsprofilen til MPV G viste karakteristika lignende med andre pneumovirus. Den aminoternale enden inneholder en hydrofil region etterfulgt av et kort hydrofobt område (aa 33-53) og en stort sett hydrofil karboksyterminal ende (Figur 14B). Denne totale organiseringen er i overensstemmelse med den til et forankret type II transmembranprotein og korresponderer godt med disse regionene i G-proteinene til APV og RSV. G ORF'en til MPV inneholder bare et cysteinresidiet i motsetning til RSV og APV (henholdsvis 5 og 20).

Ifølge klassiske serologiske analyser som for eksempel kjent fra Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.K. og Brown, F., Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses, Arch Virol., 1991, suppl. 2: s. 140-144 et MPV-isolat også identifiserbart som å tilhøre til en serotype som tilveiebrakt her, ved at det defineres på basis av dets immunologiske særpreg, som bestemt ved kvantitativ nøytralisering med dyre antisera (skaffet tilveie fra f.eks. ilder eller marsvin som tilveiebrakt i den detaljerte beskrivelsen). En lik serotype har enten ingen kryssreaksjon med andre eller viser et homologt til heterologt titerforhold som er større enn 16 i begge retninger. Hvis nøytralisering viser en viss grad av kryssreaksjon mellom to virus i enten den ene eller i begge retninger (homologt til heterologt titerforhold på 8 eller 16) er særpreget til serotypen antatt hvis vesentlige biofysiske/biokjemiske forskjeller av DNA eksisterer. Hvis nøytraliseringsviser en distinkt grad av kryssreaksjon mellom to virus i enten den ene eller begge retninger (homologt til heterologt titerforhold er mindre enn 8), er serotypeidentitet til isolatene som studeres antatt. Som nevnt, blir nyttige prototype isolater slik som isolat I-2614, her også kjent som MPV-isolat 00-1 tilveiebrakt her.

En ytterligere klassifisering av et virus som et isolert essensielt pattedyr negativt sense enkelttrådet RNA-virus som tilveiebrakt her kan gjøres på basisen av homologi til G og/eller SH-proteinet. Der hvor den totale aminosyresekvensidentiteten mellom APV (isolert fra fugler) og MPV (isolert fra mennesker) N, P, M, F, M2 og L ORF'ene var generelt 64 til 88%, og nukleotidsekvenshomologi også ble funnet mellom de ikke-kodende regionene til APV og MPV-genomene, ble essensielt ingen merkbar aminosyresekvenshomologi funnet mellom to av ORF'ene i det humane isolatet (MPV) og noen av ORF'ene hos andre paramyxovirus. Aminosyreinnholdet, hydrofobisitetssprofiler og lokalisering av disse ORF'ene i det virale genomet viser at de representerer G og SH-proteinanaloger. Sekvenshomologien mellom APV og MPV, deres lignende genomiske organisering (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') så vel som fylogenetiske analyser tilveiebringer ytterligere bevis for den foreslåtte klassifiseringen av MPV som det første pattedyr metapneumovirus. Nye MPV-isolater blir dermed for eksempel identifisert som dette ved virusisolering og karakterisering på tMK eller andre celler, ved RT-PCR og/eller sekvensanalyser etterfulgt av fylogenetiske treanalyser og ved serologiske teknikker slik som virus nøytraliseringsanalyser, indirekte immunfluorescens analyser, direkte immunfluorescens analyser, FAC-analyser eller andre immunologiske teknikker. Helst er disse teknikkene rettet mot SH og/eller G-protein analoger.

For eksempel beskrives det her en fremgangsmåte for å identifisere ytterligere isolater av MPV som tilveiebrakt her, fremgangsmåten omfatter å innokulere et essensielt MPV-uinfisert eller spesifikt patogenfritt marsvin eller ilder (i den detaljerte beskrivelsen blir dyret innokulert intranasalt, men andre måter for innokulering slik som intramuskulær eller intradermal innokulering, og ved å anvende et annet instrumentelt dyr er også mulig) med prototypeisolatet I-2614 eller relaterte isolater. Sera blir samlet fra dyret på dag 0, 2 uker og 3 uker etter innokulering. Dyret blir spesifikt serologisk omdannet som målt i virusnøytraliserings (VN) analyse og indirekte IFA mot det respektive isolatet I-2614 og sera fra dyret som ble serologisk omdannet blir anvendt i den immunologiske deteksjonen av nevnte ytterligere isolater.

Som et eksempel beskrives her karakteriseringen av et nytt medlem av familien Paramyxoviridae, et humant metapneumovirus eller metapneumoviruslignende virus (fordi dets slutt-taksonomi avventer diskusjon av en viral taksonomikomiteé blir MPV her for eksempel beskrevet som taksonomisk å korrespondere til APV) (MPV) som kan

- forårsake alvorlige RTI hos mennesker. De kliniske tegnene på sykdommen forårsaket av MPV er essensielt like til de som forårsakes av hRSV, slik som hoste, myalgi, oppkast, feber, bronkitt eller lungebetennelse, mulig øyekatarr eller kombinasjoner av dem, som kan ses hos hRSV-infiserte barn, er det mulig at spesielt veldig små barn krever sykehusinnleggelse. Som et eksempel blir hermed et MPV som ble deponert 19. januar 2001 som I-2614 med CNCM, Institute Pasteur, Paris eller et virus isolert som fylogenetisk korresponderer dertil tilveiebrakt. Dermed tilveiebringes et virus som omfatter en nukleinsyre eller funksjonelt fragment som fylogenetisk korresponderer til en nukleinsyresekvens som vist i Figur 6a, 6b, 6c og som strukturelt korresponderer dertil. Spesielt tilveiebringes et virus som er karakterisert ved at det etter å bli testet i fylogenetiske treanalyser hvor maksimum sannsynlighetstrær blir laget ved å anvende 100 programtaster og 3 "jumbles" er funnet å være nærmere fylogenetisk korresponderende til et virusisolat deponert som I-2614 med CNCM, Paris enn at det er beslektet til et virusisolat fra fugle pneumovirus (APV) også kjent som kalkun rhinotrakeitt virus (TRTV), det etiologiske middelet for fugle rhinotrakeitt. Det er spesielt nyttig å anvende et AVP-C virusisolat som fremmedgruppe i nevnte fylogenetiske treanalyser, fordi det er den nærmeste slektningen, og om enn et essensielt ikke-pattedyrvirus.
- Vi foreslår at det nye humane viruset skal benevntes humant metapneumovirus eller metapneumoviruslignende virus (MVP) basert på flere observasjoner. EM-analyser avslørte paramyxovirus-lignende partikler. I overensstemmelse med klassifiseringen, viste det seg at MPV er sensitiv for behandling med kloroform. MPV ble dyrket optimalt på tMK-celler og er trypsin-avhengig. De kliniske symptomene forårsaket av MPV så vel som den typiske CPE og mangel på hemagglutininaktivitet tydet på at dette viruset er nært beslektet til HRSV. Selv om de fleste paramyxovirus har hemagglutininaktivitet, har de fleste pneumovirus ikke det ¹³.

- Som et eksempel beskrives her et ikke tidligere identifisert paramyxovirus fra nasofaryngale utsugingsprøver tatt fra 28 barn som lider av alvorlig RTI. De kliniske symptomene til disse barnene var stort sett like til de som forårsakes av hRSV. 28 av pasientene var barn under 5 år og halvparten av disse var mellom 1 og 12 måneder gamle. Den andre pasienten var 18 år gammel. Alle individene led av øvre RTI, med symptomer i området fra hoste, myalgi, oppkast og feber til bronkitt og alvorlig lungebetennelse. Mesteparten av disse pasientene var innlagt på sykehus i 1-2 uker.

Virusisolatene for disse pasientene hadde paramyxovirusmorfologien i negativ kontrast elektronmikroskopi, men reagerte ikke med spesifikke antisera mot kjente humane og dyre paramyxovirus. De var alle tett i slektenskap med hverandre som bestemt ved indirekte immunfluorescensanalyser (IFA) med sera laget mot to av isolatene.

- 5 Sekvensanalyser av 9 av disse isolatene viste at viruset er i noen grad beslektet med APV. Basert på virologiske data, sekvenshomologi så vel som den genomiske organiseringen foreslår vi at viruset er et medlem av Metapneumovirus slekten. Serologiske kartlegginger viste at dette viruset er en relativ vanlig patogen fordi den alminnelige forekomsten med hensyn til serologi i Nederland nærer seg 100% av
- 10 menneskene i en alder av 5 år. Videre ble den alminnelige forekomsten med hensyn til serologi funnet å være like høy i sera samlet fra mennesker i 1958, noe som indikerer at dette virus har vært sirkulert i den menneskelige populasjon i mer enn 40 år. Identifikasjonen av dette foreslo at dette nye medlemmet av Metapneumovirus-slekten nå også tilveiebringes for utviklingen av midler og fremgangsmåter for diagnostiske
- 15 analyser eller testkitt og vaksiner eller serum eller antistoffsammensetninger for virale luftveisinfeksjoner, og for fremgangsmåter for å teste eller screene for antivirale midler som er nyttige i behandlingen av MPV-infeksjoner.

- I denne utstrekningen tilveiebringer oppfinnelsen blant andre et isolert eller
- 20 rekombinant nukleinsyre eller virusspesifikt funksjonelt fragment av den som kan skaffes tilveie fra et virus ifølge oppfinnelsen. Primere og/eller prober som er passende for å identifisere en MPV nukleinsyre beskrives heri.

- Videre så tilveiebringer oppfinnelsen en vektor som omfatter en nukleinsyre ifølge
- 25 oppfinnelsen. Som en start tilveiebringes vektorer slik som plasmidvektorer som inneholder (deler av) genomet fra MPV, virusvektorer som inneholder (deler av) genomet av MPV, (for eksempel, men ikke begrenset til andre paramyxovirus, vaccinia virus, retrovirus, bakulovirus), eller MPV som inneholder (deler av) genomet fra andre virus eller andre patogener. Videre så er en rekke reverse genetiske teknikker blitt
- 30 beskrevet for dannelsen av rekombinante negative trådvirus basert på to kritiske parameter. Først, produksjonen av slike virus avhenger av replikasjonen av en partiell eller fullengdekopi av den negative sense virale RNA (vRNA) genomet eller en komplementær kopi av den (cRNA). Dette vRNA eller cRNA kan isoleres fra infeksiose virus, produsert ved in vitro transkripsjon, eller produsert i celler ved transfeksjon av
- 35 nukleinsyre. For det andre avhenger produksjonen av rekombinante negative trådvirus på et funksjonelt polymerasekompleks. Typisk så består polymerasekomplekset til

pneumovirus av N, P, L og muligvis M2-proteiner, men er ikke nødvendigvis begrenset til dem. Polymerasekomplekser eller komponenter av det kan isoleres fra viruspartikler, isolert fra celler som uttrykker et eller flere av komponentene, eller produsert ved transfeksjon av spesifikke ekspresjonsvektorer.

5

Infeksiøse kopier av MPV kan skaffes til veie når de ovenfor nevnte vRNA, cRNA eller vektorer som uttrykker disse RNA'ene replikeres ved det ovenfor nevnte polymerasekomplekset^{16,17,18,19,20,21,22}. For dannelsen av mini replikons eller, et revers genetisk system for å lage en fullengdekopi som omfatter mesteparten eller hele
10 genomet av MPV er det tilstrekkelig å anvende 3'-ende og/eller 5'-ende nukleinsyresekvenser som kan skaffes til veie fra for eksempel APV (Randhawa et al., 1997) eller MPV selv.

Oppfinnelsen tilveiebringer også en vertcelle som omfatter en nukleinsyre eller en
15 vektor ifølge oppfinnelsen. Plasmid eller virale vektorer som inneholder polymerasekomponentene til MPV (antagelig N, P, L og M2, men ikke nødvendigvis begrenset til dem) blir laget i prokaryote celler for ekspresjonen av komponenten i relevante celletyper (bakterier, insektceller, eukaryote celler). Plasmid eller virale vektorer som inneholder fullengde eller partielle kopier av MPV-genomet vil lages i
20 prokaryote celler fra ekspresjonen av virale nukleinsyrer in vitro eller in vivo. De sistnevnte vektorene kan inneholde andre virale sekvenser for dannelsen av kimere virus eller kimere virusproteiner, kan mangle deler av det virale genomet for dannelsen av replikasjonsdefekte virus, og kan inneholde mutasjoner, utsletninger eller innsetninger for dannelsen av dempede virus.

25 Infeksiøse kopier av MPV (det kan være vildtype, dempede, replikasjonsdefekte eller kimere) kan produseres ved ko-ekspresjon av polymerasekomponente ifølge de moderne teknologiene som er beskrevet over.

I tillegg kan eukaryote celler, som transient eller stabilt uttrykker et eller flere fullengde
30 eller partielle MPV-proteiner anvendes. Slike celler kan lages ved transfeksjon (proteiner eller nukleinsyrevektorer), infeksjon (virale vektorer) eller transduksjon (virale vektorer) og kan være nyttige for komplementering av nevnte vildtype, dempede, replikasjonsdefekte eller kimere virus.

35 Et kimert virus kan være for bestemt anvendelse for dannelsen av rekombinante vaksiner som beskytter mot to eller flere virus^{23,24,25}. For eksempel kan det imøteses at

en MPV-virusvektor som uttrykker et eller flere proteiner fra RSV eller en RSV-vektor som uttrykker et eller flere proteiner av MPV vil beskytte individer som er vaksinert med slik vektor mot begge virusinfeksjonene. En lignende behandlingsmåte kan imøteses for PI3 eller andre paramyxovirus. Dempede og replikasjonsdefekte virus kan
 5 være av anvendelse for vaksineringsformål med levende vaksiner som er blitt foreslått for andre virus^{25,26}.

Det beskrives også her et proteinlignende molekyl eller metapneumovirus-spesifikt viralt protein eller et funksjonelt fragment av den som kodes for av en nukleinsyre
 10 ifølge oppfinnelsen. Nyttige proteinlignende molekyler blir for eksempel utledet fra ethvert av genene eller genomiske fragmentene som kan utledes fra et virus ifølge oppfinnelsen. Slike molekyler, eller antigenfragmenter av dem, som tilveiebringes her, er for eksempel nyttige i diagnostiske fremgangsmåter eller kit, og i farmasøytiske sammensetninger slik som subenhetsvaksiner. Spesielt nyttige er F, SH og/eller G-
 15 proteinet eller antigene fragmenter av dem for innslutning som antigen eller subenhet immunogen, men inaktiverte hele virus kan også anvendes. Spesielt nyttige er også de proteinaktige substansene som kodes for av rekombinante nukleinsyrefragmenter som er identifisert for fylogenetiske analyser, men selvfølgelig er de foretrukket som er innen omfanget og målene for ORF'ene som er nyttig i fylogenetiske analyser, spesielt for å
 20 frembringe MPV-spesifikke antistoffer, enten det er in vivo (for eksempel for beskyttende formål eller for å tilveiebringe diagnostiske antistoffer) eller in vitro (for eksempel ved fag displayteknologi eller annen teknikk som er nyttig for å lage syntetiske antistoffer).

25 Her tilveiebringes også antistoffer som er naturlige polyklonale eller monoklonale eller syntetiske (for eksempel (fag) bibliotek-utledede bindingsmolekyler) antistoffer som spesifikk reagerer med et antigen som omfatter et proteinlignende molekyl eller MPV-spesifikk funksjonelt fragment av det ifølge oppfinnelsen. Slike antistoffer er nyttige i en fremgangsmåte for å identifisere et viralt isolat som en MPV som omfatter å la
 30 nevnte virale isolat eller en komponent av det reagere med et antistoff som tilveiebringes her. Dette kan for eksempel oppnås ved å anvende rensset eller ikke rensset MPV eller deler av det (proteiner, peptider) ved å anvende ELISA, RIA, FACS eller lignende formater av antigen deteksjonsanalyser (Current Protocols in Immunology). Alternativt kan infiserte celler eller cellekulturer anvendes for å identifisere virale
 35 antigener ved å anvende klassisk immunfluorescens eller immunhistokjemiske teknikker.

Andre fremgangsmåte for å identifisere et viralt isolat som en MPV omfatter å la nevnte virale isolat eller en komponent av det reagere med en virusspesifikk nukleinsyre ifølge oppfinnelsen, spesielt der hvor nevnte pattedyrvirus omfatter et humant virus.

5

På denne måten beskrives et viralt isolat som er identifiserbart med en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen som et pattedyrvirus som taksonomisk korresponderer til et negativt sense enkelttrådet RNA-virus som er identifiserbart som at det sannsynligvis tilhører slekten Metapneumovirus innen underfamilien Pneumovirinae i familien

10 Paramyxoviridae.

Fremgangsmåten er nyttig i en fremgangsmåte for virologisk diagnostisering av en MPV-infeksjon hos et pattedyr, nevnte fremgangsmåte omfatter for eksempel å bestemme i en prøve fra nevnte pattedyr tilstedeværelsen av et viralt isolat eller
15 komponent av det ved å la nevnte prøve reagere med nukleinsyre eller et antistoff ifølge oppfinnelsen. Eksempler blir ytterligere gitt i den detaljerte beskrivelsen, slik som anvendelsen av PCR (eller andre oppformerings eller hybridiseringsteknikker som er velkjent i fagfeltet) eller anvendelsen av immunfluorescensdeteksjon) eller andre immunologiske teknikker som er kjent i fagfeltet.

20

Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for serologisk å diagnostisere en MPV-infeksjon hos et pattedyr som omfatter å bestemme i en prøve fra nevnte pattedyr, tilstedeværelsen av et antistoff som spesifikt er rettet mot en MPV eller en komponent av den ved å la nevnte prøve reagere med et proteinaktig molekyl eller fragment av det,
25 eller et antigen ifølge oppfinnelsen.

Fremgangsmåter og midler tilveiebrakt her er spesielt nyttig et diagnostisk kitt for å diagnostisere en MPV-infeksjon, enten det er ved virologisk eller serologisk diagnose. Slike kit eller analyser kan for eksempel omfatte et virus, en nukleinsyre, et proteinlignende molekyl eller fragment av det, et antigen og/eller et antistoff ifølge
30 oppfinnelsen. Anvendelse av et virus, en nukleinsyre, et proteinlignende molekyl eller fragment av det, et antigen og/eller et antistoff ifølge oppfinnelsen blir også tilveiebrakt for produksjonen av en farmasøytisk sammensetning, for eksempel for behandlingen eller forebyggingen av MPV-infeksjoner og/eller for behandlingen eller forebyggingen av luftveissykdommer, spesielt hos mennesker. Dempingen av viruset kan oppnås ved
35 etablerte fremgangsmåter utviklet for dette formål, inkludert, men ikke begrenset til anvendelsen av beslektede virus fra andre arter, seriepassasje gjennom laboratoriedyr

eller/og vevs/cellekulturer, setedirigert mutagenese av molekylære kloner og utbytting av gener eller genfragmenter mellom beslektede virus.

- En farmasøytisk sammensetning som omfatter et virus, en nukleinsyre, et
- 5 proteinlignende molekyl eller fragment av det, et antigen og/eller et antistoff ifølge oppfinnelsen kan for eksempel anvendes i en fremgangsmåte for behandlingen eller forebyggingen av en MPV-infeksjon og/eller en luftveissykdom som omfatter å forsyne et individ med en farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen. Dette er mest nyttig når nevnte individ omfatter et menneske, spesielt når nevnte menneske er under 5 år,
- 10 fordi slike mindreårige og unge barn mest sannsynlig infiseres av et humant MPV som tilveiebringes her. Generelt vil akutt-fasepasientene lide av øvre luftveissymptomer som predisponerer for andre luftveis- og andre sykdommer. Også lavere luftveissykdommer kan finne sted, så noe som predisponerer for mer og andre alvorlige tilstander.
- 15 Det beskrives også fremgangsmåter for å skaffe tilveie et antiviralt middel som er nyttig i behandlingen av luftveissykdom som omfatter å etablere en cellekultur eller eksperimentelt dyr som omfatter et virus ifølge oppfinnelsen, og behandle nevnte kultur eller dyr med et kandidat antiviralt middel, og bestemme effekten av nevnte middel på nevnte virus eller dets infeksjon på nevnte dyr eller kultur. Et eksempel på et slikt
- 20 antiviralt middel omfatter et MPV-nøytraliserende antistoff, eller funksjonell komponent av det, som tilveiebringes her, men antivirale midler av annen natur bli også skaffet tilveie. Det tilveiebringes også en anvendelse av et antiviralt middel ifølge oppfinnelsen for tillagingen av en farmasøytisk sammensetning, spesielt for tillagingen av en farmasøytisk sammensetning for behandlingen av luftveissykdom, spesielt når den
- 25 forårsakes av en MPV-infeksjon, og tilveiebringer en farmasøytisk sammensetning som omfatter et antiviralt middel ifølge oppfinnelsen, som er nyttig i en fremgangsmåte for behandlingen eller forebyggingen a en MPV-infeksjon eller luftveissykdom, nevnte fremgangsmåte omfatter å forsyne et individ med en slik farmasøytisk sammensetning.
- 30 Oppfinnelsen blir ytterligere forklart i den detaljerte beskrivelsen uten at den begrenses til det.

Figurtekst

- Figur 1A omfatter Tabell 1: Prosent homologi funnet mellom aminosyresekvensen til
- 35 isolat 00-1 og andre medlemmer av Pneumovirinae. Prosentene (x 100) er gitt for aminossekvensene til N, P, M, F og to RAP-PCR fragmenter i L (8 og 9/10).

Adgangstallene som er anvendt for analysene er beskrevet i material og metodeseleksjonen.

Figur 1B omfatter Tabell 2: Den serologiske prevalensen til MPV i mennesker karakterisert ved aldersgruppe ved å anvende immunfluorescens og virus
5 nøytraliseringsanalyser.

Figur 2: Skjematisk representasjon av genomet til APV med lokalisering og størrelsen av fragmentene skaffet tilveie med RAP-PCR og RT-PCR på virusisolat 00-1.
10 Fragmentene 1-10 ble skaffet tilveie ved å anvende RAP-PCR. Fragment A ble skaffet til veie med en primer i RAP-PCR fragment 1 og 2 og en primer laget basert på oppstilling av leder og de bakerste sekvensene til APV og RSV⁶. Fragment B ble skaffet tilveie ved å anvende primere laget i RAP-PCR fragment 1 og 2 og RAP-PCR fragment 3. Fragment C ble skaffet tilveie med primer laget i RAP-PCR fragment 3 og RAP-PCR
15 fragment 4,5,6 og 7.

For alle fylogenetiske trær (Figurene 3-5) ble DNA-sekvensene oppstilt ved å anvende ClausalW software pakken og maksimums sannsynlighetstrær ble laget ved å anvende DNA-ML software pakken i Phylip 3.5 program ved å anvende 100 programlaster og 3
20 "jumbles"¹⁵. Tidligere publiserte sekvenser som ble anvendt for lagingen av fylogenetiske trær er tilgjengelige fra Genbank under adgangsnummerne: For alle ORF'ene: Hrsv: nc001781; bRSV: NC001989; For F ORF: PVM, D11128; APV-A, D00850; AOV-B, Y14292; APV-C, AF187152; For N ORF: PVM, D10331; APV-A, U39295; APV-B, U39296; APV-C, AF176590; For M ORF: PVM, U66893, APV-A, X58639; APV-B, U37586; APV-C, AF262571; For P ORF: PVM, 09649; APV-A, U22110, APV-C, AF176591. Fylogenetiske analyser for de forskjellige virusisolatene fra MPV ble utført med APV stamme C som fremmedgruppe.

Forkortelser anvendt i figurene: hRSV: humant RSV; bRSV: bovint RSV; PVM:
30 pneumoniavirus hos mus; APV-A,B og C: fugle pneumovirus type A, B og C.

Figur 3:

Sammenligning av N, P, M og F ORF'ene for medlemmer av underfamilien Pneumovirinae og virusisolat 00-1. Oppstillingen viser aminosyresekvensen til de
35 fullstendig N, P, M og F-proteinene og delvis L-proteiner fra virusisolat 00-1. Aminosyrene som er forskjellige mellom isolat 00-1 og de andre virusene er vist.

Identiske aminosyrer er representert med punktum, mellomrom er representert som streker. Tallene korresponderer til aminosyreposisjonene i proteinene. Tilgang som den er anvendt for analysen er beskrevet i material og metodeseksjonen. APV-A, B eller C: fugle pneumovirus type A, B eller C, b- eller hRSV: bovint eller humant luftveis
 5 synsyttisk virus, PVM: lungebetennelsesvirus fra mus. L8: fragment 8 skaffet tilveie med RAP-PCR lokalisert i L, L9/10: konsensus fra fragment 9 og 10 skaffet tilveie med RAP-PCR, lokalisert i L. For P-oppstillingen, var ingen APV-B-sekvens tilgjengelig fra genbanken, for L-oppstillingen var bare bRSV, hRSV og APV-A sekvensene tilgjengelig.

10

Figur 4:

Fylogenetisk analyse av N, P, M og F ORF'ene er medlemmer av slekten pneumoviriner og virusisolat 00-1. Fylogenetiske analyser ble utført på virale sekvenser fra de følgende genene: F (panel A), N (panel B), M (panel C) og P (panel D). De
 15 fylogenetiske trærne er basert på maksimums sannsynlighetsanalyser ved å anvende 100 programlaster og 3 "jumbles". Skalaen som representerer tallene for nukleotidforandringer er vist for hver tre.

Figur 5:

20 Fylogenetisk slektskap av deler av F (panel A), N (panel B), M (panel C) og L (panel D) ORF'ene av ni av de primære MPV-isolatene med APV-C, som relativt er nærmest genetisk. Fylogenetiske trær er basert på maksimum sannsynlighetsanalyser. Skalaen som representerer antallet med nukleotidforandringer er vist for hvert tre.
 Tilgangsnummerne for APV-C: panel A: D00850; panel B: U39295; panel C: X58639
 25 og panel D: U65312.

Figur 6A:

Nukleotid og aminosyresekvensinformasjon fra den 3'-enden av genomet til MPV isolat 00-1. ORF'ene er gitt. N: ORF for nukleoprotein; P: ORF for fosforprotein; M: ORF for matriksprotein; F: ORF for fusjonsprotein; GE: genslutt; GS: genstart.
 30

Figur 6B og C: Nukleotid og aminosyresekvensinformasjon fra fragmentene skaffet tilveie i polymerasegenet (L) av MPV-isolatene 00-1. Posisjoneringen av fragmentene i L er basert på proteinhomologier med APV-C (tilgangsnummer U65312). Det translaterede fragmentet 8 (Fig. 6B) er lokalisert ved aminosyre nr. 8 til 243, og
 35 konsensusen av fragmentene 9 og 10 (Fig. 6C) er lokalisert ved aminosyre nr. 1358 til 1464 av APV-C L ORF'en.

Figur 7:

Genomisk kart av MPV-isolat 00-1. Nukleotidposisjonen til start- og stoppkodonet er indikert under hver ORF. Den doble linjen som krysser L ORF'en indikerer den forkortede representasjonen av L-genet. De tre leserammene under kartet indikerer den primære G ORF'en (nt 6262-6972) og overlappende potensielle sekundære ORF'er.

Figur 8:

Oppstilling av den forutsagte aminosyresekvensen til nukleoproteinet av MPV med de fra andre pneumovirus. De konserverte regionene identifisert av Barr (1991) er representert med firkanter og merket A, B og C. Den konserverte region blant pneumovirus (Li, 1996) er vist med grå skygge. Gapene er representert med streker, punktum indikerer posisjonene av identiske aminosyreresider sammenlignet med MPV.

Figur 9:

Aminosyresekvenssammenligning av fosforproteinet til MPV med de fra andre pneumovirus. Regionen med høy likhet (Ling, 1995) er bokset inn, og den glutamatrike regionen er skyggelagt med grått. Gapene er representert med streker og punktum indikerer at posisjonen til identiske aminosyreresider sammenlignet med MPV.

Figur 10:

Sammenlignet av den utledede aminosyresekvensen for matriksproteinet til MPV med de fra andre pneumovirus. Den konserverte heksapeptidsekvensen (Easton, 1997) er skyggelagt grått. Gapene er representert med linjer og punktum indikerer posisjonen til identiske aminosyreresidier relativ til MPV.

Figur 11:

Oppstilling av den forutsagte aminosyresekvensen av fusjonsproteinet til MPV med de fra andre pneumovirus. De konserverte cysteinresidiene er bokset inn, N-koblede glykosyleringsseter er understreket, kløyvningssetet for F0 er understreket dobbelt. Fusjonspeptider, signalpeptider og membran forankringsdomene er vist med grå skyggelegging. Gapene er representert med linjer og punkter indikerer posisjonen for identiske aminosyrer relativ til MPV.

Figur 12:

Sammenligning av aminosyresekvensen til M2 ORF'ene til MPV med de fra andre pneumovirus. Oppstillingen av M2-1 ORF'ene er vist i panel A, med den konserverte aminoterminalen delen (Collins, 1990; Zamora, 1999) vist med grå skyggelegging. De tre konserverte cysteinresidene er trykket uthevet og indikert med #. Oppstillingen med M2-2 ORF'en er vist i panel B. Gapene er representert med linjer og punktum indikerer posisjonen av identiske aminosyrer relativ til MPV.

Figur 13:

Aminosyresekvensanalyser av SH ORF'en til MPV.

10

(A) Aminosyresekvensen til SH ORF'en til MPV, med serin og treoninresidene skyggelagt grått, cysteinresidene uthevet og den hydrofobe regionen dobbelt understreket. Potensielle N-koblede glykosylerings seter er enkelt understreket. Tallene indikerer posisjonene på de basiske aminosyrene som flankerer det hydrofobe domenet.

15

(B) Oppstilling av hydrofobisitetplott med SH-proteinene til MPV, APV-a og hRSV-B. Prosedyren til Kyte og Doolittle (1982) ble anvendt med et vindu på 17 aminosyrer. Piler indikerer et sterkt hydrofobt domene. Posisjonene innen ORF'en er gitt på X-aksen.

20

Figur 14:

Aminosyresekvensanalyser av G ORF'en til MPV.

(A) Aminosyresekvensen til G ORF'en hos MPV, med serin, treonin og prolinresidene skyggelagt grått, cysteinresidiet er uthevet og den hydrofobe regionen dobbelt understreket. De potensielle N-koblede glykosyleringssetene er enkelt understreket.

25

(B) Oppstilling av hydrofobisitetplott av G-proteinene til MPV, APV-A og hRSV-B. Prosedyren til Kyte og Doolittle (1982) ble anvendt med et vindu på 17 aminosyrer. Piler indikerer den hydrofobe regionen og posisjonene innen ORF'en er gitt på X-aksen.

30

Figur 15:

Sammenligning av aminosyresekvensene til et konservert domene av polymerasegenet til MPV og andre paramyxovirus. Domenet III er vist med de fire konserverte

35

polymerasemotivene (A, B, C, D) i domenet III (Poch 1998, 1999) innbokset. Gapene er representert med streker og punktum indikerer posisjonen av identiske aminosyreresidier relativt til MPV. hPIV3: humant parainfluenzavirus type 3; SV: sendai virus; hPIV-2: humant parainfluenzavirus type 2; NDV: New castle sykdomsvirus; MV: mesling virus; nipah: Nipah virus.

Figur 16:

Fylogenetisk analyse av M2-1 og L ORF'ene til MPV og utvalgte paramyxovirus. M2-1 ORF'en oppstilt med M2-1 ORF'ene til andre medlemmer av slekten Pneumovirinae (A) og L ORF'en ble oppstilt med L ORF'ene til medlemmer av slekten pneumovirinae og valgte andre paramyxovirus som beskrevet i teksten til Figur 15 (B). Fylogenetiske trær ble laget ved maksimum sannsynlighetsanalyser ved å anvende 100 programlaster og 3 "jumbles". Skalaen som representerer antall av nukleotidforandringer er vist for hver tre. Tallene i trærne representerer programlastverdiene basert på konsensusstrær.

Figur 17:

Ikke-kodende sekvenser av hMPV-isolat 00-1.

(A) De ikke-kodende sekvensene mellom ORF'ene og ved de genomiske endestasjonene er vist i den positive betydningen. Fra venstre til høyre, er stoppkodon for indikerte ORF'er vist, etterfulgt av de ikke-kodende sekvensene, genstartsignalene og startkodonet for de indikerte etterfølgende ORF'ene. Tallene indikerer den første posisjon for start og stoppkoden i hMPV-kartet. Sekvensene som viser likhet med publiserte gensluttsignaler er understreket og sekvenser som viser likhet til UAAAAAU/A/C er representert med en linje over sekvensen.

(B) Nukleotidsekvenser til de genomiske endestasjonene til hMPV. De genomiske endestasjoner til hMPV er oppstilt med hverandre og med de fra APV. Understrekende regioner representerer primersekvensene som er anvendt i RT-PCR-analyser som er basert på de 3' og 5' endesekvensene til APV og RSV. Uthevede skråstilte nukleotider er delt av genstartsignal til N-genet. Le: leder, Tr: slutten.

Figur 18:

Sammenligning av to prototypiske hMPV-isolater med APV-A og APV-C; DNA likhetsmatraker for nukleinsyre som koder for de forskjellige virale proteinene.

Figur 19:

- 5 Sammenligning av to prototypiske hMPV-isolater med APV-A og APV-B; protein likhetsmatraker for de forskjellige virale proteinene.

Figur 20:

Aminosyreoppstilling av nukleoproteinet til to prototyper hMPV-isolater.

10

Figur 21:

Aminosyreoppstilling av fosforproteinet til to prototype hMPV-isolater.

Figur 22:

- 15 Aminosyreoppstilling av matriksproteinet til to prototyper hMPV-isolater.

Figur 23:

Aminosyreoppstilling av fusjonsproteinet av to prototyper hMPV-isolater.

- 20 Figur 24:

Aminosyreoppstilling av M2-1-proteinet av to prototyper hMPV-isolater.

Figur 25:

Aminosyreoppstilling av M2-2-proteinene fra to prototype hMPV-isolater.

25

Figur 26:

Aminosyreoppstilling av det korte hydrofobe proteinet fra to prototype hMPV-isolater.

Figur 27:

- 30 Aminosyreoppstilling av festeglykoproteinet fra to prototyper hMPV-isolater.

Figur 28:

Aminosyreoppstilling av den N-terminale delen av polymeraseproteinet for to prototype hMPV-isolater.

35

Figur 29:

Resultater fra RT-PCR-analyser på hals og nesepensler fra 12 marsvin innokulert med ned/00/01 og/eller ned/99/01.

Figur 30A:

- 5 IgG-respons mot ned/00/01 og ned/99/01 for marsvin infisert med ned/00/01 og re-infisert med ned/00/01 (GP'er 8 og 9) eller med ned/99/01 (GPer 10, 11, 12).

Figur 30B:

- 10 IgG-responsen mot ned/00/01 og ned/99/01 for marsvin infisert med ned/99/01 og re-infisert med enten ned/00/01 (GP'er 8 og 9) eller med ned/99/01 (GP'er 10, 11, 12).

Figur 31:

Spesifisitet til ned/00/01 og ned/99/01 ELISA på sera tatt fra marsvin infisert med enten ned/00/01 eller ned/99/01.

15

Figur 32:

Gjennomsnittlig IgG-respons mot ned/00/01 og ned/99/01 ELISA av 3 homologe (00-1/00-1), 2 homologe (99-1/99-1), 2 heterologe (99-1/00-1) og 2 heterologe (00-1/99-1) infiserte marsvin.

20

Figur 33:

Gjennomsnittlig prosent av APV-hemming av hMPV-infiserte marsvin.

Figur 34:

- 25 Virus nøytraliseringstiter av ned/00/01 og ned/99/01 infiserte marsvin mot ned/00/01, ned/99/01 og APV-C.

Figur 35:

- 30 Resultater fra RT-PCR-analyser for halspensler fra cynomologe makaer innokulert (to ganger) med ned/00/01.

Figur 36A (topp to paneler):

- 35 IgA-, IgM- og IgG-respons mot ned/00/01 fra 2 cynomologe makaker (re)infiserte med ned/00/01.

Figur 36B (nedre paneler):

IgG-respons mot APV fra 2 cynomologe makaker infisert med ned/00/01.

Figur 37:

- 5 Sammenligning av anvendelsen av hMPV ELISA og APV hemmings-ELISA for deteksjonen av IgG-antistoffer i humant sera.

Den detaljerte beskrivelsen

Virusisolering og karakterisering

- 10 Fra 1980 til 2000 fant vi 28 uidentifiserte virusisolat fra pasienter med alvorlige luftveissykdommer. Disse 28 uidentifiserte virusisolatene grodde langsomt i tMK-celler, dårlig i VERO-celler og A549-celler og kunne ikke eller bare lite formere seg i MDCK eller kyllingembryonale fibroblastceller. De fleste av disse virusisolatene induiserte CPE etter tre passeringer på tMK-celler mellom dag 10 og 14. CPE'en var
- 15 praktisk talt ikke til å skjelne fra den som ble forårsaket av hRSV eller hPIV i tMK eller andre cellekulturer, karakterisert ved synsytiumdannelse hvoretter cellene viste rask intern ødeleggelse, etterfulgt av løsnung av cellene fra monolaget. Cellene viste vanligvis (noen ganger senere) CPE etter tre passasjer ved virus fra originalt materiell, ved dag 10 til 14 etter innokulering, noe senere enn CPE forårsaket av andre virus slik
- 20 som hRSV eller hPIV.

- Vi anvendte supernatantene fra infiserte tMK-celler for EM-analyse som viste tilstedeværelsen av paramyxoviruslignende viruspartikler i området fra 150 til 600 nanometer, med korte hylsterutskudd i området fra 13 til 17 nanometer. I
- 25 overensstemmelse med de biokjemiske egenskapene for hylstervirus slik som Paramyxoviridae, resulterte standard kloroform eller eterbehandling⁸ i mer enn 10⁴ TCID₅₀ reduksjon av infektiviteten for tMK-celler. Virusinfiserte tMK-cellekultur supernatanter viste ikke hemagglutininaktivitet med kalkun, kylling og marsvin erytrocytter. Under dyrking syntes det som om virusreplikeringen av trypsinavhengig på
 - 30 cellene som ble testet. Disse kombinerte virologiske dataene tillot at det nylig identifiserte viruset ble taksonomisk klassifisert som et medlem av Paramyxoviridae-familien.

- Vi isolerte RNA fra tMK-celler infisert med 15 av de uidentifiserte virusisolatene for
- 35 revers transkripsjon og polymerase kjedereaksjon (RT-PCR) analyser ved å anvende primersett som var spesifikke for Paramyxovirinae³, hPIV 1-4, sendai virus, simian

virus type 5, New-Castle sykdomsvirus, hRSV, meslinger, kusma, Nipah, Hendra, Tupaia og Mepuera virus. RT-PCR-analyser ble utført ved lav stringens for å oppdage potensielle beslektede virus og RNA isolert fra homologe virusbeholdninger ble anvendt som kontroller. Mens tilgjengelige kontroller reagerte positivt med de
 5 respektive virusspesifikke primerne, reagerte de nylig identifiserte virusisolatene ikke med noe primersett, noe som indikerer at viruset ikke var nært beslektet med virusene som ble testet.

Vi anvendte to av de virusinfiserte tMK-cellekultur supernatantene for å innokulere
 10 marsvin og ildere intranasalt. Sera ble samlet for disse dyrene på dag 0, to uker og tre uker etter innokulering. Dyrene viste ingen kliniske symptomer, men alle ble omdannet serologisk som målt i virusnøytraliserings (VN) analyser og indirekte IFA mot homologe virus. Seraene reagerte ikke i indirekte IFA, men noen av de kjente paramyxovirus beskrevet over og med PVM. Deretter screenet vi de så langt
 15 uidentifiserte virusisolatene ved å anvende marsvin og ilder før og etter infeksjonssera, av disse var 28 klart positive ved indirekte IFA med post-infeksjonsseraene, noe som tyder på at de var serologisk tett beslektet eller identiske.

RAP-PCR

20 For å skaffe tilveie sekvensinformasjon for de ukjente virusisolatene, anvendte vi en tilfeldig PCR-oppformeringsstrategi kjent som RAP-PCR¹⁰. Til dette formålet ble tMK-celler infisert med et av virusisolatene (isolat 00-1) så vel som med hPIV-1 som tjente som en kontroll. Etter at begge kulturene viste lignende nivåer av CPE, ble virus i kultursupernatantene rensset på kontinuerlige 20-60% sukkrosegredienter.
 25 Gradientfraksjonene ble innsisert for viruslignende partikler ved EM og RNA ble isolert fra fraksjonen som inneholdt ca. 50% sukkrose, hvor nukleokapsier ble observert. Like mengder RNA isolert fra begge virusfraksjonene ble anvendt til RAP-PCR, etterpå ble prøvene kjørt ved siden av hverandre på en 3% NuSieve agarosegel. 20 differensielt viste bånd som var spesifikke for de uidentifiserte virus ble deretter rensset fra gelen,
 30 klonet i plasmid pCR2.1 og sekvensert med vekt og spesifikke primere. Når vi anvendte disse sekvensene for å lete etter homologier mot sekvenser i Genbank databasen ved å anvende BLAST softwaren (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) viste 10 av 20 fragmenter likheter med APV/TRTV-sekvenser.
 35 Disse 10 fragmentene var lokalisert i genene som koder for nukleoproteinet (N; fragment 1 og 2), matriksproteinet (M; fragment 3), fusjonsproteinet (F; fragment 4, 5,

6, 7) og polymeraseproteinet (L; fragment 8, 9, 10) (Fig. 2). Deretter laget vi PCR-primere for å fullføre sekvensinformasjonen for den 3'-enden av det virale genomet basert på våre RAP PCR-fragmenter så vel som publiserte leder og sluttsekvenser for *Pneumovirinae*⁶. Tre fragmenter ble oppformert, hvorav fragment A dekket den
 5 ekstreme 3'-enden av den N-åpne leserammen (ORF), fragment B dekket fosforprotein (P) ORF'en og fragment C lukket gapet mellom M og F ORF'en (Fig. 2). Sekvensanalyser av disse tre fragmentene viste fraværet av NS1 og NS2 ORF'er ved den ekstreme 3'-enden av det virale genomet og posisjoneringen av F ORF'en umiddelbart tilstøtende til M ORF'en. Denne genomiske organiseringen ligner den til
 10 metapneumoviruset APV, som også er i overensstemmelse med sekvenshomologien. Totalt viste de translaterede sekvensene for N, P, M og F ORF'ene et gjennomsnitt på 30-33% homologi med medlemmer av slekten *Pneumovirus* og 66-68% med medlemmer av slekten *Metapneumovirus*. For SH- og G ORF'ene ble ingen merkbar homologi funnet med medlemmer av noen av slektene. Aminosyrehomologiene funnet for M viste
 15 ca. 40% homologi med hRSV og 88% med APV-C, dets nærmeste genetiske slektning, som for eksempel kan utledes ved å sammenligne aminosyresekvensen i Figur 3 med aminosyresekvensen av de respektive N-proteinene til andre virus. Aminosyresekvensen for P viste ca. 25% homologi med hRSV og ca. 66-68% med APV-C, M viste ca. 36-39% med hRSV og ca. 87-89% med APV-C, F viste ca. 40% homologi med hRSV og
 20 ca. 81% med APV-C, M2-1 viste ca. 34-36% homologi med *pneumovirus* og 84-86% med APV-C, M2-2 viste 15-17% homologi med *pneumovirus* og 56% med APV-C og fragmentene skaffet tilveie i L viste et gjennomsnitt på 44% med *pneumovirus* og 64% med APV-C.

25 *Fylogeni*

Selv om BLAST-søk ved å anvende nukleotidsekvenser skaffet tilveie fra det uidentifiserte virusisolatet viste homologier primært medlemmer av *Pneumovirinae*, viste homologier basert på proteinsekvenser noe likheter med andre paramyxovirus også (data ikke vist). Som en indikasjon på forholdet mellom det nylig identifiserte
 30 virusisolatet og medlemmer av *Pneumovirinae*, ble fylogenetiske trær konstruert basert på N, P, M og F ORF'ene til disse virus. I alle fire fylogenetiske trær var det nylig identifiserte virusisolatet nærmest beslektet med APV (Fig. 4). Fra de fire serotypene av APV som er blitt beskrevet¹¹, viste APV-serotype C, metapneumoviruset funnet primært i fugler i USA, den nærmeste likheten med det nylig identifiserte viruset. Det
 35 bør imidlertid nevnes at bare delvis sekvensinformasjon for APV serotype D er tilgjengelig.

For å bestemme slektskapet av våre forskjellige nyidentifiserte virusisolater, konstruerte ved fylogenetiske trær basert på sekvensinformasjon skaffet tilveie fra åtte til ni isolater (8 for F, 9 for N, M og L). Til dette formålet anvendte vi RT-PCR med primere laget for
 5 å oppformere korte fragmenter i N, M, F og L ORF'ene som deretter ble sekvensert direkte. De ni virusisolatene som tidligere ble funnet å være beslektet serologisk (se over) ble også funnet å være nært beslektet genetisk. Faktisk var alle ni isolatene nærmere beslektet til hverandre enn til APV. Selv om sekvensinformasjonen som ble anvendt til disse fylogenetiske trærne var begrenset, synes det som om de ni isolatene
 10 kan deles inn i to grupper med isolat 94-1, 99-1 og 99-2 sammenknyttet i en gruppe og de andre seks isolatene (94-2; 93-1; 93-2; 93-3; 93-4; 00-1) i den andre (Fig. 5).

Serologisk prevalens

For å studere den serologiske prevalensen til dette virus i den humane populasjonen, testet vi sera fra mennesker i forskjellige alderskategorier ved indirekte IFA ved å
 15 anvende tMK-celler infisert med et av de uidentifiserte virusisolatene. Denne analysen avslørte at 25% av barna mellom 6 og 12 måneder hadde antistoffer mot viruset, og ved en alder av 5 var nesten 100% av barna seropositive. Totalt ble 56 serumprøver testet ved indirekte IFA testet ved VN-analyse. For 51 (91%) av prøvene falt resultatene av
 20 VN-analysen (titer >8) med resultatene som ble skaffet tilveie med indirekte IFA (titer >32). Fire prøver som ble funnet positive i IFA var negative med VN-test (titer < 8) mens et serum reagerte negativt i IFA (titer < 32) og positivt i VN-testen (titer 16) (tabell 2).

25 IFA utført med 72 sera tatt fra mennesker i 1958 (alder i området fra 8-99 år)^{12,27} viste en 100% serologisk prevalens, noe som indikerer at viruset har vært i sirkulasjon i den menneskelige populasjonen i mer enn 40 år. I tillegg ble en rekke av disse seraene anvendt i VN-analyser for å bekrefte IFA-dataene (tabell 2).

30 Genetiske analyser på N, M, P og F-genene viste at MPV har høyere sekvenshomologi med den nylig foreslåtte slekten Metapneumovirinae (gjennomsnitt på 63%) sammenlignet med slekten Pneumovirinae (gjennomsnitt på 30%) og demonstrerer dermed en genomisk organisering lik og lignende den hos APV/TRTV. I motsetning til den genomiske organiseringen til RSV'ene (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'),
 35 mangler metapneumovirus NS1 og NS2 gener og har en forskjellig posisjonering av genene mellom M og L (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'). Mangelen av ORF'er mellom

M- og F-genene i våre virusisolater og mangelen av NS1 og NS2 tilstøtende til N, og den høye aminosyresekvens homologien funnet med APV er grunner for å foreslå klassifiseringen av MVP isolert fra mennesker som et første medlem av Metapneumovirus slekten hos pattedyr, spesielt med human opprinnelse.

5

Fylogenetisk analyse viste at 9 MPV-isolater som det ble skaffet sekvensinformasjon tilveie fra er nært beslektet. Selv om sekvensinformasjonen var begrenset, var de faktisk nærmere beslektet til hverandre enn til noen av fugle metapneumovirusene. Av de fire serotypene av APV som er blitt beskrevet, var serotype C nærmest beslektet med MPV basert på N-, P-, M- og F-genene. Det bør imidlertid legges merke til at for serotype D var bare delvis sekvenser for F-genet tilgjengelig fra Genbanken og for serotype B var bare M, N og F-sekvenser tilgjengelige. Våre MPV-isolater dannet to klynger i fylogenetiske trær. For både hRSV og APV har forskjellige genetiske og serologiske undertyper blitt beskrevet. Om de to genetiske klyngene til MPV-isolatene representerer serologiske undergrupper som også er funksjonelt forskjellige er for tiden ukjent. Våre serologiske kartlegginger viste at MPV er et vanlig humant patogen. Den repeterte isoleringen av dette virus fra kliniske prøver fra barn med alvorlig RTI indikerer at det kliniske og økonomiske omfanget av MPV kan være høyt. Nye diagnostiske analyser basert på virusdeteksjon og serologi vil tillate en mer detaljert analyse av forekomsten og det kliniske og økonomiske omfanget av dette virale patogen.

De svake forskjellene mellom IFA- og VN-resultatene (5 prøver) kan skyldes det faktum at i IFA ble bare IgG-serumantistoffer detektert mens VN-analysen detekterer både klasser og underklasser av antistoffer eller forskjeller kan skyldes forskjellene i sensitivitet mellom begge analysene. For IFA blir en avskjæringsverdi på 16 anvendt, mens for VN blir en avskjæringsverdi på 8 anvendt.

På den annen side kan forskjeller mellom IFA i forhold til VN-analyse også indikere mulige forskjeller mellom forskjellige serotyper i den nylig identifiserte virus. Fordi MPV ser ut til å være nærmere beslektet med APV, spekulerte vi på om det humane virus kan ha sin opprinnelse fra fugler. Analyser av serumprøver tatt fra mennesker i 1958 viste et MPV har blitt spredt i den humane populasjon i mer enn 40 år, noe som indikerer på at en tentativ sonosebegivenhet må ha funnet sted lenge før 1958.

35

Materialer og metoder

Prøveinnsamling

Over de siste tiårene har vårt laboratorium samlet nasofaryngale aspirater fra barn som lider av RTI, som rutinemessig blir testet for tilstedeværelse av virus. Alle

5 nasofaryngale aspirater blir testet ved direkte immunfluorescensanalyser (DIF) ved å anvende fluorescensmerkede antistoffer mot influensavirustype A og B, hRSV og humant fra influensavirus (hPIV) typene 1 til 3. De nasofaryngale aspiratene blir også behandlet for virusisolering ved å anvende hurtige "shell vial" teknikker¹⁴ på forskjellige cellelinjer inkludert VERO-celler, tertiær cynomolge apenrye (tMK) celler,

10 humane endoteliale lunge (HEL) celler og marbin dock nyreceller. Prøver som viste cytotoksiske effekter (CPE) etter to til tre passasjer, og som var negative i DIF ble bestet ved indirekte immunfluorescensanalyser (IFA) ved å anvende virusspesifikke antistoffer mot influensavirus type A, B og C, hRSV-typene A og B, meslingvirus, kusmavirus, humant parainfluensavirus (hPIV) typene 1 til 4, sendai virus, simian virus type 5 og

15 New-Castle sykdomsvirus. Selv om det etiologiske middelet for mange tilfeller kunne identifiseres, var noen prøver negative for alle virus som ble testet.

Direkte immunfluorescensanalyse (DIF)

Nasofaryngale aspiratprøver fra pasienter som lider av RTI ble anvendt for DIF og virusisolering som beskrevet^{14,15}. Prøvene ble oppbevart ved -70°C. I korthet så ble nasofaryngale aspirater fortynnet med 5 ml Dulbecco MEM (BioWhittaker, Walkersville, MD) og blandet godt på en vortex mikser i 1 minutt. Suspensjonen ble så sentrifugert i 10 minutter ved 840 x g. Sedimentet ble spredt ut på en multispot glassplate (Nutacon, Leimuiden, The Netherlands), supernatanten ble anvendt til

25 virusisolering. Etter tørking ble cellene fiksert i aceton i 1 minutt ved romtemperatur. Etter vasking ble glassplaten innkubert i 15 minutter ved 37°C med kommersielt tilgjengelige FITC-merket virusspesifikke antisera slik som influenza A og B, hRSV og hPIV 1 til 3 (Dako, Glostrup, Danmark). Etter tre vaskinger i PBS og 1 i rennende vann, ble glassplatene inkludert i en glyserol/PBS-løsning (Citifluor, UKC, Canterbury, UK)

30 og dekket. Glassplatene ble analysert ved å anvende et Axioskop fluorescensmikroskop (Carl Zeiss B.V., Weesp, Nederland).

Virusisolering

For virusisolering ble tMK-celler (RIVM, Bilthoven, Nederland) dyrket i 24 brønners

35 plater som inneholder glassplater (Costar, Cambridge, UK) med mediet beskrevet under supplementert med 10% fetalt bovint serum (BioWhittaker, Vervier, Belgia). Før

innokuleringen ble platene vasket med PBS og supplementert med Eagles MEM med Hank's salt (ICN, Costa mesa, CA) hvorav en halv liter av dette ble supplementert med 0,26 g NaHCO_3 , 0,025 M Hepes (Biowhittaker), 2 mM L-GLUTAMIN (Biowhittaker), 100 enheter penicillin, 100 μg streptomycin (Biowhittaker), 0,5 g laktalbumin (Sigma-
 5 Aldrich, Zwijndrecht, Nederland), 1,0 g D-glukose (merck, Amsterdam, Nederland) og 0,2% trypsin (Life Technologies, Bethesda, MD). Platene ble innokulert med supernatant fra de nasofaryngale aspiratprøvene, 0,2 ml per brønn i triplikat, etterfulgt av sentrifugering ved 840 x g i 1 time. Etter innokulering ble platen innkubert ved 37°C i maksimum 14 dager og mediet ble byttet en gang i uken og kulturene ble sjekket
 10 daglig for CPE. Etter 14 dager ble cellene skrapet fra den andre passeringen og innkubert 14 dager. Dette trinnet ble repetert for den tredje passasjen. Glassplatene ble anvendt for å demonstrere tilstedeværelsen av viruset ved indirekte IFA som beskrevet under.

15 *Immunisering av dyr*

Ilder- og marsvinspesifikke antisera for det nylig opptatte virus ble laget ved eksperimentell intra nasal infeksjon av to spesifikt patogenfrie ildere og to marsvin, som ble holdt i separate trykk handske esker. To til tre uker senere ble alle dyrene tappet for blod ved punktering av hjertet, og seraene deres ble anvendt som referansesera. Seraene
 20 ble testet for alle tidligere beskrevne virus med indirekte IFA som beskrevet under.

Antigendeteksjon indirekte IFA

Vi utførte indirekte IFA på glassplater som inneholdt infisert tMK-celler. Etter vasking med PBS ble glassplatene innkubert i 30 minutter ved 37°C med virusspesifikke
 25 anticeller. De anvendte monoklonale antistoffer i DIF mot influensa A, B og C, hPIV-type 1 til 3 og hRSV som beskrevet over. For hPIV type 4, kusmavirus, meslingvirus, sendai virus, simian virus type 5, New-Castle sykdomsvirus polyklonale antistoffer (RIVM) og ilder og marsvin referansesera ble anvendt. Etter tre vask med PBS og en vask med rennende vann ble glassplatene farget med et sekundært antistoff rettet mot
 30 seraene anvendt i den første innkuberingen. Sekundære antistoffer for de polyklonale antiseraene var geite-anti-ilder (KPL, Guildford, UK, 40 ganger fortynnet), muse-anti-kanin (Dako, Glostrup, Danmark, 20 ganger fortynnet), kanin-anti-kylling (KPL, 20 ganger fortynnet) og muse-anti-marsvin (Dako, 20 ganger fortynnet). Glassplatene ble behandlet som beskrevet for DIF.

Deteksjon av antistoffer i mennesker ved indirekte IFA

For deteksjon av virusspesifikke antistoffer ble infiserte tMK celler fiksert med kald acetone på objektglass, vasket med PBS og farget med serumprøver ved en 1:16 fortynning. Deretter ble prøvene farget med FITC fargede kanin-anti-humane antistoffer
 5 80 ganger fortynnet i PBS (Dako). Glassplatene ble behandlet som beskrevet over.

Viruskultur av MPV

Subkonfluente monolag av tMK-celler i medium som beskrevet over ble innokulert med supernatant fra prøver som viste CPE etter to eller tre passasjer i fire brønners plater.
 10 Kulturene ble sjekket for CPE daglig og mediene ble byttet en gang i uken. Fordi CPE var forskjellig for hvert isolat, ble alle kulturene testet ved dag 12 til dag 14 med indirekte IFA ved å anvende ilder antistoffer mot det nye virusisolatet. Positive kulturer ble frosset og tint tre ganger, hvorefter supernatantene ble klarnet ved lav hastighets sentrifugering, allikvotert og oppbevart frosne ved -70°C. De 50% vevskultur infeksjose
 15 dosene (TCID₅₀) av virus i kultur supernatantene ble bestemt som beskrevet¹⁶.

Virus nøytraliseringsanalyse

VN-analyser ble utført ved serie to gangers fortynninger på humane og dyresera som startet ved en 8-gangers fortynning. Fortynnede sera ble innkubert i en time med 100
 20 TCID₅₀ med virus før innokulering av tMK-celler som var grodd i 96-brønners plater. Deretter ble platene sentrifugert ved 840 x g. Mediene ble byttet etter tre og seks dager og IFA ble utført med ilder antistoffer mot MPV 8 dager etter innokulering. VN-titere ble definert som den laveste fortynning av serumprøven som resulterte i negativ IFA og hemming av CPE i cellekulturer.

25

Viruskarakterisering

Hemagglutininanalyser og kloroform sensitivitetstester ble utført som beskrevet^{8,14}. For EM-analyser ble virus konsentrert fra infiserte cellekultur supernatanter i en mikrosentrifuge ved 4°C ved 17 000 x g, hvorefter pelleten ble resuspendert i PBS og
 30 innsisert ved negativ kontrast EM. For RAP-PCR ble virus konsentrert fra infiserte tMK-cellesupernatanter ved ultrasentrifugering på en 60% sukkrosepute (2 timer ved 150 000 x g, 4°C). Den 60% sukkrose mellomfasen ble deretter fortynnet med PBS og lagt på toppen av en 20-60% kontinuerlig sukkrosegradient som ble sentrifugert i 16 timer ved 275 000 x g ved 4°C. Sukkrose gradientfraksjonene ble innsisert for
 35 tilstedeværelsen av viruslignende partikler med EM og polyakrylamid gelelektroforese

etterfulgt av sølvfarging. De ca. 50% sukkrorefraksjonene som viste seg å inneholde nukleokapsidene ble anvendt til RNA-isolering og RAP-PCR.

RNA-isolering

- 5 RNA ble isolert fra supernatanten til de infiserte cellekulturene eller sukkrose gradientfraksjonene ved å anvende High Pure RNA Isolation Kit ifølge instruksjonene fra produsenten (Roche Diagnostics, Almere, Nederland).

RT-PCR

- 10 Virusspesifikke oligonukleotidsekvenser for RT-PCR-analyser på kjente paramyxovirus er beskrevet i tillegg 1. En en-trinns RT-PCR ble utført i 50 µl reaksjoner som inneholdt 50 mM Tris.HCl pH 8,5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM ditiotreitol, 200 µM hver av dNTP, 10 enheter rekombinant RNAsin (Promega, Leiden, Nederland), 10 enheter AMV RT (Promega, Leiden, Nederland), 5 enheter Amplitaq Gold DNA-polymerase
15 (PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, Nederland) og 5 µl RNA. Cykliske betingelser var 45 minutter ved 42°C og 7 minutter ved 95°C en gang, 1 minutt ved 95°C, 2 minutter ved 42°C og 3 minutter ved 72°C repetert 40 ganger og 10 minutter ved 72°C en gang.

RAP-PCR

- 20 RAP-PCR ble utført essensielt som beskrevet¹⁰. Oligonukleotidsekvensene er beskrevet i tillegg 2. For RT-reaksjon, ble 2 µl RNA anvendt i en 10 µl reaksjon som inneholdt 10 ng/µl oligonukleotid, 10 mM ditiotreitol, 500 µM hver av dNTP, 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl og 3 mM MgCl₂. Reaksjonsblandingen ble innkubert i 5 minutter ved
25 70°C og 5 minutter ved 37°C, deretter ble 200 enheter superskript RT-enzym (LifeTechnologies) tilsatt. Innkuberingen ved 37°C fortsatte i 55 minutter og reaksjonen ble stoppet ved en 5 minutters innkubering ved 72°C. RT-blandingen ble fortynnet for å gi en 50 µl PCR-reaksjon som inneholdt 8 ng/µl oligonukleotid, 300 µM hver av dNTP, 15 mM Tris-HCl pH 8,3, 65 mM KCl, 3,0 Mm MgCl₂ og 5 enheter Taq DNA
30 polymerase (PE Biosystems). Cykliske betingelsene var 5 minutter ved 94°C, 5 minutter ved 40°C og 1 minutt ved 72°C en gang, etterfulgt av 1 minutt ved 94°C, 2 minutter ved 56°C og 1 minutt ved 72°C repetert 40 ganger og 5 minutter ved 72°C en gang. Etter RAP-PCR, ble 15 µl av RT-PCR-produktene kjørt side om side på en 3% NuSieve agarosegel (FMC BioProducts, Heerhugowaard, Nederland). Differensielt viste
35 fragmenter som var spesifikke for MPV ble renset fra gelen med Qiaquick Gel

Extraction kit (Qiagen, Leusden, Nederland) og klonet inn i pCR.2.1 vektor (Invitrogen, Groningen, Nederland) ifølge produsentens instruksjoner.

Sekvensanalyse

5 RAP-PCR produktene klonet inn i vektor pCR.2.1 (Invitrogen) ble sekvensert med M13-spesifikke oligonukleotider. DNA-fragmentene skaffet tilveie med RT-PCR ble rensset fra agarose gel ved å anvende Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Leusden, Nederland), og sekvensert direkte med de samme oligonukleotidene som ble anvendt for PCR. Sekvensanalysene ble utført ved å anvende et Dyanamic ET terminator
10 sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, Nederland) og ABI 373 automatisk DNA sekvensmaskin (PE Biosystem). Alle teknikkene ble utført ifølge produsentens instruksjoner.

Tillaging av genomiske fragmenter fra MPV ved RT-PCR

15 For å lage PCR-fragmenter som dekker gapene A, B og C mellom RAP-PCR fragmentene (Fig. 2) anvendte vi RT-PCR-analyser som beskrevet før på RNA isolert fra virusisolat 00-1. De følgende primerne ble anvendt:

For fragment A: TR1 laget i lederen: (5'-
20 AAAGAATTCACGAGAAAAAAACGC-3') og N1 laget i den 3'-enden av RAP-PCR fragmentene skaffet tilveie i N (5'-CTGTGGTCTCTAGTCCCACTTC-3')

For fragment B: N2 laget fra den 5'-enden av RAP-PCR fragmentene skaffet til
25 veie i N: (5'-CATGCAAGCTTATGGGGC-3') og M1 laget fra den 3'-enden av RAP-PCR fragmentene skaffet tilveie i M: (5'-CAGAGTGGTTATTGTCAGGGT-3').

For fragment C: M2 laget fra den 5'-enden til RAP-PCR-fragmentene skaffet
30 tilveie i M: (5'-GTAGAACTAGGAGCATATG-3') og F1 laget fra den 3'-enden av RAP-PCR fragmentene skaffet tilveie i F: (5'-TCCCAATGTAGATACTGCTTC-3').

Fragmentene ble rensset fra gelen, klonet og sekvensert som beskrevet før.

35

RT-PCR for å diagnostisere MPV.

For oppformeringen og sekvenseringen av deler av N, M, f og L ORF'ene fra ni av MPV-isolatene, anvendte vi henholdsvis N3 (5'-GCACTCAAGAGATACCCTAG-3') og N4 (5'-AGACTTTCTGCTTTGCTGCCTG-3'), som omformerte et 151
 5 nukleotidfragment, M3 (5'-CCCTGACAATAACCACTCTG-3') og M4 (5'-GCCAACTGATTTGGCTGAGCTC-3') som omformerte et 252 nukleotidfragment, F7 (5'-TGCACTATCTCCTCTTGGGGCTTTG-3') og F8 (5'-TCAAAGCTGCTTGACACTGGCC-3') som omformerte et 221 nukleotidfragment og L6 (5'-CATGCCCCACTATAAAAGGTCAG-3') og L7 (5'-
 10 CACCCAGTCTTTCTTGAAA-3') som omformerte et 173 nukleotidfragment. RT-PCR, gelrensing og direkte sekvensering ble utført som beskrevet over. Videre så var prober som ble anvendt:

Probe anvendt i M: 5'-TGC TTG TAC TTC CCA AAG-3'
 15 Probe anvendt i N: 5'-TAT TTG AAC AAA AAG TGT-3'
 Probe anvendt i L: 5'-TGGTGTGGGATATTAACAG-3'

Fylogenetiske analyser

For alle fylogenetiske trær så ble DNA-sekvenser oppstilt ved å anvende ClausalW
 20 software pakken og maksimum sannsynlighets trær ble laget ved å anvende DNA-ML software pakken fra Phylip 3.5 programmet ved å anvende 100 programlaster og 3 jumles¹⁵. Tidligere publiserte sekvenser som ble anvendt for å lage fylogenetiske trær er tilgjengelig fra Genbank under adgangsnummere: For alle ORF'ene: hRSV: NC001781; bRSV. NC001989; For F ORF'en: PVM, D11128; APV-A, D00850; APV-B, Y14292;
 25 APV-C, AF187152; For N ORF'en: PVM, D10331; APV-A, U39295; APV-B, U39296; APV-C, AF176590; For M ORF'en: PMV, U66893; APV-A, X58639; APB-B, U37586; APV-C, AF262571; For P ORF'en: PVM, 09649; APV-A, U22110, APV-C, AF176591. Fylogenetiske analyser for de ni forskjellige virusisolatene for MPV ble utført med APV-stamme C som fremmedgruppe.

30

Forkortelser anvendt i figurene: hRSV, humant RSV; bRSV: bovint RSV; PVM: pneumonia virus fra mus; APV-A, B og C: fugle pneumovirus type A, B og C.

Eksempler på fremgangsmåter for å identifisere MPV

35 *Prøveinnsamling*

For å finne virusisolater skulle nasofaryngale aspirater, hals- og nasale pensler, skyllinger fra alveolare bronkia, helst fra pattedyr slik som mennesker, rovdyr (hunder, katter, "mustelliter", seler osv.), hester, ruminanter (storfe, sauer, geiter osv.), griser, kaniner, fugler (fjærfe, struts osv.) undersøkt. Fra fugler kan kloakkpensler og drypp
 5 også undersøkes. Sera bør samles for immunologiske analyser slik som ELISA og virusnøytraliseringsanalyser.

Innsamlede virusprøver ble fortynnet med 5 ml Dulbecco MEM medium (BioWhittaker, Walkersville, MD) og nøye blandet på en vortex-blander i 1 minutt. Suspensjonen ble så sentrifugert i 10 minutter ved 840 x g. Sedimentet ble spredt på en multispot glassplate
 10 (Nutacon, Leimuiden, Nederland) for immunfluorescensteknikker, og supernatanten ble anvendt for virusisolering.

Virusisolering

For virusisolering ble tMK-celler (RIVM, Bilthoven, Nederland) dyrket i 24 brønners
 15 plater som inneholdt dekkglass (Costar, Cambridge, UK) med mediet beskrevet under supplementert med 10% fetalt bovint serum (BioWhittaker, Vervier, Belgia). Før innokulering ble flatene vasket med PBS og supplert med Eagle's MEM med Hanks' salt (ICN, Costa mesa, CA) supplementert med 0,52/liter gram NaHCO_3 , 0,025 M Hepes (Biowhittaker), 2 mM L-glutamin (Biowhittaker), 200 enheter/liter penicillin,
 20 200 µg/liter streptomycin (Biowhittaker), 1 gram/liter laktalbumin (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Nederland), 2,0 gram/liter D-glukose (Merck, Amsterdam, Nederland), 10 gram/liter pepton (Oksoïd, Haarlem, Nederland) og 0,02% trypsin (Life Technologies, Bethesda, MD). Platene ble innokulert med supernatant fra de nasofaryngale aspiratprøvene. 0,2 ml per brønn i triplikat, etterfulgt av sentrifugering av 840 x g i 1
 25 time. Etter innokulering ble platen innkubert ved 37°C i maksimum 14 dager med byttet av medium 1 gang i uken og kulturene ble sjekket daglig for CPE. Etter 14 dager ble cellene skrapet av fra den andre passeringen og innkubert i enda 14 dager. Dette trinnet ble repetert for den tredje passasjen. Objektglassene ble anvendt for å demonstrere tilstedeværelsen av virus ved indirekte IFA som beskrevet under.

30

CPE ble generelt observert etter den tredje passasjen, ved dag 8 til 14 avhengig av isolatet. CPE var så å si ikke til å skille fra den som ble forårsaket av hRSV eller hPIV i tMK eller andre cellekulturer. Imidlertid, induserer hRSV CPE som starter rundt dag 4. CPE ble karakterisert ved dannelse av synsytia hvoretter cellene viste hurtig intern
 35 ødeleggelse, etterfulgt av at cellene løsnet fra monolaget. For noen isolater var CPE

vanskelig å observere, og IFA ble anvendt for å bekrefte tilstedeværelsen av viruset i disse kulturene.

Viruskultur av MPV

5 Sub-konfluente monolag av tMK-celler i media som beskrevet ovenfor ble innokulert med supernatanter fra prøver som viste CPE etter to eller tre passasjer i 24-brønners plater. Kulturene ble sjekket for CPE daglig og mediet ble byttet en gang i uken. Fordi CPE var forskjellig fra hvert isolat, ble alle kulturene testet på dag 12 til dag 14 med indirekte IFA ved å anvende ilder antistoffer mot det nye virusisolatet. Positive kulturer
10 var frosne og tint 3 ganger, hvorefter supernatantene ble klarnet ved lav hastighets sentrifugering, alikvotert og oppbevart frosne ved -70°C. De 50% vevskulturinfeksiøse dosene (TCID₅₀) til virus i kultursupernatantene ble bestemt ved å følge etablerte teknikker som anvendes i feltet¹⁶.

15 *Virus karakterisering*

Hemagglutininanalyser og kloroform sensitivitetstester ble utført ved å følge godt etablerte og beskrevne teknikker anvendt i feltet¹⁴. For EM-analyser ble virus konsentrert fra infiserte cellekultur supernatanter i en mikrosentrifuge ved 4°C ved 17 000 x g, hvorefter pelleten ble resuspendert i PBS og inspisert med negativ kontrast
20 EM.

Antigendeteksjon ved indirekte IFA

Innsamlede prøver ble prosessert som beskrevet og sediment fra prøvene ble spredt på en multispot glassplate. Etter tørking ble cellene fiksert i aceton i 1 minutt ved
25 romtemperatur.

Alternativt ble virus dyrket på tMK-celler i 24 brønners plater som inneholdt dekkglass. Disse dekkglassene ble vasket med PBS og fiksert i aceton i 1 minutt ved
romtemperatur.

30

Etter vasking med PBS ble glassplatene innkubert i 30 minutter ved 37°C med polyklonale antistoffer ved en fortykning på 1:50 til 1:100 i PBS. Vi anvendte immuniserte ildere og marsvin for å skaffe tilveie polyklonale antistoffer, men disse antistoffene kan lages i forskjellige dyr, og arbeidsfortynningen til det polyklonale
35 antistoffet kan variere for hver immunisering. Etter 3 vasker med PBS og bare en vask med rennende vann, ble glassplatene innkubert ved 37°C i 30 minutter med FITC-

merkede geite-anti-ilder-antistoffer (KPL, Guildford, UK, 40 ganger fortynnet). Etter tre vaskinger i PBS og en i rennende vann, ble glassplatene inkludert i en glyserol/PBS løsning (Citifluor, UKC, Canterbury, UK) og tildekket. Glassplatene ble analysert ved å bruke et Azioskop fluorescens mikroskop (Carl Zeiss B.V., Weesp, Nederland).

5

Deteksjon av antistoffer hos mennesker, pattedyr, ruminanter eller andre dyr ved indirekte IFA

For deteksjon av virusspesifikke antistoffer ble tMK-celler infisert med MPV fiksert med aceton på dekkglass (som beskrevet over), vasket med PBS og innkubert 30
10 minutter ved 37°C med serumprøver i en 1:16 fortynning. Etter to vask med PBS og en med rennende vann, ble glassplaten innkubert i 30 minutter ved 37°C med FITC-merkede sekundære antistoffer mot artene som ble anvendt (Dako). Glassplatene ble prosessert som beskrevet over.

15 Antistoffer kan merkes direkte med en fluorescerende farge som vil resultere i en direkte immun fluorescensanalyse. FITC kan erstattes med enhver fluorescerende farge.

Dyreimmunisering

Ilder og marsvinspesifikke antisera for det nylig oppdagede viruset ble laget ved
20 eksperimentell intranasal infeksjon av to spesifikke patogenfrie ildere og to marsvin, som ble oppbevart i separate hattebokser som var satt under trykk. To til tre uker senere ble dyrene tappet blod av ved å punktere hjertet, og seraene deres ble anvendt som referansesera. Seraene var testet for alle tidligere beskrevne virus med indirekte IFA som beskrevet under. Andre dyrearter er også passende til lagingen av spesifikke
25 antistoff preparasjoner og andre antigen preparasjoner kan anvendes.

Virus nøytraliseringsanalyse (VN-analyse)

VN-analyser ble utført med serie to gangers fortynninger av humane- og dyresera ved å starte med en 8-gangers fortynning. Fortynnede sera ble innkubert 1 time med 100
30 TCID₅₀ av virus før innokuleringen av tMK-celler som var dyrket i 96-brønners plater, hvoretter platene ble sentrifugert ved 840 x g. Det samme kulturmediet som beskrevet over ble anvendt. Mediene ble byttet etter 3 og 6 dager, og etter 8 dager ble IFA utført (se over). VN-titeret ble definert som den laveste fortynningen av serumprøven som resulterte i negativ IFA og hemming av CPE i cellekulturer.

35

RNA-isolering

RNA ble isolert fra supernatanten fra infiserte cellekulturer eller
sukrosegradientfraksjoner ved å anvende et High Pure RNA Isolation Kit ifølge
produsentens instruksjoner (Riche Diagnostics, Almere, Nederland). RNA kan også
5 isoleres ved å følge andre prosedyrer som er kjent i feltet (Current Protocols in
Molecular Biology).

RT-PCR

En et-trinns RT-PCR ble utført i 50 µl reaksjoner som inneholdt 50 mM Tris HCl pH
10 8,5, 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM ditiotritol, 200 µM hver av DNTP, 10 enheter
rekombinant RNasin (Promega, Leiden, Nederland), 10 enheter AMV RT (Promega,
Leiden, Nederland), 5 enheter Amplitaq Gold DNA polymerase (PE Biosystems,
Nieuwerkerk aan de IJssel, Nederland) og 5 µl RNA. Syklusbetingelsene var 45
minutter ved 42°C og 7 min ved 95°C en gang, 1 min ved 95°C, 2 min ved 42°C og 3
15 min ved 72°C repetert 40 ganger og 10 min ved 72°C en gang.

Primere anvendt til diagnostisk PCR:

I nukleoproteinet: N3 (5'-GCACTCAAGAGATACCCTAG-3') og N4 (5'-
20 AGACTTTCTGCTTTGCTGCCTG-3'), som amplifiserte et 151
nukleotidfragment.

I matriksproteinet: M3 (5'-CCCT6GACAATAACCACTCTG-3') og M4 (5'-
GCCAACTGATTTGGCTGAGCTC-3') som amplifiserte et 252
25 nukleotidfragment.

I polymeraseproteinet: L6 (5'-CATGCCCCACTATAAAAGGTCAG-3') og L7
(5'-CACCCCAGTCTTTCTTGAAA-3') som amplifiserte et 173
nukleotidfragment.

30

Andre primere kan lages basert på MPV-sekvenser, og forskjellige buffere og
analysebetingelser kan anvendes for spesifikke formål.

Sekvensanalyse

35 Sekvensanalyser ble utført ved å anvende et Dyenamic ET terminator sequencing kit
(Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, Nederland) og en ABI 373 automatisk

DNA-sekvensator (PE Biosystem). Alle teknikkene ble utført ifølge produsentens instruksjoner. PCR-fragmenter ble sekvensert direkte med de samme oligonukleotidene som ble anvendt for PCR, eller fragmentene ble rensset fra gelen med Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, Leusden, Nederland) og klonet inn i pCR2.1 vektor (Invitrogen, Groningen, Nederland) ifølge produsentens instruksjoner og deretter sekvensert med M13-spesifikke oligonukleotider.

Oligonukleotider anvendt for å analysere den 3'-enden av genomet (i fravær av NS1/NS2)

- 10 Primer TR1 (5'-AAAGAATTCACGAGAAAAAACGC-3') ble laget basert på publiserte sekvenser fra enden og lederen for hRSV og APV, publisert av Randhawa (1997) og primer N1 (5'-CTGTGGTCTCTAGTCCCACTTC-3') ble laget basert på sekvenser skaffet tilveie i N-proteinet. RT-PCR-analysen og sekvensering ble utført som beskrevet ovenfor.

15

RT-PCR ga et produkt på ca. 500 basepar som er for lite til å inneholde informasjon for to ORF'er, og translasjon av disse sekvensene ga ingen ORF.

Deteksjon av antistoffer hos mennesker, pattedyr, ruminanter eller andre dyr med

20 *ELISA*

- I Paramyxoviridae er N-proteinet det mest tilstedeværende proteinet, og immunresponsen til dette proteinet finner sted tidlig i infeksjon. På grunn av dette blir helst en rekombinant kilde for N-proteinene anvendt for å utvikle en ELISA-analyse for deteksjon av antistoffer til MPV. Antigener passende for antistoffdeteksjon inkluderer
- 25 ethvert MPV-protein som kombineres med ethvert MPV-spesifikt antistoff til en pasient som er utsatt for eller infisert med MPV-virus. Foretrukne antigener i oppfinnelsen inkluderer de som mest fremkaller immunresponsen i pasienter utsatt for MPV, som derfor, typisk ble gjenkjent lettes av antistoffer fra en pasient. Spesielt foretrukne antigener inkluderer N, F og G-proteinet til MPV. Antigener anvendt for immunologisk
- 30 teknikk kan være negative antigener eller de kan være modifiserte versjoner av dem. Velkjente teknikker for molekylær biologi kan anvendes for å forandre aminosyresekvensen til et MPV antigen for å produsere modifisert versjoner av antigenet som kan anvendes i immunologiske teknikker.

- 35 Fremgangsmåten for å klonere gener, for å manipulere genene til og fra ekspressjonsvektorer, og for å uttrykke proteinet som kodes for a-genet i en heterolog

vert er velkjente, og disse teknikkene kan anvendes for å tilveiebringe ekspresjonsvektorer, vertsceller og for å uttrykke klonede gener som koder for antigener i en vert for å produsere rekombinante antigener for anvendelse i diagnostiske analyser. Se for eksempel: Molecular cloning, A laboratory manual and Current Protocols in Molecular Biology. En rekke ekspresjonssystemer kan anvendes for å produsere MPV-antigener. For eksempel har en rekke ekspresjonsvektorer som er i stand til å produsere proteiner i *E. coli*, *B. subtilis*, gjær, insektceller og pattedyrceller blitt beskrevet, enhver av disse kan anvendes til å produsere et MPV antigen som er i stand til å detektere anti-MPV-antistoffer i utsatte pasienter.

10

Baculovirus ekspresjonssystemet har den fordelen at det tilveiebringer nødvendig prosessering av proteiner, og er derfor å foretrekke. Systemet bruker polyhedringpromoteren for å dirigere ekspresjonen av MPV-antigener. (Matsuura et al. 1987, J. Gen. Virol. 68: 1233-1250).

15

Antigener som produseres av rekombinante baculovirus kan anvendes i en rekke immunologiske analyser for å detektere anti-MPV-antistoffer i en pasient. Det er slått fast at rekombinante antigener kan anvendes i stedet for naturlige virus, praktisk talt enhver immunologisk analyse for deteksjon av virusspesifikke antistoffer. Analysene inkluderer direkte og indirekte analyser, smørbrødanalyser, fastfase analyser slik som de som anvender plater eller kuler blant andre, og flytende faseanalyser. Analyser som er passende inkluderer de som anvender primære og sekundære antistoffer, og de som anvender antistoff-bindende reagenser slik som protein. Som kan ha en eller flere substituent. Videre kan en rekke deteksjonsfremgangsmåter anvendes i oppfinnelsen, inkludert kolorimetriske, fluorescerende, fosforiserende, kjemiluminiserende, luminiserende og radioaktive fremgangsmåter.

25

Eksempel 1 av indirekte anti-MPV IgG EIA som anvender rekombinant N-protein

En indirekte IgG EIA som anvender et rekombinant N-protein (produsert med rekombinante baculovirus i insekt (Sf9) celler) som antigen kan utføres. For antigenutstilling blir Sf9-celler infisert med det rekombinante baculovirus og høstet 3-7 dager etter infeksjon. Cellesuspensjonen ble vasket 2 ganger i PBS, pH 7,2, justert til en celletetthet på $5,0 \times 10^6$ celler/ml og fryse-tinging tre ganger. Store cellulære debris blir pelletert ved lav hastighets sentrifugering ($500 \times g$ i 15 min) og supernatanten ble samlet og lagret ved -70°C til den skal anvendes. Uninfiserte celler blir prosessert på samme måte for negative kontroll antigen.

35

100 µl fryse-tine lysat ble anvendt for å dekke mikrotiterplater, ved fortynninger i området fra 1:50 til 1:1000. Et uinfisert cellelysat ble kjørt i duplikate brønner og tjener som en negativ kontroll. Etter innkubering over natt blir platene vasket 2 ganger med
 5 PBS/0,05% Tween. Testsera ble fortynnet 1:50 til 1:200 i ELISA-buffer (PBS supplementert til 2% med normalt geitesera, og med 0,5% bovint serumalbumin og 0,1% melk), etterfulgt av inkubasjon av brønnene i 1 time ved 37°C.

Platene blir vasket to ganger med PBS/0,05% Tween. Pepperrot peroksidase merket
 10 geite-anti-humant (eller mot andre arter) IgG fortynnet 1:3 000 til 1:5 000 i ELISA-buffer ble tilsatt til brønnene og innkubert i 1 time ved 37°C. Platene ble så vasket to ganger med PBS/0,05% Tween og en gang med rennende vann, innkubert i 15 minutter ved romtemperatur med enzymsubstratet TMB, 3,3',5,5' tetrametylbenzidin, slik som det som kan skaffes tilveie fra Sigma, og reaksjonen ble stoppet med 100 µl 2M
 15 fosforsyre. Kolorimetrisk lesinger ble målt ved 450 nm ved å anvende en automatisk mikrotiter plateleser.

Eksempel 2: Fanget anti-MPV IgM EIA ved å anvende et rekombinant nukleoprotein

20 En fanget IgM EIA ved å anvende rekombinante nukleoproteiner eller ethvert annet rekombinant protein som antigen kan utføres ved modifikasjon av analysene som tidligere beskrevet av Erdman et al. (1990) J. Clin.Microb. 29:1466-1471.

Affinitet rensed anti-humant IgM fange antistoff (eller mot andre arter), slik som det
 25 som kan frembringes fra Dako, ble tilsatt til brønnene i en mikrotiterplate i en konsentrasjon på 250 ng per brønn i 0,1 M karbonatbuffer pH 9,6. Etter over natt innkubering ved romtemperatur ble platene vasket 2 ganger med PBS/0,05% Tween. 100 µl testserum fortynnet 1:200 til 1: 1000 i ELISA-buffer blir tilsatt til triplikatbrønnene og innkuberte i 1 time ved 37°C. Platen ble så vasket to ganger i
 30 PBS/0,05% Tween.

Det fryse-tinte (infisert med rekombinant virus) Sf21 cellelysatet er fortynnet 1:100 til 1:500 i ELISA-buffer og blir tilsatt til brønnene og innkubert i 2 timer ved 37°C. Uinfiserte cellelysat tjener som en negativ kontroll og blir kjørt i duplikate brønner.
 35 Platene blir så vasket 3 ganger i PBS/0,05% Tween og innkubert i 1 time ved 37°C med 100 µl av et polyklonalt antistoff mot MPV i en optimal fortynning i ELISA-buffer.

Etter to vasket med PBS/0,05% Tween ble platene innkubert med pepperrot peroksid merkede sekundære antistoff (slik som kanin anti-ilder) og platene ble innkubert i 20 minutter ved 37°C.

- 5 Platene ble så vasket 5 ganger i PBS/0,05% Tween, innkubert i 15 minutter ved romtemperatur med enzymsubstratet TMB, 3,3',5,5' tetrametylbenzidin som for eksempel det som kan frembringes fra "Sigma", og reaksjonen ble stoppet med 100 µl 2M fosforsyre. Kolorimetriske lesinger blir målt ved 450 nm ved å anvende automatisert mikrotiter plateleser.

10

Sensitiviteten til fange IgM EIA'ene ved å anvende det rekombinante nukleoproteinet (eller andre rekombinante protein) og hele MPV-virus blir sammenlignet ved å anvende akutt og rekonvalesent fase serumpar fra personer med kliniske MPV-virusinfeksjon. Spesifisiteten til den rekombinante nukleoprotein fange EIA ble bestemt ved å teste
15 serumprøver fra friske personer og personer med andre paramyxovirusinfeksjoner.

Potensialet for EIA for å anvende rekombinante MPV-fusjon og glykoproteinproteiner produsert evd baculovirus ekspresjonen.

- 20 Glykoproteinene G og F er de to transmembranlignende hylsterglykoproteinene til MPV virionet og representerer hoved nøytraliserings- og beskyttelses antigenene. Ekspresjonen av disse glykoproteinene i et vektor virussystem slik som et baculovirussystem tilveiebringer en kilde for rekombinant antigener for anvendelse i analyser for deteksjon av MPV-spesifikke antistoffer. Videre så øker deres anvendelse i
25 kombinasjon med nukleoproteinet for eksempel den sensitiviteten av enzym immunoanalysene i deteksjonen av antistoffer mot MPV.

En rekke andre immunologiske analyser (Current Protocols in Immunology) kan anvendes som alternative fremgangsmåter for de som er beskrevet her.

30

- For å finne virusisolater kan nasofaryngale aspirater, hals og nasale pensler, kyllinger av alveolare bronkier og halspensler helst fra, men ikke begrenset til mennesker, rovdyr (hunder, katter, seler osv), hester, ruminanter (storfe, sauer, geiter osv), griser, kaniner, fugler (fjærfe, strutser osv.) undersøkes. Fra fugler, kan kloakk og tarmpensler og
35 drypping også undersøkes. For alle prøvene, kan serologi (antistoff og antigeneteksjon osv.) virusisolasjon og nukleinsyre deteksjonsteknikker utføres for deteksjonen av virus.

Monoklonale antistoffer kan lages ved å immunisere mus (eller andre dyr) med renset MPV eller deler av det (proteiner, peptider) og deretter anvende etablerte hybridoma teknologi (Current protocols in Immunology). Alternativt kan fagdisplayteknologien anvendes for dette formål (Current protocols in Immunology). På samme måte kan polyklonale antistoffer skaffes tilveie fra infiserte mennesker eller dyr, eller fra immuniserte mennesker eller dyr (Current protocols in Immunology).

Deteksjonen av tilstedeværelsen eller fraværet av NS1 og NS2 proteinene kan utføres ved å anvende western-blotting, IFA, immun presipiteringsteknikker som anvender en rekke antistoff preparasjoner. Deteksjonen av tilstedeværelsen eller fraværet av NS1- og NS2-gener eller homologer av dem i virusisolater kan utføres ved å anvende PCR med primersett laget på basisen av kjente NS1- og/eller NS2-gener så vel som med en rekke nukleinsyre hybridiseringsteknikker.

For å bestemme om NS1- og NS2-genene er tilstede i den 3'-enden av det virale genomet, kan en PCR utformes med primere som er spesifikke for denne 3'-enden av genomet. I vårt tilfelle anvendte vi en primer som var spesifikk for den 3' utranslaterte regionen av det virale genomet og en primer i N ORF'en. Andre primere kan lages for det samme formål. Fraværet av NS1/NS2-genene avsløres ved mengden og/eller nukleotidsekvensen av PCR-produktet. Primer som er spesifikke for NS1 og/eller NS2-genene kan anvendes i kombinasjon med primere som er spesifikke for andre deler av den 3'-enden av det virale genomet (slik som den utranslaterte regionen eller N, M eller F ORF'ene) for å tillate en positiv identifikasjon av nærværet av NS1- eller NS2-gener. I tillegg til PCR kan en rekke teknikker slik som molekylær kloning, nukleinsyrehybridisering anvendes for det samme formålet.

Eksempel 3: Forskjellige serotyper/undergrupper av MPV

To potensielle genetiske klynger er identifisert ved analyse av delvis nukleotidsekvenser i N, M, F og L ORF'ene hos 9 virusisolater. 90-100% nukleotid identitet ble observert innen en klynge og 81-88% identitet ble observert mellom klyngene.

Sekvensinformasjon skaffet tilveie på flere virusisolater bekreftet eksistensen av to genotyper. Virusisolat ned/00/01 som prototype på klynge A, og virusisolat ned/99/01 som prototype på klynge B er blitt anvendt i kryssnøytraliseringsanalyser for å teste om genotypene er beslektet med forskjellige serotyper eller undergrupper.

Resultater

Ved å anvende RT-PCR analyser med primere lokalisert i polymerasegenet, identifiserte vi 30 tilleggs virusisolater fra nasofaryngale aspiratprøver. Sekvensinformasjon av deler av matriks og polymerasegenene til disse nye isolatene med de til de tidligere 9

- 5 isolatene ble anvendt for å konstruere fylogenetiske trær (Figur 16). Analyser av disse trærne bekreftet tilstedeværelsen av to genetiske klynger, med virusisolat ned/00/00-1 som prototype virus i gruppe A og virusisolat ned/99/01 som prototypen virus i gruppe B. Nukleotidsekvensidentiteten innen en gruppe var mer enn 92% mens identiteten mellom klyngene var 81-85%.

10

Virusisolat ned/00/01 og ned/99/01 er blitt anvendt for å innokulere ildere for å lage virusspesifikke antisera. Disse antiseraene ble anvendt i virus nøytraliseringsanalyser med begge virus.

15

Tabell 3:

Virus nøytraliseringstiter

	Isolat 00-1	Isolat 99-1
Preserum ilder A (00-1)	2	2
Ilder A 22 dpi (00-1)	64	2
Preserum ilder B (99-1)	2	2
Ilder B 22 dpi (99-1)	4	64

For isolat 00-1 avviker titeret 32 (64/2) ganger

For isolat 99-1 avviker titeret 16 (64/4) ganger

20

I tillegg er 6 marsvin blitt innokulert med begge virusene (ned/00/01 og ned/99/01). RT-PCR-analyser på nasofaryngale aspiratprøver viser virusreplikasjon fra dag 2 til dag 10 etter infeksjon. Ved dag 70 etter infeksjon har marsvinene blitt utfordret med enten det homologe eller det heterologe virus, og i alle fire tilfellene har virusreplikering blitt notert.

25

Tabell 4

	Primær infeksjon	Virus replikering	Sekundær infeksjon	Virus replikering
Marsvin 1-3	00-1	2 av 3	99-1	1 av 2
Marsvin 4-6	00-1	3 av 3	00-1	1 av 3
Marsvin 7-9	99-1	3 av 3	00-1	2 av 2
Marsvin 10-12	99-1	3 av 3	99-1	1 av 3

Merk: for den sekundære infeksjonen var ikke marsvin 2 og 9 der mer.

5 Virus nøytraliseringsanalyse med antisera etter den første utfordringen viste essensielt de samme resultatene som i VN-analyser utført med ildere (> 16 ganger forskjeller i VN-titer).

Resultatene presenterte i dette eksempelet bekrefter eksistensen av to genotyper, som korresponderer til to serotyper med MPV, og viser muligheten for repetert infeksjon med heterologe og homologe virus.

Eksempel 4: Ytterligere sekvensbestemmelse

15 Dette eksempelet beskriver den ytterligere analysen av sekvensen av MPV åpne leserammer (ORF'er) og intergene sekvenser så vel som partielle sekvenser av de genomiske endende.

Sekvensanalyse av nukleoproteinet (N), fosfoproteinet (P), matriksproteinet (M) og fusjonsprotein (F) genene hos MPV viser den høyeste grad med sekvenshomologi med APV serotype C, fugle pneumoviruset som finnes primært i fugler i USA. Disse analysene viste også fraværet av ikke-strukturelle proteiner NS1 og NS2 i den 3'-enden av det virale genomet, og posisjoneringen av fusjonsproteinene umiddelbart tilstøtende til matriksproteinet. Her presenterer vi sekvensene til det 22K (M2) proteinet, det ikke hydrofobe (SH) proteinet, festet (G) proteinet og polymerase (L) proteingenene, de intergene regionene og endesekvensen. I kombinasjon med sekvensene beskrevet tidligere kompletterer sekvensene presentert her den genomiske sekvensen til MPV med unntak av de ekstreme 12-15 nukleotidene i den genomiske enden og etablerer den genomiske organiseringen av MVP. Side ved side sammenligninger av sekvensene til MPV-genomet med de fra APV subtype A, B og C, RSV subtype A og B, PVM og andre paramyxovirus tilveiebringer sterke bevis for klassifiseringen av MPV i Metapneumovirus slekten.

Resultater

Sekvensstrategi

MPV-isolat 00-1 (van den Hoogen et al., 2001) ble formert i tertiære apenyre (tMK) celler og RNA isolert fra supernatanten 3 uker etter innokulering ble anvendt som templat for RT-PCR analyser. Primere ble laget på basisen av den partielle sekvensinformasjonen tilgjengelig for MPV 00-1 (van den Hoogen et al., 2001) så vel som fra lederen og sluttsekvensene til APV og RSV (Randhawa et al., 1997; Mink et al, 1991). Initielt var fragmentene mellom de tidligere fremskaffede produktene som var i størrelse fra 500 bp til 4 Kb i lengde laget med RT-PCR amplifisering og sekvensert direkte. Den genomiske sekvensen ble deretter bekreftet ved å lage en rekke overlappende RT-PCR-fragmenter i størrelsesområdet fra 500 til 800 bp som representerte hele MPV-genomet. For alle PCR-fragmentene ble begge trådene sekvensert direkte for å minimalisere oppformerings- og sekvenseringsfeil. Nukleotid og aminosyresekvensene ble anvendt for å søke etter homologier med sekvenser i Genbank databasen ved å anvende BLAST software (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Proteinnavn ble utpekt for åpne leserammer (ORF'er) basert på homologi med kjente virale gener så vel som deres lokalisering i genomet. Basert på denne informasjonen ble et genomisk kart for MPV konstruert (Figur 7). MPV-genomet er 13 378 nukleotider i lengden og dets organisering er lignende den genomiske organiseringen til APV. Under så presenterer vi en sammenligning mellom ORF'ene og de ikke-kodende sekvensene til MPV og de fra andre paramyxovirus og diskuterer viktige likheter og forskjeller.

Nukleoprotein (N) gen

Som vist så koder det første genet i det genomiske kartet til MPV for et 394 aminosyre (aa) protein og viser utstrakt homologi med N-proteinet til andre pneumovirus. Lengden av N ORF'en er identisk til lengden til N ORF'en til APV-C (Tabell 5) og er mindre enn de fra andre paramyxovirus (Barr et al., 1991). Analyse av aminosyresekvensen avslørte den høyeste homologien med APV-C (88%), og bare 7-11% med andre paramyxovirus (Tabell 6).

Barr et al. (1991) identifiserte 3 regioner med likhet mellom virusene som tilhører klassen Mononegavirales: A, B og C (Figur 8). Selv om likhetene er høyest innen en virusfamilie, er disse regionene sterkt konserverte mellom virusfamilier. I alle tre regionene viste MPV 97% aa sekvensidentitet med APV-C, 89% med APV-B, 92% med APV-A og 66-73% med RSV og PVM. Regionen mellom aa-residiene 160 og 340

synes å være sterkt konserververt blant metapneumovirus og til en noe mindre grad til Pneumovirinae (Miyahara et al, 1992; Li et al, 1996; Barr et al., 1991). Dette er i overensstemmelse med at MPV er et metapneumovirus som viser 100% likhet med APV-C.

5

Fosfoprotein (P) genet

Den andre ORF'en i det genomiske kartet koder for et 294 aa-protein som deler 68% aa-sekvenshomologi med P-proteinet til APV-C, og bare 22-26% med P-proteinet til RSV (Tabell 6). P-genet til MPV inneholder en vesentlig ORF og er med hensyn til dette lik
10 P fra mange andre paramyxovirus (oversikt i Lamb og Kolakofsky, 1996; Sedlmeier et al, 1998).

I motsetning til APV A og B og PVM og lik RSV og APV-C mangler MPV P ORF'en cysteinresidier. Ling (1995) foreslo at en region med høy likhet mellom alle
15 pneumovirus (aa 185-241) spiller en rolle enten i RNA-synteseprosessen eller i å opprettholde den strukturelle integriteten til nukleokapsidkomplekset. Denne regionen med høy likhet er også funnet i MPV (Figur 9), spesielt når konservative substitusjoner blir tatt i betraktning, og viser 100% likhet med APV-C, 93% med APV-A og B og ca. 81% med RSV. Den C-terminale enden av MPV P-proteinet er lik på glutamatresidiet
20 som er blitt beskrevet for APV'er (Ling et al., 1995).

Matriks (M) proteingenet

Den tredje ORF'en til MPV-genomet koder for et 254 aa-protein som ligner M ORF'ene til andre pneumovirus. M ORF'en til MPV har nøyaktig den samme størrelsen
25 som M ORF'ene til andre metapneumovirus (Tabell 5) og viser høy aa-sekvenshomologi med matriksproteinene til APV (78-87%), lavere homologi med de hos RSV og PMV (37-38%) og 10% eller mindre homologi med de fra andre paramyxovirus (Tabell 6).

30 Easton (1997) sammenlignet sekvensene til matriksproteiner fra alle pneumovirus og fant et konserververt heptapeptid ved residiene 14-19 som også er konservert i MPV (Figur 10). For RSV, PVM og APV har små sekundære ORF'er innen eller overlappende med hoved ORF'en til M blitt identifisert (52 aa og 51 aa i bRSV, 75 aa i RSV, 46 aa i PVM og 51 aa i APV) (Yu et al., 1992; Easton et al, 1997; Samal et al, 1991; Satake et al,
35 1984). Vi la merke til to små ORF'er i M ORF'en til MPV. En liten ORF på 54 aa-residier ble funnet innen hoved M ORF'en (fragment 1, Figur 7), som starter ved

nukleotid 2281 og en liten ORF på 33 aa-residier ble funnet overlappende med hoved ORF'en til M som starter ved nukleotid 2893 (fragment 2, Figur 7). Lignende til sekundære ORF'ene til RSV og APV er det ingen signifikant homologi mellom disse sekundære ORF'ene og sekundære ORF'er til andre pneumovirus, og tydelige start eller stoppsignaler mangler. I tillegg har ikke bevis for syntesen av proteiner som korresponderer til disse sekundære ORF'ene til APV og RSV blitt rapportert.

Fusjonsprotein (F) genet

F ORF'en til MPV er lokalisert tilstøtende til M ORF'en, som er karakteristisk for medlemmer av Metapneumovirus slekten. F-genet til MPV koder for et 539 aa-protein, som er to aa-residier lenger enn F til APV-C (Tabell 5). Analyse av aa-sekvensen viste 81% homologi med APV-C, 67% med APV-A og B, 33-39% med pneumovirus F-proteiner og bare 10-18% med andre paramyxovirus (Tabell 6). Et av de konserverte trekkene blant F-proteiner til paramyxovirus og som også ses i MPV er distribusjonen av cysteinresidier (Morrison, 1988, Yu et al., 1991). Metapneumovirusene deler 12 cysteinresidier i F1 (7 er konserverte blant alle paramyxovirus), og to i F2 (1 er konserverte blant alle paramyxovirus). Av de 3 potensielle N-koblede glykosyleringssetene som er tilstede i F ORF'en i MPV deles ingen med RSV og to (posisjon 74 og 389) deles med APV. Det tredje unike potensielle N-koblede glykosyleringssettet for MPV er lokalisert ved posisjon 206 (Figur 11).

Til tross for den lave sekvenshomologien med andre paramyxovirus, viser F-proteinet til MPV typiske fusjonsproteinkarakteristika som er i overensstemmelse med de beskrevet for F-proteiner for andre Paramyxoviridae familiemedlemmer (Morrison, 1988). F-proteinene hos Paramyxoviridae medlemmer blir syntetisert som inaktive forløpere (F0) som kløyves av vertcelle proteaser som danner aminoterminal F2 subenheter og store karboksyterminale F1 subenheter. Det foreslåtte kløyvningssettet (Collins et al, 1996) er konserverte blant alle medlemmer av Paramyxoviridae familien. Kløyvningssettet hos MPV inneholder residiene RQSR. Begge arginin (R) residiene deles med APV og RSV, men glutamin (Q) og serin (S) residiene deles med andre paramyxovirus slik som human parainfluenzavirus type 1, sendai virus og meslingvirus (data ikke vist).

Den hydrofobe regionen ved den aminoterminal delen av F1 antas å fungere som membran fusjonsdomene og viser høy sekvenslikhet blant paramyxovirus og meslingvirus og til en mindre grad til pneumovirus (Morrison, 1988). Disse 26 residiene

(posisjon 137-163, Figur 11) er konserverte mellom MPV og APV-C, som er i overensstemmelse med at denne regionen er sterkt konserverte blant metapneumovirus (Naylor et al., 1998; Seal et al., 2000).

- 5 Som kan ses for F2 subenhetene hos APV og andre paramyxovirus, viste MPV en utsletning av 22 aa-residier sammenlignet med RSV (posisjon 107-128, Figur 11). For RSV og APV ble videre signalpeptidet og forankringsdomenet funnet å være konserverte innen undertyper og viste høy variabilitet mellom undertyper. Signalpeptidet hos MPV (aa 10-35, Figur 11) ved den aminoterminalen delen av F2 har noe sekvenslikhet med
 10 APV-C (18 av 26 aa-residier er like) og mindre konservering med andre APV'er eller RSV. Mye mer variabilitet ses i membran forankringsdomenet ved den karboksyterminale delen av F1, selv om noe homologi fremdeles ses med APV-C.

22K (M2) proteingenet

- 15 M2-genet er unikt for Pneumovirinae og to overlappende ORF'er er blitt observert i alle pneumovirus. Den første hoved ORF representerer M2-1 proteinet som øker prosessiviteten til den virale polymerasen (Collins et al., 1995; Collins 1996) og dens gjennomlesning av intergene regioner (Hardy et al., 1998; Fearn et al., 1999). M2-1 genet hos MPV, som er lokalisert tilstøtende til F-genet, koder for et 187 aa-protein
 20 (Tabell 5), og viser den høyeste 84% homologien med M2-1 hos APV-C (Tabell 6). Sammenligning av alle pneumovirus M2-1 proteiner viste den høyeste konserveringen i den aminoterminalen halvdel av proteinet, som er i overensstemmelse med observasjonen om at MPV viser 100% likhet med APV-C i de første 80 aa-residene av proteinet (Figur 12a). MPV M2-1 proteinet inneholder 3 cysteinresidier lokalisert innen
 25 de første 30 aa-residene som er konserverte blant alle pneumovirus. En slik konsentrering av cysteiner blir ofte funnet i sinkbindende proteiner.

- De sekundære ORF'ene (M2-2) som overlapper med M2-1 ORF'ene hos pneumovirus er konserverte i lokalisering, men ikke i sekvens og antas å være involvert i kontrollen av
 30 switchen mellom virus RNA replikering og transkripsjon (Collins et al., 1985; Elango et al., 1985; Baybutt et al., 1987; Collins et al., 1990; Ling et al., 1992; Zamora et al., 1992; Alansari et al., 1994; Ahmadian et al., 1999; Bermingham et al., 1999). For MPV starter M2-2 ORF'en ved nukleotid 512 i M2-1 ORF'en (Figur 7), som er nøyaktig den samme startposisjonen som for APV-C. Lengden av M2-2 ORF'ene er den samme for
 35 APV-C og MPV, 71 aa-residier (Tabell 5). Sekvenssammenligning av M2-2 ORF'en

(Figur 12B) viste 64% aa-sekvenshomologi mellom MPV og APV-C og bare 44 til 48% aa-sekvenshomologi mellom MPV og APV-A og B (Tabell 6).

Den lille hydrofobe protein (SH) ORF'en

5 Genet som er lokalisert tilstøtende til M2 hos hMPV koder antagelig for et 183 aa SH-protein (Fig. 1 og 7). Det er ingen merkbar sekvensidentitet mellom denne ORF og andre RNA-virusgener eller genprodukter. Dette er ikke overraskende fordi sekvenslikheten mellom pneumovirus SH-proteiner generelt er lav. Den putative SH ORF'en hos hMPV er den lengste SH ORF'en som er kjent til nå (Tabell 1). Aa-sammensetningen i SH ORF'en er relativt lik den i APV, RSV og PVM, med en høy prosent av treonin- og serinresidier (henholdsvis 22%, 18%, 19%, 20%, 21% og 28% for hMPV, APV, RSV A, RSV B bRSV og PVM). SH ORF'en hos hMPV inneholder 10 cysteinresidier, mens APV SH inneholder 16 cysteinresidier. SH ORF'en hos hMPV inneholder to potensielle N-koblede glykosylerings seter (aa 76 og 121), mens APV har 15 et, RSV har to eller tre og PVM har fire.

Hydrofilisitetsprofilene for det putative hMPV SH-proteinet og SH hos APV og RSV viste lignende karakteristika (Fig 7b). SH ORF'ene hos APV og hMPV har en hydrofil N-terminal ende. Et sentralt hydrofobt domene som kan tjene som et potensielt 20 membrandekkende domene (aa 30-53 for hMPV), en andre hydrofobt domene (aa 155-170) og en hydrofil C-terminal ende. I motsetning til dette syntes det som om RSV SH mangler den C-terminale delen av APV og hMPV ORF'ene. Hos alle pneumovirus SH-proteiner er det hydrofobe domenet flankerte av basiske aa-residier, noe som også finnes i SH ORF'en hos hMPV (aa 29 og 54).

25

Feste glykoprotein (G) ORF'en

Den putative G ORF'en i hMPV er lokalisert tilstøtende til det putative SH-genet og koder for et 286 aa-protein (nt 6262-6972, Fig. 1). I en sekundær liten ORF finnes umiddelbart etter denne ORF, og koder potensielt for 68 aa-residier (nt 6973-7179), 30 men mangler et startkodon. En tredje potensiell ORF i den andre leserammen på 194 aa-residier overlapper med begge disse ORF'ene, men mangler også et startkodon (nt 6416-7000). Denne ORF etterfølges av en potensielt fjerde ORF på 65 aa-residier i den samme leserammen (nt 7001-7198), men mangler igjen et startkodon. Til slutt er et potensielt ORF på 97 aa-residier (men som mangler et startkodon) funnet i den tredje 35 leserammen (nt 6444-6787, Fig. 1). Ulikt den første ORF'en har de andre ORF'ene ingen tydelige genstart og gensluttsekvenser (se under). Selv om den 236 aa G ORF'en

antagelig representerer i det minste en del av hMPV festeproteinet kan det ikke ekskluderes at de tilleggskodende sekvensene uttrykkes som separate proteiner eller som del av festeproteinet gjennom noen RNA-korrigerende begivenheter. Det bør legges merke til at for APV og RSV er ingen sekundære ORF'er etter den primære G ORF'en blitt identifisert, men at både APV og RSV har sekundære ORF'er innen hoved ORF'en til G. Imidlertid mangler bevis for ekspresjon av disse ORF'ene, og der er ingen sekvensidentitet mellom de forutsagte aa-sekvensene for forskjellige virus (Ling et al, 1992). De sekundære ORF'ene i hMPV G viste ingen karakteristika til andre G-proteiner og om disse tilleggs ORF'ene blir uttrykt, krever ytterligere undersøkelse.

10

BLAST-analyser med ORF'ene viste ingen merkbar sekvensidentitet på nuklein eller aa-sekvensnivå med andre kjente virusgener eller genprodukter. Dette er i overensstemmelse med den lave prosentsekvens identiteten som er funnet for andre G-proteiner slik som de i hRSV A og B (53%) (Johnson et al., 1987) og APV A og B (38%) (Juhasz og Easton 1994).

15

Mens de fleste hMPV ORF'ene ligner de i APV både i lengde og sekvens, er den putative G ORF'en på 236 aa-residier i hMPV betraktelig mindre enn G ORF'en til APV (Tabell 1). Aa-sekvensen viste et serin- og treonininnhold på 34%, noe som er høyere enn de 32% for RSV og 24% for APV. Den putative G ORF'en inneholder også 8,5% prolinresidier, noe som er høyere enn 8% for RSV og 7% for APV. Den uvanlige tilstedeværelsen av prolinresidier i G-proteinene hos APV, RSV og hMPV er også blitt observert i glykoproteinene som kommer fra slimhinner hvor det er en hovedavgjørende faktor for proteinenes tredimensjonale struktur (Collins og Wertz, 1983; Wertz et al., 1985; Jentoft, 1990). G ORF'en i hMPV inneholder fem potensielle N-koblede glykosyleringsseter, mens hRSV har 7, bRSV har 5 og APV har 3-5.

25

Den forutsagte hydrofilisitetsprofilen til hMPV G viste karakteristika som ligner de andre pneumovirusene. Den N-terminale enden inneholder en hydrofil region etterfulgt av et kort hydrofobt område (aa 33-53 for hMPV) og en hovedsakelig hydrofil C-terminal ende (Fig. 8B). Den totale organisering er forenelig med den til et forankret type 2 transmembranprotein og korresponderer godt med disse regionene i G-proteinet til APV og RSV. Den putative G ORF'en i hMPV inneholder bare et cysteinresidie i motsetning til RSV og APV (henholdsvis 5 og 20). Noe som kan legges merke til er at bare to av de fire sekundære ORF'ene i G-genet inneholdt et tilleggs cysteinresidie og

35

disse fire potensielle ORF'ene viste 12-20% serin- og treoningresidier og 6-11% prolinresidier.

Polymerasegenet (L)

- 5 I analogi med andre negative trådvirus, er den siste ORF'en i MPV-genomet den RNA-avhengige RNA-polymerasekomponenten i replikasjons og transkripsjonskompleksene. L-genet hos MPV koder for et 2005 aa-protein, som er et residie lenger enn APV-A proteinet (Tabell 5). L-proteinet hos MVP deler 54% homologi med APV-A, 42-44% med RSV og ca. 13% med andre paramyxovirus (Tabell 6). Poch et al., (1989; 1990)
- 10 identifiserte seks konserverte domener innen L-proteinet hos ikke-segmenterte negative tråd-RNA-virus, hvor domenet 3 inneholdt de fire kjerner polymerasemotivene som antas å være essensielle for polymerasefunksjon. Disse motivene (A, B, C og D) er godt konserverte i MPV L-proteinet: I motivene A, B og C: MPV-deler 100% likhet med alle pneumovirus og i motiv D deler MPV 100% likhet med APV og 92% med RSV'ene.
- 15 For hele domenet 3 (aa 627-903 i L ORF'en), deler MPV 77% identitet med APV, 61-62% med RSV og 23-27% med andre paramyxovirus (Figur 15). I tillegg til polymerasemotivene inneholder pneumovirus L-proteinene en sekvens som er i pakt med et konsensus ATP-bindingsmotiv $K(X)_{21}GEGAGM(X)_{20}K$ (Stec, 1991). MPV L ORF'en inneholder et lignende motiv som APV, hvor mellomrommet mellom
- 20 intermediatresidiene er et mindre: $K(x)_{22}GEGAGN(X)_{10}K$.

Fylogenetiske analyser

- Som en indikator på slektskapet mellom MPV og medlemmer av Pneumovirinae har fylogenetiske trær basert på N, P, M og F ORF'ene blitt konstruert tidligere (van den
- 25 Hoogen et al., 2001) og viste nært slektskap mellom MPV og APV-C. På grunn av den lave homologien mellom MPV SH og G-genene med de fra andre paramyxovirus kan pålitelige fylogenetiske trær for disse genene ikke konstrueres. I tillegg gjør den distinkte genomiske organiseringen mellom medlemmer av Pneumovirus og Metapneumovirus slektene det umulig å lage fylogenetiske trær basert på hele den
- 30 genomiske sekvensen. Vi konstruerte derfor bare fylogenetiske trær for M2- og L-genene i tillegg til de som tidligere er publisert. Begge disse trærne bekreftet det nære slektskapet mellom APV og MPV innen Pneumovirinae underfamilien (Figur 16).

MPV ikke-kodende sekvenser

- 35 Genkoblingene til genomet hos paramyxovirus inneholder korte og meget konserverte nukleotidsekvenser i begynnelsen og slutten av hvert gen (genstart og gensluttsignaler),

som antagelig spiller en rolle i initiering og terminering av transkripsjon (Curran et al., 1899). Sammenligning av de intergene sekvensene mellom alle genene til MPV viste en konsensus sekvens for genstartssignaler hos N, P, M, F, M2 og G: GGGACAAGU (Figur 17A) som er identisk til konsensus genstartssignalet til metapneumovirus (Ling et al., 1992; Yu et al., 1992; Li et al., 1996; Băyon-Auboyer et al., 2000).

Genstartssignalene for SH- og L-genene i MPV ble funnet å være litt forskjellige fra denne konsensus (SH: GGGAUAAAU, L: GAGACAAAU). For APV-genet ble startssignalet i L også funnet å være forskjellig fra konsensusen: AGGACCAAT (APV-A) (Randhawa et al., 1996) og GGGACCAGT (APV-D) (Băyon-Auboyer et al., 2000).

10

I motsetning til de lignende genstartssignalene i MPV og APV ble ikke konsensus genslutt sekvensen for APV, UAGUUAUU (Randhawa et al., 1996), funnet i de MPV internerende sekvensene. Den repeterte sekvensen som ble funnet i de fleste gener, unntatt den G-L intergene regionen var U AAAAA U/A/C som muligvis kunne virke som gensluttssignal. Fordi vi sekvenserte virale RNA heller enn mRNA kunne imidlertid bestemte gensluttssignaler ikke utpekes og krever dermed videre undersøkelse. De intergene regionene hos pneumovirus varierer i størrelse og sekvens (Curran et al., 1999; Blumberg et al., 1991; Collins et al., 1983). De intergene regionene i MPV viste ingen homologi med de fra APV og RSV og er i størrelsesområdet fra 10 til 228 nukleotider (Figur 17B). De intergene regionene mellom M og F ORF'ene i MPV inneholder deler av en sekundær ORF, som starter i den primære M ORF'en (se over). Den intergene regionen mellom SH og G inneholder 192 nukleotider, og synes ikke å ha kodende potensiale basert på nærværet av flere stoppkodon i alle tre leserammer. De intergene regionene mellom G og L inneholder 241 nukleotider, som kan inkludere tilleggss ORF'er (se over). Det er interessant at starten på L ORF'en er lokalisert i disse sekundære ORF'ene. Mens L-genet i APV ikke starter i den foregående G ORF, starter L ORF'en i RSV også i det foregående M2 genet. I de 3' og 5' ekstremitetene av genomet hos paramyxovirus blir kort ekstragen region referert til som lederen og sluttsekvensene, og ca. de første 12 nukleotidene av lederen og de siste 12 nukleotidene av slutten er komplementære, antagelig på grunn av at de hver inneholder basale elementer i den virale promotoren (Curran et al., 1999; Blumberg et al., 1991; Mink et al., 1986). Den 5' lederen til MPV og APV er begge 41 nukleotid lange og noe homologi ses i regionen mellom nukleotid 16 og 41 for begge virus (18 av 26 nukleotider) (Figur 17B). Som nevnt før er de første 15 nukleotidene av det MPV genomiske kartet basert på en primersekvens basert på APV-genomet. Lengden av den 5' enden av MPV (188 nukleotider) ligner størrelsen på RSV 5' slutten (155

nukleotider), som er betraktelig lenger enn den i APV (40 nukleotider). Oppstilling av de ekstreme 40 nukleotidene av slutten på MPV og slutten av APV viste homologi på 21 av 31 nukleotider, adskilt fra de ekstreme 12 nukleotidene som representerer primersekvensen basert på den genomiske sekvensen til APV. Vår sekvensanalyse viste

5 fraværet av NS1 og NS2-gener i den 3'-enden av genomet og en genomisk organisering som ligner organiseringen av metapneumovirus (3'-N-P-M-F-M2-S-G.L-5'). Den høye sekvenshomologien som ble funnet mellom MPV og APV-genene poengterte ytterligere det nære slektskapet mellom disse to virus. For N, P, M, F, M2-1 og M2-2 genene i MPV ble en total aminosyrehomologi på 79% funnet med APV-C. Faktisk viste disse

10 genene APV-C og MPV-sekvenshomologier som er i det samme størrelsesområdet som sekvenshomologier funnet mellom undergrupper av andre slekter, slik som RSV-A og B eller APV-A og B. Dette nære slektskapet mellom APV-C og MPV er også sett i de fylogenetiske analysene som viste MPV og APV-C alltid var på den samme gren, separert fra grenen som inneholder APV-A og B. Den identiske genomiske

15 organisasjonen, sekvenshomologiene og de fylogenetiske analysene favoriserer alle klassifiseringene av MPV som det første medlemmet i Metapneumovirus slekten som er isolert fra pattedyr. Det bør legges merke til at den funnede sekvensvariasjonen mellom forskjellige virus isolert i MPV i N-, M-, F- og L-genene viste den mulige eksistensen av forskjellige genotyper (van den Hoogen et al., 2001). Det nære slektskapet mellom

20 MPV og APV-C reflekteres ikke i vertsområdet, fordi APV infiserer fugler i motsetning til MPV (van den Hoogen et al., 2001). Denne forskjellen i vertsområde kan være bestemt av forskjellene mellom SH- og G-proteinene i begge virus som er veldig forskjellige. SH- og G-proteinene i MPV viste ingen signifikans med sekvenshomologi med SH- og G-proteinene av noen andre virus. Selv om aminosyreinnholdet og

25 hydrofobisitetstallet favoriserer og definerer disse ORF'ene som SH- og G, kreves eksperimentelle data for å undersøke deres funksjon. Slike analyser vil også kaste lys over rollen til de tilleggs overlappende ORF'ene i disse SH- og G-genene. I tillegg kan sekvensanalyse av SH- og G-genene i APV-C tilveiebringe mer innsikt i funksjonen av SH- og G-proteinene i MPV og deres slektskap med disse i APV-C. De ikke-kodende

30 regionene i MPV ble funnet å være nok så like de i APV. De 3' leder og 3' sluttsekvensene i APV og MPV viste en høy grad av homologi. Selv om lengdene av de intergene regionene ikke alltid var de samme for APV og MPV, ble konsensus gen startsignalene til de fleste ORF'ene funnet å være identiske. I motsetning ble gensluttsignalene i APV ikke funnet i MPV-genomet. Selv om vi fant en repetitiv

35 sekvens (U AAAAA U/A/C) i de fleste intergene regionene, treng sekvensanalyse av virale mRNA for formelt å skissere de gensluttsekvensene. Det bør bemerkes at

sekvensinformasjon av 15 nukleotider ved den ekstreme 3' ende og 12 nukleotider ved den ekstreme 5' ende er skaffet tilveie ved å anvende modifisert rask oppformering av cDNA ender (RACE) prosedyrer. Denne teknikken har vist seg å være vellykket ved andre forrelaterte virus (Randhawa, J.S. et al., Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J. Virol*, 71, 9849-9854 (1997); Mink, M.A., et al. Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-24 (1991)). For å bestemme sekvensen av den 3' vRNA ledersekvensen, blir en homopolymer A haletilsatt for å rense vRNA ved å anvende poly-A-polymerase og ledersekvensen som deretter oppformeres ved PCR ved å anvende en poly-T-primer og en primer i N-genet. For å bestemme sekvensen for den 5' vRNA sluttsekvensen, blir en cDNA kopi av sluttsekvensen lagret ved å anvende revers transkriptase og en primer i L-genet, etterfulgt av å sette på haler av homopolymer dG i cDNA'et med terminal transferase. Deretter blir sluttregionen oppformert ved å anvende en poly-C primer og en primer i L-genet. Som en alternativ strategi blir vRNA ligert til seg selv eller syntetiske linkere, hvorefter leder og sluttregionene blir oppformert ved å anvende primerne i L- og N-genene og linkerspesifikke primere. For den 5' sluttsekvensen er det også mulig å direkte dideoksynukleotidsekvansere rensset vRNA (Randhawa, 1997). Ved å anvende disse fremgangsmåtene, kan vi analysere den nøyaktige sekvensen i endene av hMPV-genomet. Sekvensinformasjonen tilveiebrakt her er av viktighet for dannelsen av diagnostiske tester, vaksiner og antiviraler for MPV og MPV infeksjoner.

Materialer og metoder

Sekvensanalyse

Virusisolat 00-1 ble oppformert til høyere titere (ca. 10 000 TCID₅₀/ml) på tertiære ape nyreceller som beskrevet tidligere (van den Hoogen et al., 2001). Viralt RNA ble isolert fra supernatantene fra infiserte celler ved å anvende et High Pure RNA Isolating Kit ifølge produsentens instruksjoner (Roch Diagnostics, Almere, Nederland). Primere ble laget basert på sekvenser publisert tidligere (van den Hoogen et al., 2001) i tillegg til sekvenser publisert for lederen og slutten av APV/RSV (Randhawa et al., 1997; Mink et al., 1991) og er tilgjengelige ved forespørsel. RT-PCR analyser ble utført med viralt RNA, ved å anvende en et-rørs analyse i et totalt volum på 50 µl med 50 mM Tris pH 8,5, 50 mM NaCl, 4,5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 µM fremoverprimer, 1 µM revers primer, 0,6 mM dNTP'er, 20 enheter RNasin (Promega, Leiden, Nederland), 10 U AMV revers transkripsjon (Promega, Leiden, Nederland) og 5 enheter Taq polymerase (PE Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, Nederland). Revers transkripsjon

ble utført ved 42°C i 30 min, etterfulgt av 8 minutters inaktivering ved 95°C. cDNA ble oppformert gjennom 40 sykluser på 95°C, 1 min; 42°C, 2 min; 72°C, 8 min; med en sluttekstensjon ved 72°C i 10 min. Etter undersøkelse på en 1% agarosegel ble RT-PCR produktene rensset fra gel ved å anvende et Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, Leusden, Nederland) og sekvensert direkte ved å anvende et Dyanamic ET terminator sekvenseringskitt (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, Nederland) og en ABI 373 automatisk DNA-sekvensator (PE Applied Biosystem, Nieuwerkerk aan den IJssel, Nederland) ifølge produsentens instruksjoner.

- 10 Sekvensoppstillinger ble gjort ved å anvende gruppe softwarepakken som er tilgjengelige i softwarepakken til BioEdit versjon 5.0.6 (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>; Hall, 1999).

Fylogenetisk analyse

- 15 For å konstruere fylogenetiske trær ble DNA-sekvenser stilt opp ved å anvende ClustalW software pakken og maksimale sannsynlighetstrær ble laget ved å anvende DNA-ML softwarepakken i Phylip 3.5 programmet ved å anvende 100 programlaster og 3 "jumbles". Programplastverdiene ble beregnet for konsensustreet laget med konsenspakken (Felsenstein, 1989).

20

- Den MPV genomiske sekvensen er tilgjengelig fra Genbank under tilgangsnummeret FAF37.1337. Alle andre sekvenser som er anvendt her er tilgjengelig fra Genbank under tilgangsnummerne AB046218 (meslingvirus, alle ORF'ene), NC-001796 (humant parainfluenzavirus type 3, alle ORF'ene), NC-001552 (Sendaivirus, alle ORF'ene), X57559 (humant parainfluenzavirus type 2, alle ORF'ene), NC-002617 (New Castle Disease virus, alle ORF'ene), NC-002728 (Nipah virus, alle ORF'ene), NC-001989 (bRSV, alle ORF'ene) M11488 (hRSV A, alle ORF'ene, unntatt L), NC-001808 (hRSV, L ORF), NC-001781 (hRSV B, alle ORF'ene), D10331 (PVM, N ORF), U09649 (PVM, P ORF), U66893 (PVM, M ORF), U66898 (PVM SH ORF), D11130 (PVM, G ORF), D11128 (F ORF). PVM M2 ORF'en ble tatt fra Ahmadian (1999), AF 176590 (APV-C, N ORF), U39295 (APV-A, N ORF), U39296 (APV-B-N ORF), AF262571 (APV-C, M ORF), U37586 (APV-B, M ORF), X58639 (APV-A, M ORF), AF176591 (APV-C, P ORF), AF325448 (APV-B, P ORF), U22110 (APV-A, P ORF), AF187152 (APV-C, F ORF), Y14292 (APV-B, F ORF), D00850 (APV-A, F ORF), AF176592 (APV-C, M2 ORF), AF35650 (APV-B, M2 ORF), X63408 (APV-A, M2 ORF), U65312 (APV-A, L ORF), S40185 (APV-A, SH ORF).
- 35

Tabell 5: Lengden av ORF'ene i MPV og andre paramyxovirus

	N ¹	P	M	F	M2-1	M2-2	SH	G	L
MPV	394	294	254	539	187	71	183	236	2005
APV A	391	278	254	588	186	73	174	891	2004
APV B	391	279	254	538	186	73	⁻²	414	⁻²
APV C	394	294	254	537	184	71	⁻²	⁻²	⁻²
APV D	⁻²	⁻²	⁻²	⁻²	⁻²	⁻²	⁻²	389	⁻²
hRSV A	391	241	356	574	194	90	64	298	2165
hRSV b	391	241	249	574	195	98	65	299	2168
hRSV	391	241	256	569	186	93	81	257	2162
PVM	893	295	257	587	176	77	92	396	⁻²
Andre ⁸	418- 542	225- 709	335- 393	565					2262

Fotnoter:

- 5 1. lengde i aminosyreresidier
2. sekvens ikke tilgjengelig
3. andre: humant parainfluenzavirus type 2 og 3, Sendai virus, meslingvirus, nipah virus, fokina distemper virus og New Castle sykdomvirus.
4. ORF ikke tilstede i viralt genom.

10

Tabell 6: Aminosyresekvensidentitet mellom ORF'ene i MPV og de fra andre paramyxovirus¹.

	N	P	M	F	M2-1	M2-2	L
APV A	68	55	78	67	72	26	64
APV B	69	51	76	67	71	27	⁻²
APV C	88	68	87	81	84	56	⁻²
hRSV A	42	24	38	34	36	18	42
hRSV b	41	23	37	33	35	19	44
bRSV	42	22	38	34	35	13	44
PVM	45	26	37	39	33	12	⁻²
Andre ⁸	7-11	4-9	7-10	10-18	⁻⁴	⁻⁴	13-14

Fotnoter:

1. Ingen sekvenshomologier ble funnet med kjente G- og SH-proteiner og ble dermed ekskludert.
2. Sekvens ikke tilgjengelig.
3. Se liste i Tabell 5, fotnote 3.
- 5 4. ORF fraværende i virale genom.

Referanser

Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1-3 (1994-1998). Ed. av Ausubel, F.M., Brent, R. Kinston, R.E., Moore, D.D, Seidman, J.G., Smith, J.A. og Struhl, K. Utgitt av
10 John Wiley and sons, Inc. USA.

Current Protocols in Immunology, vol. 1-3, ed. av Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M og Stobe, W. Utgitt av John Wiley and sons, Inc. USA.

15 Sambrook et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2. utg., vol. 1-3 (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Fields, Virology, 1996, vol. 1-2 3. utgave. Ed. av Fields, B.N., Knipe, D.M. og Howley, P.M. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.

20

1. Pringle, C.R., Virus taxonomy at the Xith international congress of virology, Sydney, Australia, 1998, Arch. Virol. 144/2, 2065-2070 (1999).

2. Domachowake, J.B. & Rosenberg, H.F. Respiratory syncytial virus infection:
25 immune response, immunopathogenesis and treatment. Clin. Microbio. Rev. 12(2), 298-309 (1999). Review.

3. Giraud, P, Bennejean, G., Guittet, M. & Toquin, D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigatins on a ciliostatic virus. Vet. Rec. 119, 606-607 (1986).

30

4. Ling, R., Easton, 'A.J. & Pringle, C.E. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. J. Gen. Virol. 73, 1709-1715 (1992).

5. Yu, Q., Davis, P.J., Li, J. & Cavanagh, D. Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology* 186, 426-434 (1992).
- 5 6. Randhawa, J.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R. & Easton, A.J. Rescue of synthetic minoreplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J. Virol.* 71, 9849-9854 (1997),
7. Evans, A.S. I: *Viral Infections of Humans. Epidemiology and control*, 3. utg. (red. Evans, A.S) 22-28 (Plenum Publishing Corporation, Nw York, 1989).
- 10 8. Osterhaus, A.D.M.E., Yang, H., Spijkers, H.E.M., Broen, J., Teppema, J.S. & van Steenis, G. The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the Harbor Seal (*Phoca vitulina*). *Arch. Of Virol.* 86, 239-251 (1985).
- 15 9. K.B. Chus et al. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288, 1432-1435 (2000).
10. Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D. & McClelland, M.
- 20 Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *NAR.* 20, 4965-4970 (1992).
11. Bayon-Auboyer, M. Arnould, C., Roquin, D. & Eterradoasi, N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. Of Gen. Virol.* 81, 2723-2733 (2000).
- 25 12. Mulder, J. & Masural, N. Pre-epidemic antibody against 1957 strain of asiatic influenza in serum of older people living in the Netherlands. *The Lancet*, april 19, 810-814 (1958).
13. Pringle, C.R. I: *The Paramyxoviruses*. 1. edn. (red. D.W. Kingsbury) 1-89 (Plenum Press, New York, 1991).
- 30 14. Rothbarth, P.H., Broen, J., Bohnen, A.M., Groot, de R. & Osterhaus, A.D.M.E. Influenza virus serology – a comparative study. *J of Virol. Methods* 78, 163-169 (1999).

15. Brandenburg, A.H., Groen, J., van Steensel-Moll, H.A., Claas, E.J.C., Rothbarth, P.H., Neijene, H.J. & Osterhaus, AD.M.E. Respiratory syncytial virus spesific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological responses upon infection. *J. Med. Virol.* 52, 97-104 (1997).
- 5 16. Lennette, D.A. et al., I: Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7. edn. (red. Lennette, E.H., Lennette, D.A. & Lennette, E.T.) 8-25; 37-138; 481-468; 481-494; 599-563 (American public health association, Washington, 1995).
- 10 15. Felsenstein, J. Department of Genetics, University of Washington.
[Http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html](http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html)
16. Schnell et al *EMBO J* 18, 4195-4203, 1994.
- 15 17. Collins, P.L., Hill, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R.M & Murphy, B.R. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an esential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frames of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *PNAS* 92, 11563-11567 (1995).
- 20 18. Hoffmann, E., Neumann, G., Kawakao, Y., Hobom, G & Webster, R.G. A DNA transfection system for generation of influenzae virus from eight plasmids. *PNAS* 97, 6108-6113 (2000).
- 25 19. Bridgen, A., Elliot, R.M. Rescus of a segmented negative-strand virus entirely from cloned complementary DNAs. *PNAS* 93, 15400-15404 (1996).
20. Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O.G., Pleschka, S. & Garcia-Sastre, A. Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. *PNAS* 98, 11354-11358
30 (1996).
21. Peeters, B.P., de Leeuw, O.S., Koch, G. & Gielkens, A.L. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* 73, 5001-5009 (1999).

22. Durbin, A.P., Hall, S.L., Siew, J.W., Whitehead, S.S., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA. *Virology* 235, 323-332 (1997).
- 5 23. Tao, T., Durbin, A.P., Whitehead, S.S., Davoodi, F., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Recovery of a fully viable chimeric human parainfluenza virus (PIV) type 3 in which the haemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins have been replaced by those of PIV type 1. *J. Virol.* 72, 2955-2961 (1998).
- 10 24. Durbin, A.P., Skiadopoulos, M.H., McAuliffe, J.M., Riggs, J.M., Surman, S.R., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Human parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the hemagglutinin protein of measles virus provides a potential method for immunization against measles virus and PIV3 in early infancy. *J. Virol.* 74, 6821-6831 (2000).
- 15 25. Skiadopoulos, M.H., Durbin, A.P., Tatem, J.M., Wu, S.L., Paschalis, M., Tao, T., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Three amino acid substitutions in the L protein of the human parainfluenza virus type 3 cp45 live attenuated vaccine candidate contribute to its temperature-sensitive and attenuation phenotypes. *J. Virol.* 72, 1762-1768 (1998).
- 20 26. Teng, N., Whitehead, S.S., Birmingham, A., St. Claire, M., Elkins, W.R., Murphy, B.R. & Collins, P.L. *J. Virol.* 74, 9317-9321 (2000).
27. Masural, N. Relation between Hong Kong virus and former human A2 isolates and the A/EQU12 virus in human sera collected before 1957. *The Lancet* 3. mai, 907-910
25 (1969).

Ytterligere referanser anvendt med Eksempel 4.

- Ahmadian, G., Chambers, P. & Easton, A.J. (1999).
- 30 Detection and characterisation of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses. *J. Gen. Virol.* 80, 2011-6.
- Alansari, H. & Poglietti, L.N. (1994).
- Molecular cloning and sequence analysis of the phosphoprotein, nucleocapsid protein, matrix protein and 22K (M2) protein of the ovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 75, 3597-601.
- 35

- Barr, J., Chambers, P., Pringle, C.R. og Easton, A.J. (1991).
Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence
comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of
5 pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J. Gen. Virol.* 72, 677-
85.
- Baybutt, H.N. og Pringle, C.R. (1987).
Molecular cloning and sequencing of the F and 22K membrane protein genes of the
10 RSS-2 strain of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 68, 2789-96.
- Bäyon-Ayboyer, M.H., Arnauld, C., Toquin, D. Og Etteradossi, N. (2000).
Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian
pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. Gen. Virol.* 81, 2723-33.
15
- Bermingham, A. Og Collins, P.L. (1999)
The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in
the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 96,
11259-64.
20
- Blumberg, B.M., Chan, J. Og Udem, S.A. (1991).
Function of Paramyxovirus 3' and 5' end sequences: In theory and practice. In "the
Paramyxoviruses" (D. Kingsbury, Ed.), s. 235-247. Plenum, New York.
- 25 Collins, P.L. og Wertz, G.W. (1983).
cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by
the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 3208-
12.
- 30 Collins, P.L. og Wertz, G.W. (1985).
The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide
sequence of the mRNA and a related polytranscript. *J Virol* 54, 65-71.
- Collins, P.L., Dickens, L.E., Buckler-White, A., Olmsted, R.A., Spriggs, M.K.,
35 Camargo, E. og Coelingh, K.V.W. (1986)

Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 4594-98.

5 Collins, P.L., Hill, M.G. og Johnson, P.R. (1990).

The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J Gen Virol* 71, 3015-20.

10 Collins, P.L., Hill, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chenock, R.M. og Murphy, B.R. (1995).

Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for
15 vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11563-7.

Collins, P.L., McIntosh, K. Og Chanock, R.M. (1996).

"Respiratory syncytial virus". I: *Fields virology* (B.N. Kipe, Howley, P.M., red.) Lippencott-Raven, Philadelphia.

20

Cook, J.K. (2000).

Avian rhinotracheitis. *Rev Sci Tech* 19, 602-13.

Cuesta, I., Geng, X., Asenjo, A. Og Villanueva, N. (2000).

25 Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is a RNA binding protein. *J. Gen. Virol* 74, 9858-67.

Curran, J. Og Kolakofsky, D. (1999).

Replication of paramyzoviruses. *Adv. Virus Res.* 50, 403-422.

30

Easton, A.J. og Chambers, P. (1997).

Nucleotide sequence of the genes encoding the matrix and small hydrophobic proteins of pneumonia virus of mice. *Virus Res* 48, 27-33-

35 Elango, N., Satake, M og Venkatesan, S. (1985).

mRNA sequence of three respiratory syncytial virus genes encoding two nonstructural proteins and a 22K structural protein. *J. Virol* 55, 101-10.

Fearne, R. Og Collins, P.L. (1999).

- 5 Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 78, 5852-64.

Felsenstein, J. (1989).

“Phylip-Phylogeny Inference Package (Versjon 3.2. Cladistics 5)”.

10

Giraud, P, Bennejean, G. Guittet, M og Toquin, D. (1986).

Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet Rec* 119, 606-7.

- 15 Hall, T.A. (1999).

BioEdit: a suer-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41 95-98.

Hardy, R.W. og Wertz. G.W. (1998).

- 20 The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergeinc junctions druing viral transcription. *J Virol.* 72, 520-6.

Horwath, C.M. og Lamb, R.A. (1992).

- 25 Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J Virol.* 66, 2448-55.

Jentoft, N. (1990).

Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* 15, 291-4.

- 30 Johnson, P.R., Jr. Olmsted, R.A., Prince, G.A., Murphy, B.R., Alling, D.W., Walsh, E.E og Collins, P.L. (1987).

Atigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J Virol* 61, 8163-6.

35

Juhasz, K. Og Easton, A.J. (1994).

Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J Gen Virol* 75, 2873-80.

Kyte, J og Doolittle, R.F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic
5 Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-142.

Lamb, R.A. og Kolakofsky, D. (1996).

"Paramyxoviridae: the viruses and their replication". I: Fields virology (B.N. Knipe, Howley, P.M. red.) Lippencott-Raven, Philadelphia.

10

Li, J., Ling, R. Randhawa, J.S., Shaw, K., Davis, P.J., Juhasz, K., Pringle, C.R, Easton, A.J. og Cavanagh, D. (1996).

Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses. *Virs Res* 41, 185-91.

15

Ling, R., Easton, A.J. og Prignel, C.R. (1992).

Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. *J Gen Virol* 78, 1709-15-

20

Ling, R., Davis, P.J, Yu, Q., Wood, C.M, Pringle, C.R., Cavanagh, D og Easton, A.J. (1996).

Sequence and in vitro ezpression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. *Virus Res* 36, 247-57.

25

Marriot, A.C., Smith, J.M. og Easton, A. (2001).

Fidelity of leader and trailer suence usage by the respiratory syncytial virus and avian pneumovirus replication complexes. *J Virol* 75, 6265-72.

30

Mine, M.A., Stec, D.S. og Collins, P.L. (1991).

Nucleotid sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 815-24.

35

Miyahara, K., Kitada, S, Yoshimoto, M., Matsumura, H., Kawano, M., Komada, H.,

Tsurudome, M, Kusagawa, S., Nishio, M og Ito, Y (1992).

Molecular evolution of human paramyxoviruses. Nucleotide sequence analyses of the human parainfluenza type 1 virus NP and M protein genes and construction of phylogenetic trees for all the human paramyxoviruses. *Arch Virol* 124, 255-68.

5 Morrison, T.G. (1988).

Structure, function and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res* 10, 113-35.

Naylor, C.J., Britton, P, og Cavanagh, D. (1998).

10 The ectodomans but not the transmembrane domains of the fusion proteins of subtypes A and B avian pneumovirus are conserved to a similar extent as those of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 78, 1293-8.

Plows, D.J. og Pringle, C.R. (1995).

15 Variation in the fusion glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup A. *Virus Genes* 11, 87-95.

Poch, O, Blumberg, B.M., Bougueleret, L. Og Tordo, N. (1990).

20 Sequence comparison of five polymerase (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71, 1153-62.

Poch, O, Sauvaget, I, Delarue, M og Rodo, N. (1989).

Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J.S.*, 3867-74.

25

Randhawa, J.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R. og Easton A.J. (1997).

Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J Virol* 71, 9849-54.

30 Randhawa, J.S., Wilson, S.D., Tolley, K.P., Cavanagh, D., Pringle, C.R. og Easton, A.J. (1996).

Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus. *J. Gen Virol* 77, 3047-51.

35 Samal, S.K. og Zamora, M. (1991).

- Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein diclastronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophonic protein from that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 72, 1715-20.
- 5 Satake, M og Venkatesan, S. (1984).
Nucleotide sequence of the gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein. *J Virol* 50, 92-9.
- 10 Seal, B.S., Sellers, H.S. og Meinersmann, R.J. (2000).
Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res* 66, 139-47.
- Sedlmeier, R. og Neubert, W.J. (1998).
- 15 The replicative complex of paramyxoviruses: structure and function. *Adv Virus Res* 50, 101-39.
- Stec, D.S., Hill, M.G, 3. og Collins, P.L. (1991).
Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and
20 predicted phylogeny of nonsegmentet negative-stand viruses. *Virology* 188, 273-87.
- Van den Hoogen, B.G., De Jong, J.C., Groen, J., Kuiken, T., De Groot, R., Fouchier, R.A. og Osterhaus, A.D. (2001).
A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory
25 tract diases. *Nat med* 7(6), 719-24.
- Virus Taxonomy (2000).
Seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses.
- 30 Wertz, G.W., Collins, P.L., Huang, Y., Gruber, C., Levine, S. Og Ball, L.A. (1985).
Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4075-9.
- Yu, Q., Davis, P.J., Barrett, T., Binns, M.M., Boursnell, M.E. og Cavanagh, D. (1991).

Deduced aminoacid sequence of the fusion glycoprotein of turkey rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory syncytial virus, a pneumovirus, that that of paramyxoviruses and morbilliviruses. J Gen Virol 72, 75-81.

- 5 Yu, Q, Davis, P.J., Li, J. og Cavanagh, D. (1992).
Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. Virology 186, 428-34.
- 10 Zamora, M. Og Samal, S.K. (1992).
Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homolgy with that of human respiratory syncytial virus. J Gen Virol 73, 737-41.
- 15 Primere anvendt til RT-PCR-deteksjon av kjente paramyxo virus. Primere for hPIV-1 til 4, kuma, meslinger Tupaia, Mapuara og Hendra er utviklet på huset og basert på oppstillinger av tilgjengelige sekvenser. Primere for New Castle sykdomsvirus er tatt fra Seal, J., J. et al; Clin. Microb., 2624-2630, 1995. Primere for nipah og generell paramyxovirus PCR er tatt fra: Chua, K.B., et al; Science, 288, 26. mai 2000.

20

	Virus		primere	lokalisert i protein
	HPIV-1	fwd	5'-TGTTGTCGAGACTATTCCAA-3'	HN
		Rev	5'-TGTTG/T/A)ACCAGTTGCAGTCT-3'	
	HPIV-2	Fwd	5'-TGCTGCTTCTATTGAGAAACGCC-3'	N
25		Rev	5'-GGTGAC/TTC/T/C)AATAGGGCCA-3'	
	HPIV-3	Fwd	5'-CTCGAGGTTGTCAGGATATAG-3'	HN
		Rev	5-CTTTGGGAGTTGAACACAGTT-3'	
	HPIV-4	Fwd	5'-TTC/A/G)GTTTTAGCTGCTTACG-3'	N
		Rev	5'-AGGCAAATCTCTGGATAATGC-3'	
30	Kusma	Fwd	5'-TCGTAACGTCTCGTGACC-3'	SH
		Rev	5'-GGAGATCTTTCTAGAGTGAG-3'	
	NDV	Fwd	5'-CCTTGGTGATCTATCCGIAG-3'	F
		Rev	5'-CTGCCACTGCTAGTTGiGATAATCC-3'	
	Tupaia	Fwd	5'-GGGCTTCTAAGCGACCCAGATCTTG-3'	N
35		Rev	5'-GAATTTCTTATGGACAAGCTCTGTGC-3'	
	Mapuera	Fwd	5'-GGAGCAGGAACCTCCAAGACCTGGAG-3'	N

	Rev	5'-GCTCAACCTCATCACATACTAACCC-3'	
Hendra	Fwd	5'-GAGATGGGCGGGCAAGTGCGGCAACAG-3'	N
	Rev	5'-GCCTTTGCAATCAGGATCCAAATTTGGG-3'	
Nipha	Fwd	5'-CTGCTGCAGTTCAGGAAACATCAG-3'	N
5	Rev	5'-ACCGGATGTGCTCACAGAACTG-3'	
HRSV	Fwd	5'-TTTGTTATAGGCATATCATTG-3'	F
	Rev	5'-TTAACCAGCAAAGTGTTA-3'	
Meslinger	Fwd	5'-TTAGGGCAAGAGATGGTAAGG-3'	N
	Rev	5'-TTATAACAATGATGGAGGG-3'	
10	Generelle paramyxovirus:		
	Fwd	5'-CATTA AAAAGGGCACAGACGC-3'	P
	Rev	5'-TGGACATTCTCCGCAGT-3'	

15 Primere for RAP-PCR:

	ZF1: 5'-CCCACCACCAGAGAGAAA-3'	
	ZF4: 5'-ACCACCAGAGAGAAACCC-3'	
	ZF7: 5'-ACCAGAGAGAAACCCACC-3'	
20	ZF10: 5'-AGAGAGAAACCCACCACC-3'	
	ZF18: 5'-GAGAAACCCACCACCAGA-3'	
	ZF16: 5'-AAACCCACCACCAGAGAG-3'	
	CS1: 5'-GGAGGCAAGCGAACGCAA-3'	
25	CS4: 5'-GGCAAGCGAACGCAAGGA-3'	
	CS7: 5'-AAGCGAACGCAAGGAGGC-3'	
	CS10: 5'-CGAACGCAAGGAGGCAAG-3'	
	CS13: 5'-ACGCAAGGAGGCAAGCGA-3'	
	CS16: 5'-CAAGGAGGCAAGCGAACG-3'	

30

20 fragmenter ble vellykket rensset og sekvensert:

10 fragmenter ble funnet med sekvenshomologi i APV

35	Fragment 1	ZF 7, 335 bp	N-gen
	Fragment 2	ZF 10, 285 bp	N-gen

Fragment 3	ZF 10, 300 pb	M-gen
Fragment 4	CS 1, 1250 bp	F-gen
Fragment 5	CS 10, 400 bp	F-gen
Fragment 6	CS 12, 1450 bp	F-gen
5 Fragment 7	CS 13, 750 bp	F-gen
Fragment 8	ZF 4, 780 bp	L-gen (proteinnivå)
Fragment 9	ZF 10, 380 bp	L-gen (proteinnivå)
Fragment 10	ZF 10, 250 bp	L-gen (proteinnivå)

10 Primere anvendt for RAP-PCR oppformering av nukleinsyrer fra prototype isolatet.

Eksempel 5

Ytterligere undersøkelse av de to undergruppene av hMPV

Basert på fylogenetiske analyser av de forskjellige isolatene av hMPV tileiebrakt så
 15 langt, har to genotyper blitt identifisert med virusisolat 00-1 som prototypen på
 genotype A og isolat 99-1 som prototypen på genotype B.

Vi lager en hypotese om at genotypene er beslektet med undertypene og at re-infeksjon
 med virus fra begge undergruppene finner sted i nærværet av allerede eksisterende
 20 immunitet og den antigene variasjonen er strengt tatt ikke nødvendig for å tillate
 reinfeksjon. Videre synes det som hMPV er nært beslektet med fugle pneumovirus, et
 virus som primært finnes hos fjærfe. Nukleotidsekvensene til begge virus viser høy
 prosent homologi, med unntak av SH- og G-proteinene. Her viser vi at virusene
 kryssreagerer i tester, som er basert primært på nukleoprotein og matriksproteinene, men
 25 de responderer forskjellig i tester, som er basert på festeproteinene. Forskjellene i virus
 nøytraliseringstitere tilveiebringer videre bevis for at de to genotypene av hMPV er to
 forskjellige serotyper av et virus, hvor APV er et forskjellig virus.

Kryssreaksjonen mellom de to serotypene og kryssreaksjonen mellom APV og hMPV.

30

Metoder

Protokoll for IgG, IgA og IgM antistoffdeteksjon for hMPV:

Den indirekte IgG EIA for hMPV ble utført i mikrotiterplater essensielt som beskrevet
 tidligere (Rothbarth, P.H. et al, 1999; Influenza virus serology – a comparative study. J
 35 of Vir. Methods 78 (1999) 163-169).

Kort så ble konsentrert hMPV løst ved behandling med 1% Triton X-100 og dekket i 16 timer ved romtemperatur i mikrotiterplater i PBS etter bestemmelse av den optimale arbeidsfortynningen ved dambrett titrering. Deretter ble 100 µl volumer av 1:100 fortynnet humane serumprøver i EIA-buffer tilsatt til brønnene og innkubert i 1 time ved 37°C. Binding av humant IgG ble detektert ved å tilsette et geit anti-humant IgG peroksidase konjugat (Biosource, USA). Tilsetting av TMB som substrat fremkalte platene og OD ble målt ved 450 nm. Resultatene ble uttrykt som S(ignal)/N(egativ) forholdet av OD'en. Et serum ble betraktet som positivt for IgG hvis S/N-forholdet var utover den negative kontrollen pluss tre ganger standarden.

10

hMPV antistoffene av IgM og IgA-klasser ble detektert i sera ved fange EIA essensielt som beskrevet tidligere (Rothbarth, P.H. et al, 199; Infuleza virus serology – a comparative study. J Vir. Methods 78 (1999) 163-169. For deteksjonen av IgA og IgM ble kommersielt tilgjengelige mikrotiterplater som var dekket med antihumant IgM eller IgA-spesifikke monoklonale antistoffer anvendt. Sera ble fortynnet 1:100 og etter innkubering i 1 time ved 37°C, ble en optimal arbeidsløsning av hMPV tilsatt til hver brønn (100 µl). Innkuberte 1 time ved 37°C. Etter vasking ble polyklont anti hMPV merket med peroksidase tilsatt. Platen ble innkubert 1 time ved 37°C. Tilsetting av TMB som substrat fremkalte platene og OD ble målt ved 450 nm. Resultatene ble uttrykt som S(ignal)/N(egativ) forholdet av OD'en. Et serum ble betraktet som positivt for IgG, hvis S/N-forholdet var utover den negative kontrollen pluss tre ganger standarden.

20

AVP-antistoffer ble detektert i en AVP-hemmingsanalyse. Protokoll for APV hemmingstest er inkludert i APV-Ab SVANOVIR® enzym immunoanalyse som er laget av SVANOVA Biotech AB, Uppsala Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala, Sverige. Resultatene ble uttrykt som S(ignal)/N(egativ) forholdet av OD'en. Et serum ble betraktet som positivt for IgG hvis S/N-forholdet var utover den negative kontrollen pluss tre ganger standarden.

25

30 1. Marsvin

A. (re)infeksjon av marsvin med begge undergruppene av hMPV

Virusisolat ned/00/01 (undertype A) og ned/99/01 (undertype B) er blitt anvendt for å innokulere 6 marsvin per undertype (intrarektalt, nese og øyne).

6 marsvin infisert med hMPV 00-1 (10⁶,6 TCID₅₀)

35

6 marsvin infisert med hMPV 99-1 (10⁴,1 TCID₅₀)

54 dager etter den primære infeksjonen, er marsvinene blitt innokulert med de homologe og heterologe undertypene (10^4 TCID₅₀/ml):

2 marsvin: 1. infeksjon 00-1; 2. 99-1 (heterolog)

5 3 marsvin: 1. infeksjon 00-1; 2. 00-1 (homolog)

2 marsvin: 1. infeksjon 99-1; 2. 00-1 (heterolog)

3 marsvin: 1. infeksjon 99-1; 2. 99-1 (homolog)

10 Hals- og nese vattpinner er blitt samlet i 12 dager (1. infeksjon) eller 8 dager (2. infeksjon) etter infeksjon, og er blitt testet for tilstedeværelsen av virus ved RT-PCR analyser.

Resultat av RT-PCR analyse: Figur 29

Oppsummering av resultatene: marsvin innokulert med virusisolat ned/00/01 viser
15 infeksjon av den øvre luftveien dag 1 til 10 etter infeksjon. Marsvin innokulert med ned/99/01 viser infeksjon i den øvre luftveien dag 1 til 5 etter infeksjon. Infeksjon med ned/99/01 synes å være mindre alvorlig enn infeksjon med ned/00/01. En annen innokulering av marsvinene med det heterologe virus resulterer i reinfeksjon i tre av fire marsvin, og med homologt virus i to av seks marsvin. Ingen eller få kliniske symptomer
20 ble sett i dyrene som ble beskyttet mot reinfeksjonene, noe som viser at selv med vildtypevirus, er det en tydelig beskyttende effekt av den første infeksjonen, noe som viser den mulige anvendelsen av heterologe (og selvsagt homologe) isolater som en vaksine, selv i en ikke dempet form.

25 Begge undergruppene av hMPV er istand til infiserte marsvin, selv om infeksjon med undertype B (ned/99/01) ser ut til å være mindre alvorlig (kortere periode med tilstedeværelse av viruset i nese og hals) enn infeksjon med undergruppe A (ned/00/01). Dette kan skyldes den høyere dosen som ble gitt for undertype A, eller til den lavere giftigheten til undertype B.

30

Selv om tilstedeværelsen av pre-eksisterende immunitet ikke fullstendig beskytter mot reinfeksjon med både homologe og heterologe virus, ser infeksjonen ut til å være mindre fremtredende i at en kortere periode med tilstedeværelsen av virus ble sett og at ikke alle dyrene ble viruspositive.

35

B. Serologi av marsvin infisert med begge undertypene av hMPV

Ved dag 0, 52, 70, 80, 90, 110, 126 og 160 ble sera samlet fra marsvin og testet i en 1:100 fortynning i et helt virus ELISA mot ned/00/01 og ned/99/01 antigen.

Figur 30A og B: IgG-respons mot ned/00/01 og ned/99/01 for hvert individuelt marsvin

Figur 31: Spesifisitet av ned/00/01 og ned/99/01 ELISA. Bare data fra homologe reinfiserte marsvin er blitt anvendt.

Figur 32: Gjennomsnittlig IgG-respons mot ned/00/01 og ned/99/01 ELISA av 3 homologe (00-1/00-1), 2 homologe (99-1/99-1), 2 heterologe (99-1/00-1) og 2 heterologe (00-1/99-1) infiserte marsvin.

Oppsummering av resultatene:

Bare små forskjeller i respons på de to forskjellige ELISA'ene er observert. Hele virus-ELISA mot 00-1 eller 99-1 kan ikke anvendes for å skille mellom de to undergruppene.

C. Reaktivitet til serum laget mot hMPV i marsvin med APV-antigen

Sera samlet fra de infiserte marsvinene er blitt testet med en APV-hemmende ELISA.

Figur 33: Gjennomsnittlig prosent av APV-hemming av hMPV-infiserte marsvin.

Oppsummering av resultater:

Sera laget mot hMPV i marsvin, reagerte i APV hemmingstesten på samme måte som de reagerte i hMPV IgG ELISA'ene.

Sera laget mot ned/99/01 viste en lavere prosent hemming i APV hemmings ELISA'en enn sera laget mot ned/00/01. Marsvin infisert med ned/99/01 kan ha et lavere titer (som sett i hMPV ELISA'ene) eller kryssreaksjonen av ned/99/01 med APV er mindre enn den med ned/00/01. Ikke desto mindre kan APV-natistoff hemmende ELISA anvendes for å detektere hMPV antistoffer i marsvin.

D. Virus nøytraliseringsanalyser med sera laget mot hMPV i marsvin

Sera samlet ved dag 0, dag 52, 70 og 80 etter infeksjon ble anvendt i et virus (kryss) nøytraliseringsanalyse med ned/00/01, ned/99/01 og APV-C. Startfortynningene var 1-

10 og 100 TCID₅₀ virus per brønn ble anvendt. Etter nøytralisering ble viruset tatt på tMK-celler, sentrifugert 15 minutter ved 3500 RPM, hvoretter mediet ble fornyet.

APV-testene ble dyrket i 4 dager og hMPV-testene ble dyrket i 7 dager. Cellene ble
 5 fiksert med 80% aceton, og IFA'ene ble utført med ape anti hMPV merket med fitc. Brønnene som var negative i fargingen ble betraktet som nøytraliseringstitere. For hvert virus ble en 10-loggtitrering av viruslageret og 2 ganger titrering av arbeidsløsningen inkludert.

10 Figur 34: Virus nøytraliseringstitere for ned/00/01 og ned/99/01 infiserte marsvin mot ned/00/01, ned/99/01 og APV-C.

2. Cynomologe makaker

A. (re)infeksjon av cynomologe makaker med begge undergruppene av hMPV

15 Virusisolatene ned/00/01 (undertype A) og ned/99/01 (undertype B) (1[°]5 TCID₅₀) er blitt anvendt for å innokulere 2 cynomologe makaker per undergruppe (intratrakalt, nese og øyne). 6 måneder etter den primære infeksjon er makaken blitt innokulert for andre gang med ned/00/01. Hals vattpinner er blitt samlet i 14 dager (1. infeksjon) eller 8 dager (2. infeksjon) etter infeksjon, og er blitt testet for tilstedeværelse av viruset med
 20 RT-PCR-analyser.

Figur 35: Resultater fra RT-PCR analysene på hals vattpinner fra cynomologe makaker innokulert (to ganger) med ned/00/01.

25 Oppsummering av resultater:

Cynomologe makaker innokulert med virusisolat ned/00/01 viste infeksjon i den øvre luftveien dag 1 til dag 10 etter infeksjon. Kliniske symptomer inkluderte væskene rhinititt. En andre innokulering av makakene med det homologe virus resulterte i re-infeksjon, som demonstrert med PCR, imidlertid ble ingen kliniske symptomer sett.

30

B. Serologi på sera samlet fra hMPV-infiserte cynomologe makaker

Fra makakene som mottok ned/00/01 ble sera samlet i løpet av 6 måneder etter den primære infeksjonen (re-infeksjon fant sted ved dag 240 for ape 3 og dag 239 for ape 6).

35 Sera ble anvendt for å teste tilstedeværelsen av IgG antistoffer mot enten ned/00/01 eller APV eller for tilstedeværelsen av IgA og IgM antistoffer mot ned/00/01.

Resultater: Figur 36A:

IgA, IgM og IgG-respons mot ned/00/01 for 2 cynomologe makaker (re)infisert med ned/00/01.

5

Figur 36B:

IgG-respons mot APV av 2 cynomologe makaker infisert med ned/00/01.

Oppsummering av resultater:

To makaker «macaques» er blitt vellykket infisert med ned/00/01 og i nærværet av
 10 antistoffer mot ned/00/01 er de blitt reinfisert med det homologe viruset. Responsen mot
 IgA og IgM antistoffer viste en økning i IgM antistoffer etter den første infeksjonen, og
 fraværet av den etter reinfeksjonen. IgA antistoffer blir bare detektert etter
 reinfeksjonen, noe som viser aktualiteten av immunresponsen etter en første infeksjon.
 Sera laget mot hMPV i makaker som ble testet i en APV hemmings-ELISA viser en
 15 lignende respons som til hMPV IgG ELISA.

Diskusjon/konklusjon:

hMPV antistoffer i cynomologe makaker blir detektert med APV hemmings-ELISA
 med en lignende sensitivitet som med en hMPV ELISA, og derfor er APV-hemmings
 20 EIA'en passende for å teste humane prøver for nærværet av hMPV antistoffer.

*C. Virus (kryss) nøytraliseringsanalyser med sera samlet fra hMPV-infiserte
 cynomologe makaker*

25 Oppsummering av resultater:

Seraene tatt fra dag 0 til dag 229 etter primær infeksjon viser bare lave
 virusnøytraliseringsstiter mot ned/00/01. Seraene tatt etter den sekundære infeksjonen
 viser høye nøytraliseringsstiter mot ned/00/01: > 1280. Bare sera tatt etter den sekundære
 infeksjonen viser nøytraliseringsstiter mot ned/99/01 (80-640) og ingen av seraene
 30 nøytraliserer APV C viruset.

Det er ingen kryssreaksjon mellom APV-C og hMPV i virus (kryss)
 nøytraliseringsanalyser, mens det er en kryssreaksjon mellom ned/00/01 og ned/99/01
 etter en forsterkning av antistoffresponsen.

35

3. Mennesker

Sera fra pasienter i aldersområdet <6 måneder til >20 år er tidligere blitt testet i IFA og virus nøytraliseringsanalyser mot ned/00/01. (Se tabell 1 av patent).

Her har vi testet en rekke av disse seraene for tilstedeværelsen av IgG, IgM og IgA
5 antistoffer i en ELISA mot ned/00/01 og vi testet prøvene i APV hemmings-ELISA'en.

Resultater: Figur 37

10 Sammenligning av anvendelsen av hMPV ELISA og APV hemmings-ELISA for deteksjonen av IgG antistoffer i humane sera, det er en sterk korrelasjon mellom IgG hMPV-testen og APV-Ab testen, derfor er APV-Ab testen essensielt istand til å detektere IgG antistoffer mot hMPV hos mennesker.

15 4. Fjærfe

96 kyllinger er blitt testet i både APV hemmings-ELISA'en og i ned/00/01 ELISA for tilstedeværelsen av IgG antistoffer mot APV.

Oppsummering av resultatene: Både hMPV ELISA'en og APV hemmings-ELISA'en
20 detekterte antistoffer mot APV (data ikke vist).

Oppsummering av resultater.

Vi har funnet to genotyper av hMPV med ned/00/01 som er prototypen for undergruppe
25 A og ned/991 som er prototypen for undergruppe B.

"Ifølge klassiske serologiske analyser (som for eksempel kjent Francki, R.I.B., Fauguet, C.M., Knudson, D.L. og Brown, F., Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Viro, 1991.
30 Supplement 2., s. 140-144), kan to undergrupper defineres på basisen av deres immunologiske særpreg, som bestemt ved kvantitative nøytraliseringsanalyser med dyre antisera. To distinkte serotyper har enten ingen kryssreaksjon med hverandre eller viser et homologt til heterologt titerforhold som er større enn 16 i begge retninger. Hvis nøytraliseringen viser en viss grad av kryssreaksjon mellom to virus i den ene eller
35 begge retninger (homologt til heterologt titerforhold på 8 eller 16), antas det at særpreg av serotype er tilstede hvis vesentlige biofysikalske/biokjemiske forskjeller eksisterer i

DNA. Hvis nøytralisering viser en distinkt grad av kryssreaksjon mellom to virus i den ene eller begge retninger (homologt til heterologt titerforhold er mindre enn 8), antas det at det finnes en identitet mellom serotypene hos isolatene som studeres”.

- 5 For RSV er det kjent at reinfeksjon finner sted i nærvær av allerede eksisterende immunitet (både homologt og heterologt). Infeksjonen av marsvin og cynomologe makaker med både de homologe og heterologe serotypene av hMPV viste at dette også er sant for hMPV. I tillegg viste IgA og IgM ELISA’ene mot hMPV at reaksjonen med IgA antistoffer bare finner sted etter reinfeksjon. Sera laget mot hMPV eller APV
- 10 responderer på en lik måte i APV og hMPV ELISA. Fra nukleotidsekvenssammenligningen er det kjent at virusene viser ca. 80% aminosyre homologi for N, P, M og F-genene. I ELISA’ene er det mest N- og M-proteinene som er hovedantigenene som reagerer. Virus nøytraliseringsanalyser (kjent for å reagere mot overflate glykoproteinet G, SH og F) viser en forskjell mellom de to forskjellige
- 15 seraene. Selv om APV og hMPV kryssreagerer i ELISA, viser fylogenetisk analyser av nukleotidsekvensene i hMPV og APV, forskjellen i virusnøytraliserings-titerne av seraene laget mot de to forskjellige virusene og forskjellene i vertbruk igjen at APV-C og hMPV er to forskjellige virus. Basert på resultatene spekulerer vi på om hMPV-infeksjon i pattedyr muligvis er et resultat av en zoonotisk begivenhet fra fugler til
- 20 pattedyr. Men viruset har tilpasset seg på en slik måte (dvs. G- og SH-proteinen) at en tilbakevendende (fra pattedyr til fugler) zoonotisk begivenhet synes å være usannsynlig, når man tar i betraktning tilstedeværelsen av APV i fugler.

Tillegg

- 25 *Bakgrunnsinformasjon på Pneumovirinae*
Paramyxoviridae familien inneholder to underfamilier: Paramyxovirinae og Pneumovirinae. Underfamilien Pneumovirinae består av to slekter: Pneumovirus og Metapneumovirus. Slekten Pneumovirus inneholder menneske, storfe, småfe og rovdyr luftveis syncytiske virus og pneumonia virus hos mus (PVM). Slekten
- 30 Metapneumovirus inneholder fugle pneumovirus (APV, også referert til som TRTV).

- Klassifiseringen av slektene i underfamilien Pneumovirinae er basert på klassiske viruskarakteristika, genrekkefølge og genkonstellasjon. Virus i slekten Pneumovirus er unike i familien Paramyxoviridae ved at de har to ikke-strukturelle proteiner i den 3’-
- 35 enden av genomet (3’-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5’). I motsetning til dette mangler virus i slekten Metapneumovirus NS1-og NS2-genene og organisasjonen av

genene mellom de M- og L-kodende regionene er forskjellig: 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'.

Alle medlemmene av underfamilien Paramyxovirinae har hemagglutininaktivitet, men denne funksjonen er ikke et definert trekk for underfamilien Pneumovirinae, ved at den er fraværende i RSV og APV, men tilstede i PVM. Neuraminidaseaktivitet er tilstede i medlemmer av slektene Paramyxovirus og Rubulavirus (underfamilie Paramyxovirinae), men er fraværende i slekten Morbillivirus (underfamilie Paramyxovirinae) og slektene Pneumovirus og Metapneumovirus (underfamilie Pneumovirinae).

Et annet forskjellig trekk med underfamilien Pneumovirinae er den tilsynelatende begrensede bruken av alternative ORF'er inne mRNA ved RSV. I motsetning til dette har flere medlemmer av underfamilien Paramyzovirinae slik som Sendai og meslingvirus, tilgang til alternative ORF'er innen mRNA som korresponderer for fosforprotein (P) som kan dirigere syntesen av et nytt protein.

G-proteinet i Pneumovirinae har ingen slektskap eller strukturelle likheter med HN- eller H-proteinene hos Paramyxovirinae og er bare ca. halvparten i størrelse av deres kjedelengde. I tillegg er N- og P-proteinene mindre enn deres motparter i Paramyxovirinae og mangler klar sekvenshomologi. De fleste ikke-segmenterte negative tråd-RNA-virus har et enkelt matriks (M) protein. Medlemmer av underfamilien Pneumovirinae er et unntak i at de har to slike proteiner, M og M2. M-proteinet er mindre enn dets Paramyxovirinae motparter og mangler sekvensslektskap med Paramyxovirinae.

Når de dyrkes i cellekulturer, viser medlemmer av underfamilien Pneumovirinae typiske cytopatiske effekter; de induserer karakteristiske syncytia dannelse av cellene (Collins, 1996).

30 Underfamilien Pneumovirinae, slekten Pneumovirus

hRSV er type-artene til slekten Pneumovirus og er en hoved- og utbredt årsak til sykdom i de nedre luftveiene under spedbarnsalderen og tidlig barndom (Selwyn, 1990). I tillegg blir hRSV mer og mer anerkjent som et viktig patogen i andre pasientgrupper, inkludert immunkompromitterte individer og de eldre. RSV er også en viktig årsak til samfunnsservervet lungebetennelse blant voksne i alle aldre som ligger på sykehus (Englund, 191; Falsey, 2000; Dowell, 1996). To hoved antigentyper for RSV (A og B)

er blitt identifisert basert på forskjeller i deres reaktivitet med monoklonale og polyklonale antistoffer og ved nukleinsyresekvensanalyser (Anerson, 1985; Johnson, 1987; Sullender, 2000). Spesielt G-proteinet ble anvendt for å skille de to undertypene. RSV-A og B deler bare 53% aminosyre sekvenshomologi G, mens de andre proteinene
5 viser høyere homologier mellom undergruppene (tabell 1) (Collins 1996).

Deteksjon av RSV-infeksjoner er blitt beskrevet ved å anvende monoklonale og polyklonale antistoffer i immunfluorescerende teknikker (DIF, IFA), virus nøytraliseringsanalyser og ELISA eller RT-PCR analyser (Rothbarth, 1988; Van
10 Milaan, 1994; Coggins, 1998). Nært beslektet med hRSV er de bovine (bRSV), ovine (oRSV) og rovdyr RSV (oRSV), av disse er bRSV best studert. Basert på sekvenshomologi med hRSV er ruminante RSV'er klassifisert innen Pneumovirus slekten, underfamilien Penumovirinae (Collins, 1996). Diagnose av ruminante RSV-infeksjon og undertyping er basert på den kombinerte anvendelsen av serologi, antigen
15 deteksjon, virusisolering og RT-PCR analyser (Uttenthal, 1996; Walarcher, 1999; Oberst, 1993; Vilcek, 1994).

Flere analyser av den molekylære organiseringen av bRSV er blitt utført ved å anvende humane og bovine antisera, monoklonale antistoffer og cDNA prober. Disse analysene
20 viste at proteinsammensetningen av hRSV og bRSV er veldig lik og den genomiske organiseringen av bRSV ligner den hos hRSV. For både bRSV og hRSV representerer G- og F-proteinene hoved nøytraliserings- og beskyttelses antigenene. G-proteinene er veldig variabelt mellom hRSV undertypene og mellom hRSV og bRSV (henholdsvis 53 og 28%) (Prozzi, 1997; Lerch, 1990). F-proteiner til hRSV og bRSV stammene
25 presenterer sammenlignbare strukturelle karakteristika og antigen slektskap. F-proteinet i bRSV viser 80-81% homologi med hRSV, mens de to hRSV undertypene deler 90% homologi i F (Walravens, K. 1990).

Studier basert på anvendes av hRSV og bRSV spesifikke monoklonale antistoffer har
30 antydnet eksistensen av forskjellige antigene undertyper av bRSV. Undertypene A, B og AB skilles basert på reaksjonsmønsteret med monoklonale antistoffer spesifikt for G-proteinet (Furze, 1994; Prozzi, 1997; Elvander, 1998). Epidemiologien til bRSV er veldig lik den til hRSV. Spontan infeksjon i unge storfe er ofte assosiert med alvorlige luftveistegn, mens eksperimentell infeksjon generelt resulterer i mildere sykdom med
35 lette patologiske forandringer (Elvander, 1996).

RSV er også blitt isolert fra naturlig infiserte sauer (oRSV) (LeaMaster, 1983) og geiter (cRSV) (Lehmkuhl, 1980). Begge stammene deler 96% nukleotid likhet med bovine RSV og kryssreagerer antigen. Derfor er disse virusene også klassifisert innen Pneumovirus slekten.

5

Et bestemt medlem av underfamilien Pneumovirinae, slekten Pneumovirus er Pneumonia viruset hos mus (PVM).

PVM er et vanlig patogen i laboratoriedyr kolonier, spesielt de som inneholder atymiske mus. Den naturlig ervervede infeksjonen tror man er asymptomatisk, selv om passasje av virus i muselunger resulterer i åpenbare tegn på sykdom i området fra øvre luftveisinfeksjon til en fatal lungebetennelse (Richter, 1988; Weir, 1988). Begrenset serologisk kryssreaktivitet mellom nukleokapsidproteinet (N) og fosforproteinet (P) fra PVM og hRSV er blitt beskrevet, men ingen av de eksterne proteinene viser kryssreaktivitet, og virusene kan skilles fra hverandre i virus
15 nøytraliseringsanalyser (Chambers, 1990a; Gimenez, 1984; Ling, 1989a). Glykoproteinene i PVM synes å skille seg fra dem fra andre paramyxovirus og ligner de i RSV i lys av deres glykosyleringsmønster. De skiller seg imidlertid med hensyn til prosessering. Ulikt RSV, men likt de andre paramyxovirus har PVM
20 hemagglutininaktivitet med murine erythrocytter, som G-proteinet synes å være ansvarlig for fordi et monoklonalt antistoff mot dette proteinet hemmer hemagglutinerings (Ling, 1989b).

Genomet til PVM ligner det hos hRSV, inkludert to ikke-strukturelle proteiner i dets 3'-ende og en lignende genomisk organisering (Chambers, 1990a; Chambers, 1990b). Nukleotidsekvensen til PVM NS1/NS2-genene har ingen merkbar homologi med de hos hRSV (Chambers, 1991). Noen proteiner hos PVM viser sterk homologi med hRSV (N: 60% og F: 38 til 40%) mens G er tydelig forskjellig (aminosyresekvensen er 31% lenger) (Barr, 1991; Barr, 1994; Chambers, 1992). PVM P-genet, men ikke det
30 tilsvarende hos RSV eller APV, er blitt rapportert å kode for et annet ORF, som representerer et unikt PVM-protein (Collins, 1996). Nye PVM isolater er identifisert ved virusisolering, hemagglutininanalyser, virusnøytraliseringsanalyse og forskjellige immunfluorescerende teknikker.

35 Tabell med tillegg: Aminosyrehomologi mellom de forskjellige virus innen slekten Pneumovirus av underfamilien Pneumovirinae.

Gen	hRSV'er	bRSV'er	oRSV v. hRSV	bRSV v. hRSV	bRSV v. oRSV	PVM vs. hRSV
NS1	87			68-69	89	*
NS2	92			83-84	87	*
N	96		93			60
P	-	81				
M	-	89				
F	89		80-81		38-40	
G	53	88-100	21-29	38-41	60-62	*
M2	92		94			41
SH	76		45-50		56	
L	-					

* Ingen detekterbar sekvenshomologi.

Slekten Metapneumovirus

Fugle pneumovirus (APV) er blitt identifisert som det etiologiske middelet for kalkun rhinotrakeitt (McDougall, 1986; Collins, 1988) og blir derfor ofte referert til som kalkun rhinotrakeitt virus (TRTV). Sykdommen er en øvre luftveisinfeksjon hos kalkuner som resulterer i høy sykkelighet og variabel, men ofte høy dødelighet. I kalkunhøner kan viruset også indusere vesentlige reduksjoner i eggproduksjon. Det samme viruset kan også infisere kylling, er virusets rolle som et primært patogen mindre klart definert, selv om det vanligvis assosieres med oppblåst hodesyndrom (SHS) hos oppdrettskylling (Cook, 2000). Virionene er pleiomorfiske, selv om de hovedsakelig er sfæriske, med størrelser i området fra 70 til 600 nm og nukleokapsidet, som inneholder det lineære, ikke-segmenterte, negativ tråd RNA-genomet viser helisk symmetri (Collins, 1986; Girau, 1986). Denne morfologi ligner den hos medlemmer av familien Paramyzoviridae. Analyser av proteinene fra APV og RNA tyder på at av de to underfamiliene i denne familien (Paramyxovirinae og Pneumovirinae), ligner APV mest Pneumovirinae (Collins, 1988; Ling, 1988; Cavanah, 1988).

APV har ingen ikke-strukturelle proteiner (NS1 og NS2) og genrekkefølgen (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') er forskjellig fra den hos pattedyr pneumovirus slik som RSV. APV har derfor nylig blitt klassifisert som typearten for den nye slekten Metapneumovirus (Pringle, 1999).

Forskjeller i nøytraliseringsmønster, ELISA og reaktivitet med monoklonale antistoffer har vist eksistensen av forskjellige antigene typer av APV. Nukleotidsekvensering av G-

genet førte til definisjonen av to virus undertyper (A og B), som deler bare 38% aminosyrehomologi (Collins, 1993; Juhasz, 1994). Et APV isolert fra Colorado, USA (Cook, 1999) viste seg å kryssnøytralisere dårlig med undertype A- og B-virus, og basert på sekvensinformasjonen ble den betegnet som en ny undertype C (Seal, 1998; 5 Seal 2000). To ikke-A/ikke-B APV'er ble isolert i Frankrike, og ble vist å være antigenet adskilte fra subtypene A, B og C. Basert på aminosyresekvensene til F, L og G-genene, ble disse virusene igjen klassifisert som en ny undertype D (Bayon-Auboyer, 2000).

Diagnose av APV-infeksjon kan oppnås ved virusisolasjon i kylling eller kalkun luftrørs 10 organkulturer (TOC'er) eller i Vero cellekulturer. En cytopatisk effekt (CPE) blir generelt observert etter en eller to tilleggspassasjer. Denne CPE er karakterisert ved spredte fokale områder av celleavrunding som fører til synsyttisk dannelsen (Buys, 1989). Et antall serologiske analyser, inkludert IF og virus nøytraliseringsanalyser er blitt utviklet Deteksjon av antistoffer mot APV ved ELISA er den mest vanlige anvendte 15 fremgangsmåten (O'Loan, 1989; Gulati, 2000). Nylig er polymerase kjedereaksjonen (PCR) blitt anvendt for å diagnostisere APV-infeksjoner. Vattpinner tatt fra oesofagus kan anvendes som startmateriale (Bayon-Auboyer, 1999; Shin, 2000).

K r a v s e t t

1.

Isolert negativt sense enkelttrådet RNA pattedyr metapneumovirus, k a r a k -
 5 t e r i s e r t v e d at aminosyresekvensen til N proteinet fra nevnte
 negativt sense enkelttrådet RNA pattedyr metapneumovirus er minst 91 % identisk med
 aminosyresekvensen til N proteinet ifølge SEK ID NO:1, hvori sekvens identitet
 bestemmes over hele lengden til N proteinet.

10 2.

Isolert negativt sense enkelttrådet RNA pattedyr metapneumovirus ifølge krav 1,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte negativt sense enkelttrådet
 RNA pattedyr metapneumovirus videre koder for:

- a) et P protein som har minst 70 % aminosyre identitet med aminosyresekvensen til
 15 P proteinet ifølge SEK ID NO:8;
- b) et M protein som har minst 94 % aminosyre identitet med aminosyresekvensen
 til M proteinet ifølge SEK ID NO:14;
- c) et F protein som har minst 95 % aminosyre identitet med aminosyresekvensen til
 F proteinet ifølge SEK ID NO:21;
- 20 d) et M2-1 protein som har minst 85 % aminosyre identitet med
 aminosyresekvensen til M2-1 proteinet ifølge SEK ID NO:47;
- e) et M2-2 protein som har mer enn 56 % aminosyre identitet med
 aminosyresekvensen til M2-2 proteinet ifølge SEK ID NO:55;
- f) et L protein som har minst 91 % aminosyre identitet med aminosyresekvensen til
 25 L proteinet ifølge SEK ID NO:99;
- g) et SH protein som har minst 30 % aminosyre identitet med aminosyresekvensen
 til SH proteinet ifølge SEK ID NO:63; eller
- h) et G protein som har minst 30 % aminosyre identitet med aminosyresekvensen
 til G proteinet ifølge SEK ID NO:64;
- 30 hvori sekvens identitet bestemmes over hele lengden til det respektive proteinet.

3.

Isolert negativt sense enkelttrådet RNA pattedyr metapneumovirus ifølge krav 1 eller 2,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at viruset ikke replikerer i kylling og
 35 kalkun.

4.

Isolert negativt sense enkelttrådet RNA pattedyr metapneumovirus ifølge krav 1, 2 eller 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at viruset er et svekket virus.

5

5.

Isolert nukleinsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at nukleinsyren koder for et virus ifølge hvilket som helst av kravene 1-4.

10 6.

Fremgangsmåte for å detektere et pattedyr metapneumovirus i en prøve fra et pattedyr, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter å bringe prøven i kontakt med en nukleinsyre som er minst 10 nukleinsyrer lang der nukleinsyren er minst 90% identisk med nukleotid sekvensen til humant MPV isolat 00-1 deponert ved CNCM, Institute Pasteur med aksjesjonsnummer I-2614.

15

7.

Fremgangsmåte i følge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at pattedyr metapneumoviruset er et humant MPV.

20

8.

Vektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter nukleinsyren ifølge krav 5.

25 9.

Vertcelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter nukleinsyren ifølge krav 5.

10.

30 Isolert protein, k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet er avledet fra N, P, M, F, M2-1, M2-2, L, SH eller G proteinet til viruset i følge et hvilket som helst av kravene 1-4.

11.

35 Antistoff, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet binder spesifikt til viruset ifølge hvilket som helst av kravene 1-4.

12.

Fremgangsmåte for å detektere et pattedyr metapneumovirus i en prøve, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter å bringe prøven i
kontakt med antistoffet ifølge krav 11.

5

13.

Fremgangsmåte for virologisk diagnostisering av metapneumovirus infeksjon i et
pattedyr, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten
omfatter å bestemme, i en prøve fra nevnte pattedyr, tilstedeværelse av et viralt isolat
10 eller komponent derav ved å bringe prøven i kontakt med nukleinsyren ifølge krav 5
eller med en nukleinsyre som er minst 10 nukleinsyrer lang der nukleinsyren er minst
90% identisk med nukleotidsekvensen til humant MPV isolat 00-1 deponert ved
CNCM, Institute Pasteur med aksjesjonsnummer I-2614.

15 14.

Fremgangsmåte for serologisk diagnostisering av metapneumovirus infeksjon i et
pattedyr, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten
omfatter å detektere, i en prøve fra nevnte pattedyr, tilstedeværelse av et antistoff
spesifikt rettet mot et metapneumovirus eller en komponent derav ved å reagere nevnte
20 prøve med proteinet ifølge krav 10.

15.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at
den farmasøytisk sammensetning omfatter (i) et isolert negativt sense enkelttrådet RNA
25 pattedyr metapneumovirus ifølge hvilket som helst av kravene 1-3; og (ii) en
farmasøytisk akseptabel bærer.

16.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t
30 v e d at virusets genom videre koder for sekvenser fra andre virus eller hvori
virusets genom kan mangle deler av det virale genom for dannelsen av
replikasjonsdefekte virus og kan inneholde mutasjoner, delesjoner eller innskudd for
dannelsen av svekkede virus.

35 17.

Diagnostisk kit for diagnostisering av en metapneumovirus infeksjon, k a r -

a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et virus ifølge hvilket som helst av kravene 1-3, en nukleinsyre ifølge krav 5, et protein eller fragment derav ifølge krav 10 eller et antistoff ifølge krav 11.

5 18.

Virus ifølge hvilket som helst av kravene 1-4 eller farmasøytisk sammensetning ifølge krav 15 eller 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at viruset er humant metapneumovirus isolat 00-1 deponert ved CNCM, Institutt Pasteur med aksjesjonsnummer I-2614.

10

19.

Sammensetning ifølge hvilket som helst av kravene 15 eller 16 for anvendelse i behandling eller forebygging av en metapneumovirus infeksjon eller en respiratorisk lidelse hos pattedyr.

15

1/45

Tabell 1

M							
	00-1	hRSV	bRSV	PMV	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,37	0,37	0,37	0,77	0,87	0,75
hRSV	---	1,00	0,91	0,41	0,37	0,37	0,37
bRSV	---	---	1,00	0,42	0,35	0,36	0,35
PMV	---	---	---	1,00	0,37	0,38	0,38
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,78	0,89
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	0,77
APV-B	---	---	---	---	---	---	1,00
N							
	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,20	0,22	0,21	0,40	0,52	0,40
hRSV	---	1,00	0,59	0,30	0,18	0,21	0,18
bRSV	---	---	1,00	0,31	0,21	0,23	0,21
PVM	---	---	---	1,00	0,21	0,23	0,21
APVA	---	---	---	---	1,00	0,42	1,00
APVC	---	---	---	---	---	1,00	0,42
APVB	---	---	---	---	---	---	1,00
T							
	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,32	0,33	0,37	0,67	0,80	0,66
hRSV	---	1,00	0,82	0,40	0,35	0,35	0,35
bRSV	---	---	1,00	0,41	0,34	0,36	0,34
PVM	---	---	---	1,00	0,38	0,38	0,39
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,72	0,84
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	0,72
APV-B	---	---	---	---	---	---	1,00
P							
	00-1	hRSV	bRSV	PMV	APV-A	APV-C	
00-1	1,00	0,25	0,26	0,27	0,55	0,67	
hRSV	---	1,00	0,81	0,30	0,28	0,26	
bRSV	---	---	1,00	0,29	0,28	0,26	
PMV	---	---	---	1,00	0,23	0,27	
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,52	
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	
L9							
	00-1	hRSV	bRSV	APV-A			
00-1	1,00	0,36	0,35	0,56			
hRSV	---	1,00	0,79	0,36			
bRSV	---	---	1,00	0,35			
APV-A	---	---	---	1,00			
L9/10							
	00-1	hRSV	bRSV	APV-A			
00-1	1,00	0,30	0,30	0,53			
hRSV	---	1,00	0,83	0,34			
bRSV	---	---	1,00	0,32			
APV-A	---	---	---	1,00			

Fig. 1a

2/45

Tabell 2

Alminnelig forekommende serologi av hMPV i mennesker kategorisert ved aldersgruppe ved å anvende immunfluorescens og virus nøytraliseringsanalyser

Alder (År)	Immunfluorescens analyser		Virus nøytraliseringsanalyser		
	N testet	N positive	N testet	N positive	Titerområde
<1	20	5	12	3	16-32
1-2	20	11	13	4	16-32
2-5	20	14	8	3	16-512
5-10	20	20	4	4	32-256
10-20	20	20	4	3	32-128
> 20	20	20	4	3	32-128
8-99 ¹	72	72	11	11	16-128

¹ Sero-arkeologiske analyser ved å anvende sera samlet i 1958.

Fig. 1b:

3/45

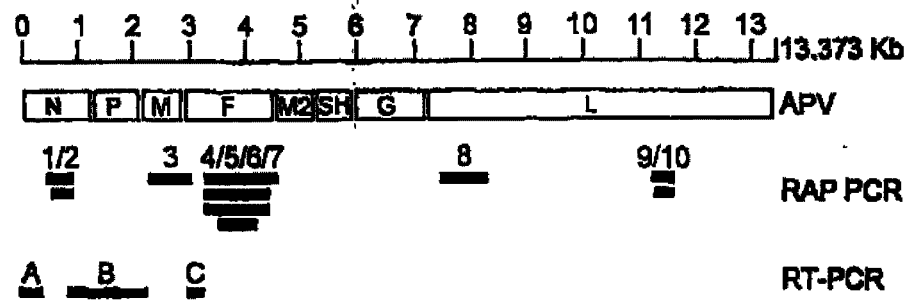


Fig. 2

Fig. 3

Nukleoprotein

[illegible][illegible]

00-1 WF	MDTKIDARSTYLFQKVIYUULFTYCHQZJESSTUBOZSLVITIMIDAYTNGQDCANGVLAESNMUOLHVSQDLKQVVFYVSVLREHVMG	30
REV A	...R.K.FE...E...Y.N.....T...RM.....A.G.....K.....	39
REV B	X.....Y.....	34
REV C	Z.....Y.....	36
bmw	LIND..N...EV..KXNIIIDV.VHF.I.GS.TIG..RV.GI.AGL..N.....V.....L.K.VK.....A.....ME..V...EYQSD.G.A.	23
hsv	LIND..N...EV..KXNIIIDV.VHF.I.GS.TIG..RV.GI.AGL..N...S.V.....L.K.VK.....A.....ME..V...EYQSD.G.A.	23
REV	EVQD..E...P.Y.IYDV..TF.L.GS.VRG...V.G..SGL..N.....V.....L.K.VK.....A.....ME..V...EYQSD.G.A.	23

00-1	WP	LLHNCBHWGLLSLNCBHPASVVLGASGLTICHTNCPVTELTSABESYUOLIKESICWFFSLOLTOZEKKAACHTLVSODGQWRE	39
APV	A	T.....A.....K.A.L.A.....AT.A.W.....LAA.....D.R.....TEY.GGB.HANNO.	39
APV	B	N.....L.....A.....R.....LAA.....E.....N.....THEG.....	39
APV	C	N.....L.....A.....R.....E.....N.....KSG.....	39
BSV		PT.TAN...S...TUF...S.....A...H.E...TFR.QD.YD.KA.BQ...BGV.Y.V.D.T.L.L.IHQ...PK.W-DVL	39
BSV		PT.TAN...S...TUF...S.....A...H.E...TFR.QD.YD.KA.BQ...BGV.Y.V.D.A.L.L.IHQ...PK.W-DVL	39
PW		PT.TAN...S...TUF...S.....A...S.K.AFR.R...D.QD.BR...DN.V.Y.V.A.N.A.L.IHQ...V.TF.PD.K	39

Fosfoprotein

00-1 #	MS	FFSKDILFMDZJULAF	QKSLRQGHRSQZIGKQVTV	ETLELPTISRAKTI	PSEWKLAFZG	CAHCHZGADK	91
AFV-A		M.S...M.O.Y	R...WTRG-CL	S.PI...IA.KVP.	PLCN.TT.	...R.CI, RQDMLV	76
AFV-C		L...A...	R.K.J.J.	R.T...V.D.II.	V.K...	KST.V.T.P.R.N.	91
hbsv						GE.POT.RQDRE.MND.	76
hbsv							80
hbsv		EX.APE	H.ED.MNK.TK.LES		LNKX	ASSQPNK.06.LVBN	43
hbsv		EX.APE	V.ED.NL.S.	LKRPSPS.P.AGIVP	SPHPLISSEK.	SPVNA.NL.S.A.	92
						PTTTP.PON.HOEDG	92

00-1	P	IKKSTKSTKVLPSGGCTGTAZGCKPSTNT	-----	KKCVFTTNER	-----	GKTKLSDGALGSLSTNVEDAE	-----	SSLTFR	-----	KVTSGLTAEALNT	18			
APV-A		...I...YLP.LPAPVAGGTTTSTT	ANK	-----	D...K.DNKV	-----	ESG.E	-----	P...ND.K	-----	K.A.F	18		
ANV-C		KKGRRLY.EVDA.T	-----	GKTFKE	-----	T.DND	-----	S	-----	R...HE.S	-----	DD...V	18	
BSV			-----		-----		-----		-----		-----	K.A.L	16	
BSV			-----		-----		-----		-----		-----		16	
BSV		DI.VIR.SFINGDININ.TGZGAGTGGT	PL.	-----	NDGSDAPPS	-----	Y.ECTIF	-----	DN	-----	EB.SYS	-----	DR.D	18
FW		VZL.ZBVC.	POWSEKPCPSDPTD.KT	-----	S.FM.T	-----	VEP.EGY	-----	LGAS	-----	YRETHZF	-----	AAQDHYE	18
				-----		-----		-----		-----		-----	NDGQ.S.V.O	18

[illegible]

00-1 P	REPORTING BODY--(LIN.	23
AFV-A	.. SECRET ..S...MEDL-L	20
AFV-C	..EE.EEENFD..L.ELOM-LLOM	29
hmv		20
hmv	SNDLS..-DE.	24
PM	..SEKSELOV..MGINF-LI	25

6/45

Fig. 3, forts.

L polymerase RAP PCR fragment 8

00-1 fragment 8 -----TNNVLRDYLKGVISSEBNGICSLINPTLSDNENKAIENPVICHVILGDDVMSRSDSYK-----TVEPQNGE 77
 APV-A MS-LSNENV.....Y.N...I.D.Y..N..ME.....Q..DALEK.LIENRE.R-----V...LME.E. 84
 bREV MGLIKENST...T.....C..L..Y..GQ.....Y.NIENCK.L'..IN..VLSIIQSFVK.NKGEAL..TTF.SL 89
 hREV MDPIDNISA...T.G.....C..L..YIENG.....Y.NIENCK.L'..IN..VLSIIQSFVK.NKGEAL..TTF.SL 89

00-1 fragment 8 IN-KNVHSCD-----TLNQPLNRKISTIKNACCOMQLK-----STSDNTSLSPINVEFI----- 13
 APV-A LI--VAGAR-----KK..EN.G...D..EV..K.VT...K.S-----Q..PGRCK.LIR.Q..KZ----- 13
 bREV L.TY.SLST..IITT..F.KIIL.AIE..DV.VIA.IAK.G..ENKVDRC-----DDN.TLSNIVNKLSEVSDNTPFTRPGRCK 17
 hREV L.TY.SKE.S.CINTE...KIL.AIE..DV.VIA.IAK.G..ENKVDRC-----DDN.TLSNIVNKLSEVSDNTPFTRPGRCK 17

00-1 fragment 8 -----PQVHNRNENFVNLGILIRKENVIRKTSIL-----CSTLGRKVVVSSVGLVSNVGRKVPSTINQL 20
 APV-A -----D.LKK..DS..LE..DV.QSY.CL..SQ.SA..--RK.SLNT.A...F...YI.R..R..IC.C..... 20
 bREV PQPDKITLCLLSGSHF.T.LKK..NLYTK..SILAY.TN.NRWE.Y..IDT.T..EQ..ILAQ.....YK.L.KIVY....P. 26
 hREV QDQTKITLCLLSGSHF..YI..NLYTK..SILAY.SN..NKN.FT.IQNT.SGQ.YIAG.....YK.L.KIVY....P. 27

00-1 fragment 8 TNDVMSRPFNNTINVENLNDQVGLNKL-----Q----- 23
 APV-ALA.....L.V.....C..B..D.L...K.VCKLIR----- 24
 bREVIS...L.VCKIT.I..C..FLAKEL...C----- 30
 hREVIS...L.VCKIT.I..C..FLAKEL...C----- 30

L polymerase RAP-PCR fragment 9/10

00-1 fragment 9/10 --KINDKITSQKITSFVDEKILSLANM--TIRGQKIDQ-----YLNKRENYRGNLIRLSAALAKHNGCTTSDC 72
 APV-A --P.S.R..VT.....N..K..ENH..L.L..--VSNVDSK-----KPAI..F.N...IV.A.TSC..C...TV.IEN 72
 bREV --ICKLNQVIR..M.L....SLQVVEVLANK.L.NPHTISGRLVVR.MED..LKVY-----TS..G..DA.IQNK 76
 hREV DYKLNQVIR..M.L....SLQVVEVLANK.L.NPHTISGRLVVR.MED..LKVY-----TS..G..DA.IQNK 77

00-1 fragment 9/10 IDNIFKQKIDGTFISRAMDPKIFLQVETGLL----- 10
 APV-A T..S..Q.E.....T...IN.TW..MS...Y...HW----- 11
 bREV DSKG..E....E.Y.T..M.L.LNV.FRAY..Y----- 11
 hREV DSKG..E....E.Y.T..M.LNV.FRAY..Y----- 11

7/45

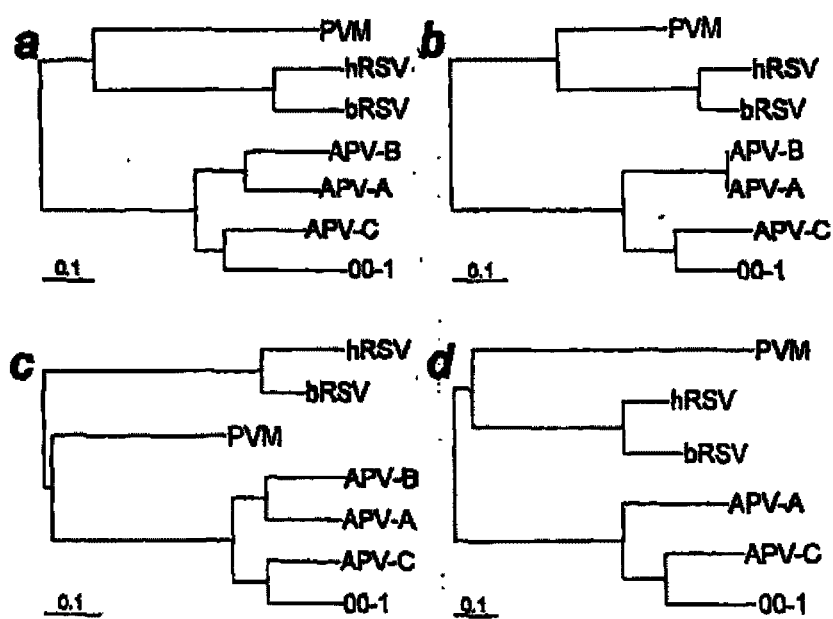


Fig. 4

8/45

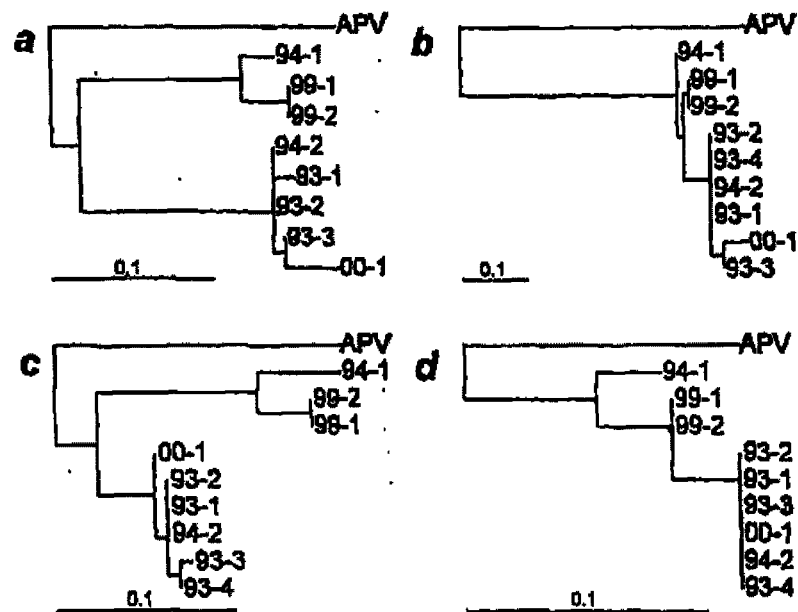


Fig. 5

Fig. 6A, forts.

[illegible]

[illegible]

13/45

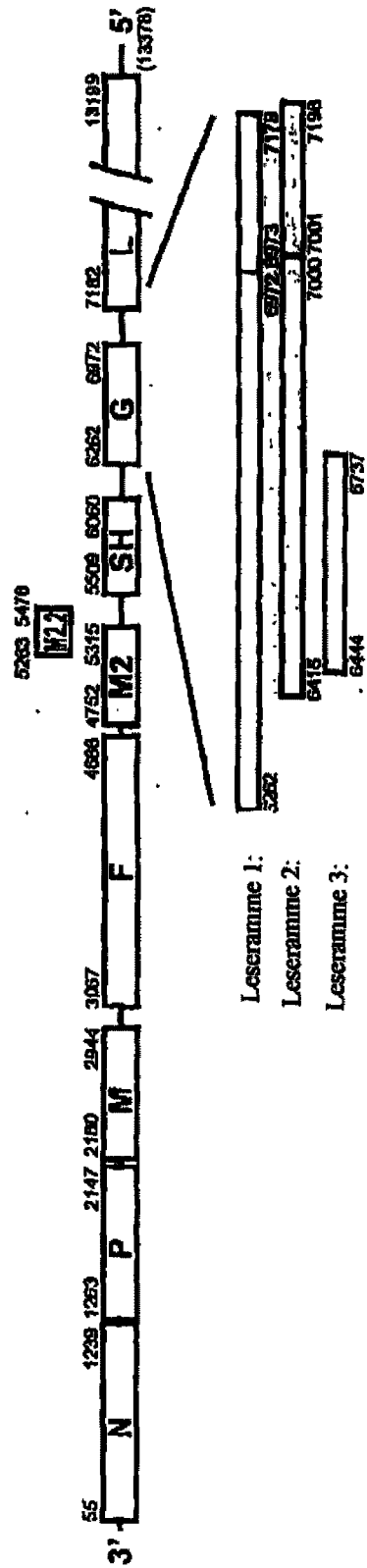


Fig. 7

14/45

Fig. 8

50
 BMPV MSIQGHLSDLSYKQAILKESQYTIKRDVGTTAVTPSSLOQEITLLCGE
 APVCQ.....R.VS.....
 APVBES.R.....E.....D.....R.....A.....I.....E.....PKVST...M
 APVAES.R.....E.....ED.....K.....A.....I.....E.....PQVST...M
 HRSVA .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DSIDTPNYDV.KH.NK...M
 HRSVB .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DNIDTPNYDV.KH.NK...M
 BRSV .A.SKVK.N.TLN.DQL.SS.K...Q.ST.DNIDTPNYDV.KH.NK...M
 PVM ...DRLK.N.V.N.DSL.SNCK.SVT.ST.DV.S.SGHAM.KALARTL.M

100
 BMPV ILYAKKADYKYAAEIGIYISTALGSEVQOILANSSEVQVLTRTYSZ
 APVCT...SH...V.M.V...T...A...T...K.....A...K...
 APVBF.....EP...QV.M.....ADKT...KS.....G.M.KIVT...
 APVA V.F...T...EF...V.M.....AD.T...K.....G.M.KIVT...
 HRSVA L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTIK...DA.YN.KANGVDVTH
 HRSVB L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTIK...KDA.YN.KANGVDITTH
 BRSV L.ITED.NH.FTGL..ML.AMSR..R.DTLK...KDA.YN.KANGVDVTH
 PVM F.LTAFNCEEV...L.AMSL..RODSIK...EA.YN.KC.B.OLKOF

150
 BMPV GKIKNNKGEDLOMLDINGVEKSWVEEIDKEARKTMATLLKESSGNIPQNG
 APVC ..G..S...E.....R..I..V.....SAT.DN..F....
 APVB PAEGFIR--KREV.N..DIGPA.ADVERT..E..SLMV..K-AQ..K..
 APVA SAEGSVR--KREV.N..D.GVG.ADVERTT.EA.GAMVR..K-VOLTK..
 HRSVA RQDI.G.EMKFEV.TLSSLTSEIQN.EI.S..SYKGM...M-EVAPEY
 HRSVB RQDI.G.EMKFEV.TLSSLTSEIQN.EI.S..SYKGM...M-EVAPEY
 BRSV RQDV.G.EMKFEV.TLSSLTSEIQN.EI.S..SYKGM...M-EVAPEY
 PVM TIKLQG.EYKI.V...V.IDAANLADLEIQ..GVV.KG..TG-ARL.D.R

200
 BMPV RPSAPDTPI...
 APVC ...S..A...I.....V.....A.....N.....F..
 APVB K...L.A.V...I.....V.....AI...S.....IS...
 APVA K...L.A.V...I.....V.....AI...S.....IS...
 HRSVA .NDS..CGM.I..IA..VI...AGDRS..TAVI...N..KNEM...KG
 HRSVB .NDS..CGM.I..IA..VI...AGDRS..TAVI...N..KNEM...KG
 BRSV .NDS..CGM.V...A..VI...AGDRS..TAVI...N..RNEM...KG
 PVM .ND...CGV..V..IA..VVS...AGDRG..DAVE...LN..KAEKA...N

250
 BMPV ~~MDINCKK...
 APVC I.....Y.....
 APVB ...R..K..FE...K...Y.N.....T.S..RM.....
 APVA ...R..K..FE...K...Y.N.....T.S..RM.....
 HRSVA LEPKD..N...EV..KNPHFIDV.VNF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
 HRSVB LIPKD..N...EV..KNPHFIDV.VNF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
 BRSV LIPKD..N...EV..KYPHYIDV.VNF.I.QS.TRG..RV.GI.AGL..N
 PVM .EVKQ..E.....R.F.YIDV..TF.L.QS.VRG...V.G..SGL..N~~

300
 BMPV ~~PLKSCOMLRNG...
 APVCR..V.....R..S.....K.....
 APVBR..V.....R..S.....K.....
 APVAV.....L.K.VK.....A.....ME..V...EYACKL.G.A.
 HRSVAS..V.....L.K.VK.....A.....ME..V...EYACKL.G.A.
 HRSVBV.....L.K.VK.....A.....ME..V...EYACKL.G.A.
 BRSVV.....L.K.VK.....A.....ME..V...EYACKL.G.A.
 PVMV.....L.K.VK.....A.....ME..V...EYACKL.G.A.~~

350
 BMPV ~~MDINCKK...
 APVCN.....L.....A.....
 APVBTS.....A.....K..A..L.....
 APVAT.....A.....K..A..L.....
 HRSVA FY.IILNN...S...TQF..R.S...A...M.E...TPR.QD.YD.
 HRSVB FY.IILNN...S...TQF..R.S...A...M.E...TPR.QD.YD.
 BRSV FY.IILNN...S...TQF..R.S...A...M.E...TPR.QD.YD.
 PVM FY.I.NN...R...T...T...A.....S.K.APR.R...D.~~

395
 BMPV AESYAKSLKESNKNINTSSLGITDEEKAENTIANVSDDS-QNOYE
 APVCR.....E.....N...INEEG-.....
 APVBR.....LAA...ED..R...TSY.GGDE..K-SQKF..
 APVART.R.N...LAA...D..R...TSY.GGD..ER-SQKF..
 HRSVA .KA..EQ...NGV..Y.V.D..A..L..IKQ..PK.N--DVEL-
 HRSVB .KA..EQ...NGV..Y.V.D..A..L..IKQ..PK.N--DVEL-
 BRSV .KA..EQ...NGV..Y.V.D..T..L..IKQ..PK.N--DVEL-
 PVM .KD..ER..DN.V..Y.A.N..A..R.LISQ..IV..TPDO..I-

15/45

Fig. 9

50
 HMPV HSPFPGCKEILFMGWEAAKLAEDJONELKXPGHRS-----QSIIGEK
 APVCL.....A.....R..L.I..R.T.....V.D.
 APVBM..S.....Y.O.IENSTSV,-----R..S.DP
 APVAM..S.....M.D.Y.R...NTSAGG-----R..S..F
 HRSVA ---M.KFAPE.H.ED.NNK.TK.LE,-----
 HRSVB ---M.KFAPE.H.ED.NNK.TK.LE,-----
 HRSV ---M.KFAPE.H.ED.NNK.TK.LE,-----
 FVM ---M.KFAPE.V.ED.N.K..E.L.NAST.SR.FLAGIPHTATHVTKYMM
 100
 HMPV VMTVSETLEPTTSRFAKPTIPSEPKLANTDMOGATKTEIKQAIKVHDFI
 APVC II.....V.K...KST.V.T.P.R.W..GE.PDT.RSOTER.NWEAT.E
 APVB .S....KVP..PLCSSETS-----R.ACIRPT-.STLPRK--
 APVA I..LA.KVP..PLCN.TT,-----SCI.EN-.APVPKVK--
 HRSVA ---IKGKFTS,-----KDPKX.DS.ISVNS.
 HRSVB ---IKGKFTS,-----KDPKX.DS.ISVNS.
 HRSV ---IKGKFTS,-----KDPKX.DS.ISVNS.
 FVM PPIIASSEK..SPKVA.NL.E..A.P---TTPPP.PPQN.EEQPKESDV
 150
 HMPV EREESTKKVLPSSDGKTEAEKOLKPSYNIKK-----VSFTNEPGKYT
 APVC DASRLY.EVFA.T.....GKTFEPK-----T.KND.S.A..
 APVB .V.SIYP.LPIAPP.AMIETANPIGAPQQAQ.R-----X.ESSKA...
 APVA .I.SIYP.LPIAPPVATO.YTSTETERAKES,-----K.DMPKV...
 HRSVA DI.VTK.SPITSH.TIIM.TWETDDTAG.KMYORKPL...KEOPTSDN
 HRSVB DI.VTK.SPITSGINIIM.TSEADSTETKMYPRKPL...KEOPTSDN
 HRSV DI.LFK.SPITSTNQINQPSZINDTATNQVHIRKPL...KEEL.SSEN
 FVM DI.TMWVC..PDHBERSEKPCCSDDTD.TKT---AKPM.T.VEP.EKFEV
 200
 HMPV KLEKDALDLSO-MEEDAESSILTFKMD---TSLSYSEKLESIEKLS
 APVC ..ME..E.....DD.....V.....K---A..L.....D...
 APVB ..EE..E.....PD.DM.EK..V.....K---NPS.....A...
 APVA ..ERG.E.....PE.DM.EK.....K---N.T.....A...
 HRSVA PFS.LYKETIETFDNW--E.E.SYSY,INDQ.NON-T...DR.D...
 HRSVB PFS.LYKETIETFDNW--E.E.SYSY,INDQ.NON-T...DR.D...
 HRSV PFTRLYKETIETFDNW--E.E.SYSY,INDQ.NON-T...DR.D...
 FVM LGASLYRETNGTFAADGYD.E.N.S...TNOEPC.S.V.O..DR.....
 250
 HMPV MYLGCLRTLMYATAGPTAARDGYHAGTGVRELLADIIKEARKK-----
 APVCV.....V.L.....
 APVBM.K..S.....V.....NS.NA..
 APVAM.K.....M.....NS.MT...D...
 HRSVA E...M.R..VV.S.....S.....L...M.EK.RT..LMTNDRL
 HRSVB E...M.H..VV.S.....S.....V.L...M.EK.RA..LMTNDRL
 HRSV E.I.M.H..VV.S.....S.....V.L...M.EK.RS..LMTNDRL
 FVM Y.I...N.IMV.....T...E...L..T...EM.KSILATVNDRTV
 300
 HMPV -AAEMEECHSQRKICMGSVILTEKAKELNKIVEPSTSCHEBSEBHHK
 APVCK..AK.K.....G.....
 APVB -I...IK..DA..A...D.....R...JOM
 APVA -I...K..DT..A...D.....I...S...
 HRSVA AM.RLKN..SEKMA.DTODE.S.NPTEK..MLL.G-----N
 HRSVB AM.RLKN..SEKMA.DTODE.F.NETS.K.SDLL-----N
 HRSV AM.RLKN..SEKMT.DTODE...PTSEK..MVL-----E
 FVM AMEKLRD..C.RADTOGGAZY..DR.BI.D...SSNA-----E
 316
 HMPV PTQDMSQHDIIYOLIM
 APVC :BRESNED..L.S.T.
 APVB BRTDGEN...SFD.
 APVA BMSDEBLS...N.DL
 HRSVA .SONDLSE.F-----
 HRSVB .SONDLSE.F-----
 HRSV BSONDLSE.F-----
 FVM EAKEDLOV...MGINF

16/45

Fig. 10

50
 RMFV MESTYLDYQGISIAAWUDLIZEDLLNSELTIMPFLQANTSPAVILLO
 APVCV.....T.V...Q...R.V.V...T...T...E
 APVBII.....V.....V...MN...K...V...SS...AP...
 APVAII.....V.....SM...T...V...SS...AP...
 HRSVA ..T.VNKLHE..ST.....TNVL...DD.....V.M...SSM.ADL.IK
 HRSVB ..T.VNKLHE..ST.....TNVL...DD.....V.M...SSV.ADL.IK
 BRSV ..T.VNKLHE..ST.....TNV...DD.....V.M...SSISADL.IK
 PVM ..A...EM.N.V...LN.V...ERNY...V.I.M...TEL.KNSVM.
 100
 RMFV QLKTLITITLYARSONGETILKNVBAQGANMSVLPKKTEVNATVALDEYS
 APVCT.....A...S.D.S.S...D...
 APVBS...Q.TV.FE...V.Q...T.....A...S.S.AA...
 APVAS...Q.T...FE...V.Q...A...A...S.A...
 HRSVA E.ANWN.LVKQISTEK...S.R.MINERS.VLAQH.S...TIC.N.S...R.
 HRSVB E.ANWN.LVKQISTEK...S.R.TINERS.VLAQH.SW.IIS.N.S...R.
 BRSV E.ANWN.LVKQISTEK...S..MINERS.VLAQH.S...TIS.N.S...R.
 PVM L.KDV.VICTQISTVH...MI...DL.SSM.GLATH.RQ.LY...II...DMG
 150
 RMFV KLETKITVCEVTVYLTITKPYGNVKNFVBSAKSVGKTRHOLIALCDPM
 APVCL.A.....N...A.....L
 APVBD.GV...D.RA...L.....I.TNMT...R.....I
 APVA R...GT...D.RSI...L.....INTDVR...R.....I
 HRSVA ..AY.VT.P...I.ACS...CL.SKN.LITVKDLTMTKTFNP...I...E.E
 HRSVB ..AY.VT.P...I.ACS...CL.VKS.LITVKDLTMTKTFNP...EI...E.E
 BRSV ..AY.IT.P...I.ACS...CL.VKN.LITVKDLTMTKTFNP...EI...E.E
 PVM RMQYEVVAFOK.SECV.IL...KN.LATVP.ITP-TNRD...E...V.S.N
 200
 RMFV DLEKNTPTIPIAFIKSVSIKESSESATVERAISSEADQALTOAKYAPYAGL
 APVCGV.....Y.....G...I...R.....
 APVBM.RGI.....Y.A...D.....G...I...R.....
 APVA ..Y...GV.I...Y.A...D.....G...I...R.....
 HRSVA NIVTSKK.I...TYLA.I.VNMDLN.L.NIIT.FGN.I.N...I...S...
 HRSVB NIVTSKK.I...TYLAPI.V.NKOLNBL.NIAT.FGN.I.N...I...
 BRSV NIVTSKK.V...T.LR.INV.AKOLDL.NIAT.FGN.I.N...I...
 PVM NRVTLKSPW..V...RALY.RQQGLDS...Q....DV.R.I.T.RV.....
 250
 RMFV IMIMTNWNEKGIKKLGASTQVIVELGAYVOAESISKICKTWSKQCTRYV
 APVCV.....R...RM.....
 APVB ..LL.A.....R.....P.....LG...N...R...I
 APVA ..L.....N.....P.....LG...N...R...
 HRSVA LLVI.VTON..A..YIKPOS.F..D...LEK...YYVITN.K.TA..FA
 HRSVB VLVI.VTON..A..YIKPOS.F..D...LEK...YYVITN.K.TA..FS
 BRSV VLVI.VTON..A..YIKPOS.F..D...LEK...YYVITN.K.TA..KFS
 PVM TLVINITST..A..L.K..S.XIA...P.LTGV.LHDVINN.K.T..S.I
 258
 RMFV LKSR----
 APVC
 APVB
 APVA ..R.....
 HRSVA I.FMED--
 HRSVB I.FLED--
 BRSV I.FIED--
 PVM ...SSTSG

Signalpeptid

100

MPVMKNKPVIIISLLINPDRKESYLESSITTEGYLEVLRGTWYNFTLEVGQVTLKADGPF.....LNTLELITHEALASLSTVADQ
APVCLLLV..A..TG..E.....V..R.....R.....E.....N.....E.....K.....
APVBYL..LL..TY..VVGASGKD.T.S.....V..R..K.....N..I..N..I..N.....S.....S.....Q.....Q.....
APVADVRICLLF..ISM..SSCIG.T.N.....V..R..K.....N..I..N..I..N.....D.....V.....M.....K.....
NRSAV MELLIKRARRAIFTLIA.NA.YL.SSONIT.EFYOST..AVSR..A.....S..I..I..LSNIKETI..NGTDAKVK..Q.....KY..N..VT..QLIMONT
NRSVB MELLIKRARRAIFTLIA.NA.YL.SSONIT.EFYOST..AVSR..F.A.....S..I..I..LSNIKETI..NGTDAKVK..Q.....KY..N..VT..QLIMONT
BRSAV MESTAMMELI..LITSTVTN..LCONIT.EFYOST..AVSR..A.....S..I..I..LSNITON..KSTDKVK..Q.....ERYMN.VV..QSLIMNE
PVMMISGRIFLVLLV..NTKPIFPT.T.R.Y.SL..VN..A..K.A.....HMT.MAKLSQIMZES..KSSN.....LAN..AITS..VD...L.SN

Fusionsdomene

200

MPVLAREDO.....TENF.....FVLGATAGLOVATAAAPPZAVAKTITILESEVATONALKTHEAVSTLGVGVATATAVALK
APVCK.A.N.....MS.....G.....A.....G.....R.....ND.
APVBITK.NR.....LSR.....T.....L.....G.....K.....L.....RS.....I.....ND.
APVAV.K.SR.....LS.....G.....K.....SN.....ND.
NRSAV PFMARRARELPDITVITLAKKTHVLSK..K..LG--FL..G--S..IAS..VS.VLM..G..NK..S..LS..K..VS..S.....S..TSK.LD.
NRSVB P.AARRARELPDITVITLAKKTHVLSK..K..LG--FL..G--S..IAS..I.VS.VLM..G..NK..LS..K..VS..S.....S..TSK.LD.
BRSAV P.SPFAARRGIFELITFANTIKKIFELACK..K..LG--FL..IG--S..AS..VS.VLM..G..NK..LS..K..VS..S.....S..TSK.LD.
PVMALSKR..K..LG--LT..LG.....L.....VD.....IAL..ND.VRM.....VS.T..MS.....KV..ED.

300

MPVDEVSRLTRAINK.....DIADLMOVSVISQFNRRILNVVQPSWAGITPAISLDIMTDAELAAKAVSNMPTSGAGIKULENRANVRKFGILIGVIGS
APVCI..K..P.....R.....S.....G.....Y.....V.....S.....N.....I.....
APVBE..I..K..P.....Q.....V.....IR..I..G.N.....S.....S.....V.....VK..INA.....S.....S.....N.....I.....GT
APVAE..I..K..P.....Q.....N.....I.....I..G.N.....S.....S.....V.....O..V..INR.....S.....S.....N.....I.....DOT
NRSAV NYID.Q.LFTV..QS..E.SNIETVIE.Q.K.N.L.EIT.E.V..V.TFV.TYML.NS..LSLIND..ITND.K.....SN.VOI..QOYSIMILKEV
NRSVB NYIDN.Q.LFTV..QS..E.SNIETVIE.Q.K.N.L.EIN.E.V..V.TPL.TYML.NS..LSLIND..ITND.K.....SS.VOI..QOYSIMILKEV
BRSAV NYID.E.LPQV..NRH..A.SNIETVIE.Q.K.N.L.EIA.E.V..V.TPL.TYML.NS..LSLIND..ITND.K.....SS.VOI..QOYSIMILKEV
PVMN..I..E..LSP..RVSL..VM..ITAVIR.Q.D.N.L.E.S.E..S.....L..ETV.SPHL..R..TSI.GG.AV.....KEI..GSK..IM..N..LAI..SS.WADT

400

MPVVIMVQLPIFGVITD.....NIVKAAPSGG--KKGNVYGLANDGGVYGMAGSTVYENKGL..ETRGDKVYGMATANGINVAQSGK..KNTSTNYIKVBE
APVCV..I.....K.....K.....D.....K.....D.....E.....V..S.....KE..E.....K.....
APVBV.....E.....R..V.....RK--EHS.....F.....A.....D.....V..D..Y.....SEVE.....R.....ST
APVAV.....E.....R..V.....RK--E.....F.....A.....D.....V..D..Y.....LEVE.....Y.....SK
NRSAV LA.V.....LY.....KLTS..E..ITMT.E.SNI..T.T.R.....D.....A.....VSTI.QAT..KVQSNR.....MSLTLPEZIKV..VD..TWPK..I..IM
NRSVB LA.V.....Y.....KLTS..E..ITMT.E.SNI..T.T.R.....D.....VSPF.QAD..KVQSNR.....MSLTLPEZIKV..TD..FNPK..I..IM
BRSAV LA.V.....Y.....KLTS..E..ITMT.E.SNI..T.T.R.....D.....VSTI.QAT..KVQSNR.....MSLTLPEZIKV..VD..FN.K..I..IM
PVMLV.VI.....L.....M..I..VIASSI..NN--IAOK..A.A.N.....N.....LS..F..3PT..IHNGYA.....LCLT..PVT..R.....S..MY.....I..I

500

MPVTGRHFIRKVALSPGLALV.....FKGVSSIGGNRVGIINOLNKE.....YITINODADTVIINDTVYQLSKVEGCHVIGKPFVSSSPDPVNTFDCNVALDOV
APVCV.....T.....G..S.....E.....D.M.....K.....RP.G.....S.....T.....R.....N.....IE.....I
APVBV.....T.....G..S.....E.....K.....K.....FN.P.NE.....I.....I.....V.....RT.....A..VNM..K..LL.....
APVAV.....T.....G..S.....E.....K.....K.....FN.P.NE.....I.....I.....V.....RT.....A..VNM..N..LL.....
NRSAV .SKTD..SSVITS..I..S..GKTH..FASHQR.....TFBN..O.VS..KGM..SVG..L..YVM.Q..KSLYV..E..IINY..LV..S.E.DASIA..N
NRSVB .SKTD..SSVITS..I..S..GKTH..FASHQR.....TFBN..O.VS..KGM..SVG..L..YVM.Q..KSLYV..E..IINY..LV..S.E.DASIA..N
BRSAV .SKTD..SSVITS..I..S..GKTH..FASHQR.....TFBN..O.VS..KGM..SVG..L..YVM.Q..KSLYV..E..IINY..LV..S.E.DASIA..N
PVMSKTIV..TAN..T.M.C..S..GHN..FVIN..DK.....RT..FD..A..S..KGV..R..QVG.....Y.....EV..KSI..VR..E..LVLY..LS..D.K.D..IRD..F

Membranforankring

583

MPVEYISNQALVDSQVALLSRAE.....KGTGTFVITLXAVIGVQSLVSVTIIKKTKKTC---AP--PELSGVTNNGPFPN
APVCV..K..N..I.....K..D..Y.....A..V.....V..VL..MEAAVG..G..FVV..R..AUK---F..M..MN..N..K.....
APVBV..K..N..I..X..K..D..DIEV.....S..I..A..A..TILV..SGLX..VOIAYVV..R..AK..S---NGY..NTT..QD..M..Y..S---
APVAD..R..D..I..K..D..L..GADA.....SIA..IA..A..VLVI..I..FTL..AVIYCKSRV..TKPK---HDY..ATT..KSHMAYV---
NRSAV .K..N..L..PIRK..DEL..HNVN---AG..ST..WM..TT..I..VIIIVLLS..IA..GLLYCKA..S..P-VTLKQD...IN..IA..SN
NRSVB .K..N..L..PIRK..DEL..HNVN---TG..ST..WM..TT..I..VIIIVLLS..IA..GLLYCKA..N..P-VTLKQD...IN..IA..SK
BRSAV .K..N..L..PIRK..DEL..HNVN---TG..ST..WM..TT..I..VIIIVLLS..IA..GLLYCKA..S..P-VTLKQD...IN..IA..SK
PVMH..KTRIFPKA..QZL..DLS..NRN..NLSKY..LTT..LF..VGLII..MAVCP..LY..VL..MTRDNKLSKSTP..L..VLS---

18/45

Fig. 12

A

```

      50
RMFV  MSHAPCKMAMKONHGHGACZNNHINWBNPTTLLSENTEMLLEBN
APVC  .....L.....
APVB  ..GAN..R..T..A.....S..T.....HV..V..A..M...V...
APVA  ...RN..R..I.....S..T.....HV..V..A..M...
HRSVA ...RN...F..I...H..LN..KR..H..S...FE..PHA..V..Q..FM..RI..KSM
HRSVB ...RN...F..I...H..LN..RR..HYS...FE..PHA..V..Q..FM..KI..KSM
BRSV  ...RN.....I..E..LN..KK..H..S...FE..PHA..V..Q..FM..KI..KSM
PVM   ..VR...F..Q..F..B..RN..YS..X..E..LKT..ML..Q..M..RIY..FL
      # 100
RMFV  DRAHGLETTTSAGSEBNTIONPTTSTNVOGYIDMQSITKAAACYSLN
APVC  ..S-...L.....D.....N...N..EN...ST...Y
APVB  ..T-...L.....A.....N..EG..AT...S...Y
APVA  ..T-...L.....A.....N..EG..TT...S...Y
HRSVA ..KSI..T..E...AEL...EEYA..VVG..LES..GSINN...QS..VAMS
HRSVB ..KSI..T..E...AEL...EEYA..IVG..LES..GSINN...QS..VAMS
BRSV  ..NN..T..E...AEL...EEYA..VIG..LES..IGSINN...QS..VAMS
PVM   .TWT..AI..DV..FDAPO..AAYA..TIG..LKS..LEKTN...SI..G..I
      150
RMFV  NIIOQLQEVVROARDNKLSDSKVALKNLVLSTYEMS-KTPASLINNLK
APVC  .....TD.....VD.....
APVB  .....ND..KS...LMVD..P.....ID...N..N...S...
APVA  .....ND..KTS...SM..E..P.....Y...VD...N...S...
HRSVA KLLTE..NSDDIKKL...EELN..PKIRVY..T..I..I..SNR..NNKOT..HL..
HRSVB KLLTE..NSDDIKKL...EELN..PKIRVY..T..I..I..SNR..NNKOT..HL..
BRSV  KLLAEINNDIKRL..NKEVPT..PKIRIY..T..I..I..DSNQRNTKOT..HL..
PVM   TVLQN..DVGL..I....SNT..TNYLRSC..TI...IOTKL..K..QOI..HI..
      195
RMFV  RLPREKIKKLAKLIIDLSAGAE--NDSSYALQDSESTNQVQ---
APVC  K..K.....E....V...TA..M...ANSD-----
APVB  ...K.....I..Q....S..GE..AN..NT..KGD..S-----
APVA  .....I..LQ....F..SD..A..GNT..KGD..N-----
HRSVA ...ADV...TI..NTL..IKSITIM..PKESTVS..TNDHAKQNDTT-
HRSVB ...ADV...TI..NTL..IKSITIS..PKESTVN..QNDQTKNNDITG
BRSV  ...ADV...TI..NT..IHNEINGN..QGDITVNEONE-----
PVM   ...VGV..CN..IQSV..SIEEKINGEMKTE-----

```

B

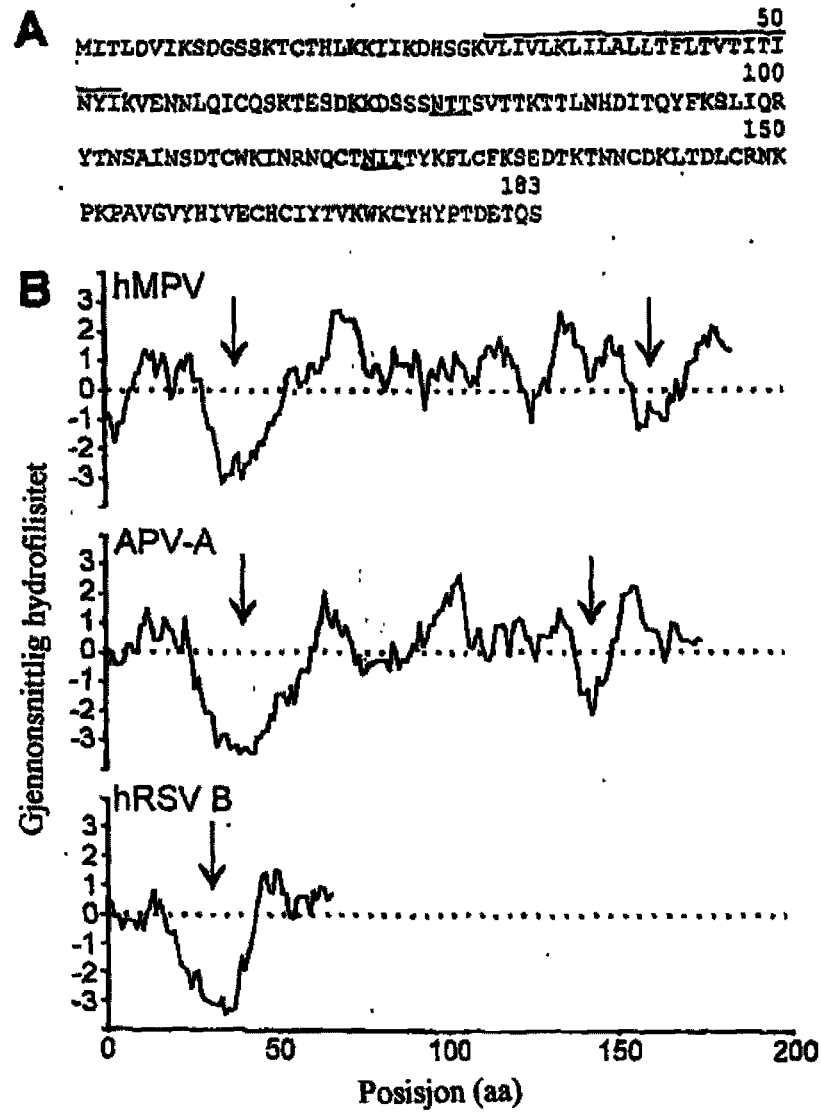
```

      50
RMFV  -----MTLHMP-CKTVKALIKCS-----ERGFVFTTIEVDDMIW
APVC  -----OL...I..QT...G-----LI..LQOKL...V.
APVB  -----FIVI...R..T..V..R..N-----TL..VCLFKRTYERN..I
APVA  -----FIVI...RR..T..I...N-----AL..LCHVRKIY..YS..A
HRSVA MTHPKIMILEPKY..-SITSI..TERCRVTMYNQKNTLY..NQNNPNWNY
HRSVB MTKPKIMILEPKY..-SISII...SSESHLATFNHKNILQ..NNNL..NHQR
BRSV  MNNWSNIIIFEKY..-SISII...NENDVIVLSHONVLDYLOFYPCNMY
PVM   MQSDPICHLRGGEOKFFYENRM..RLPKYYPAILHMQYIIRVNRNLTYDGS
      97
RMFV  THKOLKEA---L---SDGIVKSWTNIYNCYLENIEIIYVKAYLS---
APVC  .MVE..VDI---I---TE...V..A..FK..R..D.....TF-----
APVB  NLG..I..E---V---ARM..IID..I..RQQ..NECRKDFEF..AV..T..YT--
APVA  SWS..I..E---V---ANMVLID..I..RQQ..VECRKDFEFIAI..T..YN--
HRSVA SPNQTFNE---IHWT..QELIDITQ..FLOHLGATED..YTIYILV.----
HRSVB LLNWFDE---IHWT..QELIDITQ..FLOHLGATED..YTIYILV.----
BRSV  SQNHMLDD---IYWT..QELIEDVLK..LHLSGIS..SKYVIYVLVL----
PVM   GPSTIID..GKSVVWNRVDVLACVKEALC..IEFSWNNQVIZIDFOYSQAR

```

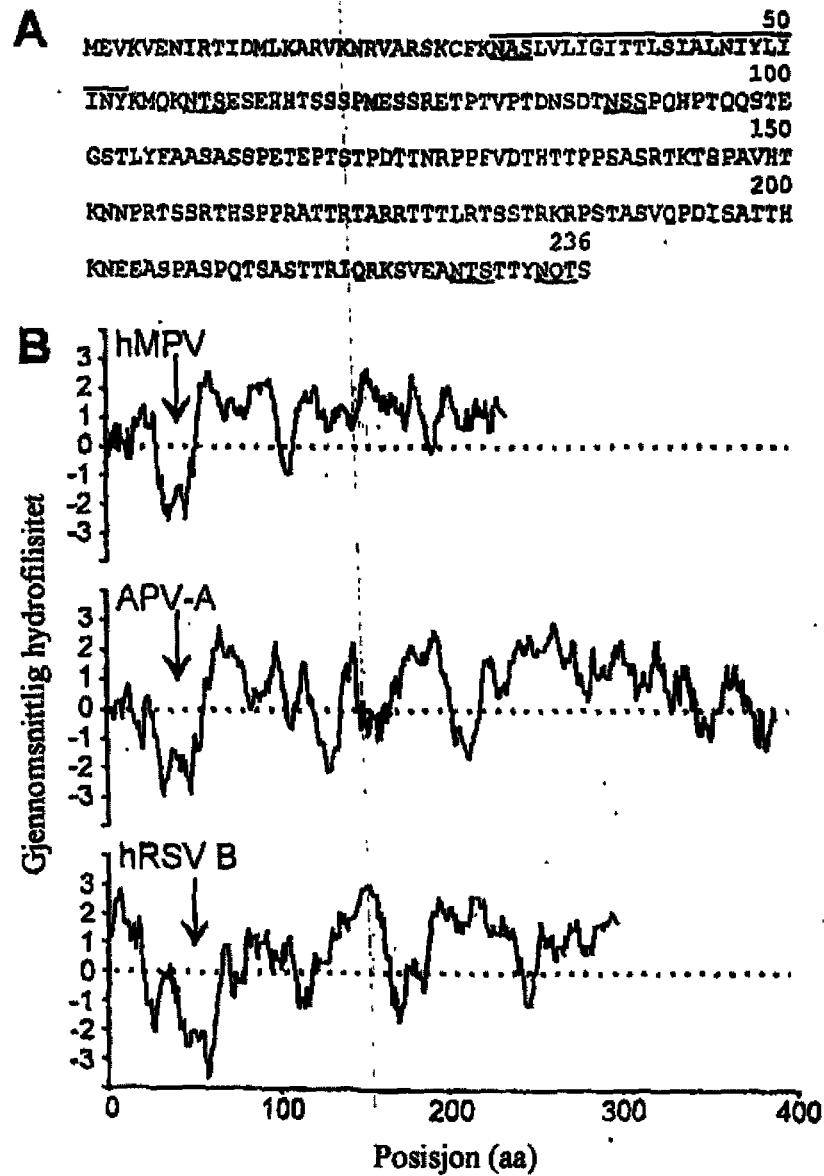
19/45

Fig. 13



20/45

Fig. 14



21/45

Fig. 15

A 674

HMPV NYLARAIVTDLSEFNOQRYSTTAICADVADELNGTQSLEFCHLMLIVEM
 APVASV.....T.SS
 HRSVA ...SKC...I.....SC..S..L....V....F....AL.N
 HRSVB ...SKC...I.....SC..S..L....V....S....TI.L
 HRSV ...SKC...I.....SC..S..L....V....S....TI.F
 HPIV2 FELSAQF.T...A.YCLQW...Q.TIHF.RTLNEMY.VPH..E.I..RLIR
 NDV RREVAQF.T...Q.YCLAW...Q.IKLF.RALNQ.M.LDHF.E.I..RLMD
 SV YETLSQFLT...K.YCLNW...F.S..LFGQRN.IF.FKTF.N.M.FVLEK
 HPIV3 YETVSCFLT...K.YCLNW...S..LFGTCNQIF.LNK..N...PRLEG
 MV YETVS.F.T...K.YCLNW...ISLF.QRLN.IY.LP.F.Q...KRLET
 NIPAH FDTVS.FLT...K..CLNW...SM..F.ERL..Y.LPGF.N.M.KRLEB

B 723

HMPV TTHICAYRNAPPETKG-EYDIDKIBESGLYRYHNGGTEGWCQKLTWMEA
 APVAT.....D.G.-I....Q.P.....F.....M.....
 HRSVA V.I..T.....YIRDRIY.LMDVD.....I..
 HRSVB V.I..T.....YI.DHVVNLMEVD.....I..
 HRSV A.V..T.....YIRHEIT.LM.VD.....I..
 HPIV2 S.LYVGDPFN..AATD-AP.L..VLNGHIFTVSK-....L..M..IS
 NDV ...FVGDPFN..SDPT-DC.LSKVPMHIFTIVSAR....L.....IS
 SV C.IYVGDPFYC.VADAM-HRQLQPNADSGIFIRNPR....Y.....LIS
 HPIV3 S.IYVGDPYC..SD.E-HISELEHEDSGFVHNPR....F.....LIS
 MV SVLYVSDP.C..DLDA-HIPLY.VPMQIFIK.P.....Y.....IST
 NIPAH SVIYV.DPNC..NTDK-HMELE.TP.DQLEFH.PK....YS..T..IAT

C 772

HMPV ISLIDVVSVKTRACQMSLNGDMHEDVSKPKLSEG-LDEVKADYSLAV
 APVARN.V.L.....R.TGA-QT.IQ.....I
 HRSVA ...LI.L.GKFSI..A.I.....I....R.M..-QTHAQ...L..L
 HRSVB ...LI.L.GKFSI..A.I.....I....R.I..-QTHAQ...L..L
 HRSV ...LI.L.GKFSI..A.I.....I....I..N..-QTHAQ...L..L
 HPIV2 ..VILLS.AESKTRVM.HVD...A.A.TTR.PA.LPSIQKKELA.AASK
 NDV ..AAILAARSH.RVCMVQ...V.A.TRE.RSDDSPSEMVLTLHQASD
 SV ..AAILAA.RVGVRVSAMVO...A.A.TSR.FVAQTYKQKQNV.EEIT
 HPIV3 ..AAILAA.RIGVRV.AMVQ...A.A.TTR.PNNYDYRIKKEIV.KDV.
 MV ..PY.KLAAYESGVRLA..VQ....T.A.T.R.PSTWPNLKGREARVTR
 NIPAH ..PE.FLSAYE.NTRIPRIVO...E..AITOK.HPNLPYKVKKEICAKQ.Q

D 822

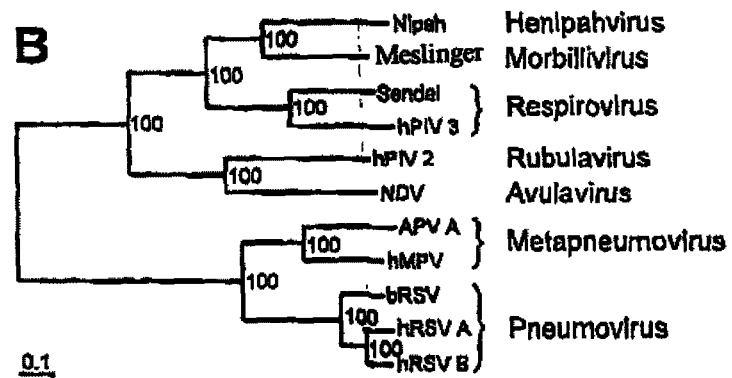
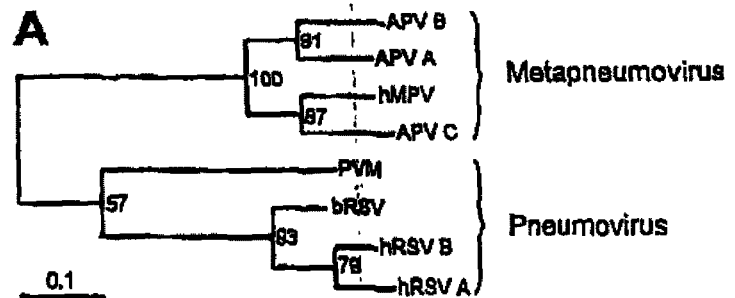
HMPV KMLKEIRDAYRNIGHKLEGETYIBRDLOFISKVIOSEGVMHPTPIKKRL
 APVA ...TAV...Y.....V.....M..T.....Y.AA...V.
 HRSVA NS..LLYKE.AG.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V.
 HRSVB NS..LLYKE.AG.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V.
 HRSV .S..LLYKE.AS.....GT.....M..M..T..HN..YY.AS...V.
 HPIV2 LEFERL.ANNYGL..Q..AQ..I..STFFIY..RVFYQ.RILTQAL.NAS
 NDV NEF..LIHVNHL...N..DR..IR.DTFFIY..R.FKD.AILSOVL.NSE
 SV RYFGAL.KVMFD...E..LN..I..SKMEVY..R.YYD.KIL.OCL.AIT
 HPIV3 RFFDSL.EVMDOL..E..LN..I..SKMTIY..R.YYD.RIL.OAL.AIS
 MV DYFVIL.QRLHD...H..AN..IV.SMTFY..G.YYD.LLVSQSL.S.A
 NIPAH LYFERL.MNL.AL..N..AT..I..TH.FIY..K..HYD.AVLSQAL.SMS

E 847

HMPV RVGFNINTILDPIKTSAESIGSLCQ
 APVAM.A.....
 HRSVAF.V.L.....T.
 HRSVBF.V.L.....T.
 HRSVF.V.M.....T.
 HPIV2 KLCLTADVLGECTQA.CNSATTIM
 NDV KLVLVSGULSENTVM.CAN.A.TVA
 SV .CVF.SE.LV.ENRSACSN.STSIA
 HPIV3 .CVF.SE.VI.ETRSASNNLATSEA
 MV .CVF.SE..V.ETRAACSN.ATTNA
 NIPAH .CCF.SE.LV.ETRSACSN.STTIA

22/45

Fig. 16



24/45

Fig. 18a

Sammenligning av to prototypiske hMPV-isolater med APV-A og APV-CDNA likhetsmatriser

<u>N</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,862	0,757	0,660
99-1	---	1,000	0,757	0,663
APVC	---	---	1,000	0,656
APVA	---	---	---	1,000

<u>P</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,811	0,677	0,588
99-1	---	1,000	0,674	0,593
APVC	---	---	1,000	0,584
APVA	---	---	---	1,000

<u>M</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,865	0,766	0,695
99-1	---	1,000	0,773	0,707
APVC	---	---	1,000	0,705
APVA	---	---	---	1,000

<u>F</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,838	0,706	0,662
99-1	---	1,000	0,716	0,655
APVC	---	---	1,000	0,685
APVA	---	---	---	1,000

<u>M2-1</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,863	0,764	0,668
99-1	---	1,000	0,744	0,657
APVC	---	---	1,000	0,670
APVA	---	---	---	1,000

<u>M2-2</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,861	0,648	0,486
99-1	---	1,000	0,675	0,486
APVC	---	---	1,000	0,463
APVA	---	---	---	1,000

<u>SH</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,688	N.A.	0,421
99-1	---	1,000	N.A.	0,380
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

<u>G</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,543	N.A.	0,262
99-1	---	1,000	N.A.	0,263
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

25/45

Fig. 18b

<u>5'L</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,835	N.A.	0,596
99-1	---	1,000	N.A.	0,605
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

5'L: bare de første 1 500 nukleotidene av 99-1 var tilgjengelig

N.A.: sekvens ikke tilgjengelig

26/45

Protein likhetsmatriser

Fig. 19

<u>N</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,949	0,880	0,685
99-1	---	1,000	0,883	0,682
APVC	---	---	1,000	0,700
APVA	---	---	---	1,000

<u>P</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,860	0,683	0,552
99-1	---	1,000	0,676	0,549
APVC	---	---	1,000	0,528
APVA	---	---	---	1,000

<u>M</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,976	0,874	0,775
99-1	---	1,000	0,874	0,763
APVC	---	---	1,000	0,775
APVA	---	---	---	1,000

<u>F</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,938	0,810	0,677
99-1	---	1,000	0,803	0,674
APVC	---	---	1,000	0,719
APVA	---	---	---	1,000

<u>M2-1</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,946	0,844	0,719
99-1	---	1,000	0,834	0,703
APVC	---	---	1,000	0,704
APVA	---	---	---	1,000

<u>M2-2</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,901	0,563	0,246
99-1	---	1,000	0,577	0,232
APVC	---	---	1,000	0,191
APVA	---	---	---	1,000

<u>SH</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,570	N.A.	0,178
99-1	---	1,000	N.A.	0,162
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

<u>G</u> 00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,326	N.A.	0,094
99-1	---	1,000	N.A.	0,107
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

<u>S'L</u>	00-1	99-1	APVC	APVA
00-1	1,000	0,921	N.A.	0,600
99-1	---	1,000	N.A.	0,594
APVC	---	---	N.A.	N.A.
APVA	---	---	---	1,000

S'L: bare de første 500 aminosyreresidene av 99-1 var tilgjengelige
 N.A.: sekvens ikke tilgjengelig

27/45

Fig.20

Aminosyresekvensoppstilling av to prototype hMPV-isolaterNucleoprotein (N)

	10	20	30	40	50	60	
							
00-1	MSLQGIHLS	DL	SYKHAILKES	QYTIKRDVGT	TTAVTPSS	LQQEITLLCGEILY	SHDYK 60
99-1	MSLQGIHLS	DL	SYKHAILKES	QYTIKRDVGT	TTAVTPSS	LQQEITLLCGEILY	KH DYK 60
	70	80	90	100	110	120	
							
00-1	YAAEIGIQYI	ETALG	SERVQQILR	NSGSEVQV	VLTRTYSLGK	IKNNKGEDLQ	MLDINGVE 120
99-1	YAAEIGIQYI	ETALG	SERVQQILR	NSGSEVQV	VLTKTYSLGK	EKNSKGEELQ	MLDINGVE 120
	130	140	150	160	170	180	
							
00-1	KSWVEEIDKE	ARKTM	ETLLKES	SGNIPQNR	PSAPDTP	PIILLCVGAL	IFTKLASTIEVGL 180
99-1	KSWVEEIDKE	ARKTM	ETLLKES	SGNIPQNR	PSAPDTP	PIILLCVGAL	IFTKLASTIEVGL 180
	190	200	210	220	230	240	
							
00-1	ETT	VRANRVLS	DALKRYPR	MDIPKIAR	SFYDLFEQ	KVYHRS	LFIEYGKALGSSSTGSKA 240
99-1	ETT	VRANRVLS	DALKRYPR	IDIPKIAR	SFYELFEQ	KVYYRSL	LFIEYGKALGSSSTGSKA 240
	250	260	270	280	290	300	
							
00-1	ESL	FNIFMQAY	GAGQTL	RWGVIA	RSSNNIM	LGHVSVQAE	LKQVTEVYDLVREMPESG 300
99-1	ESL	FNIFMQAY	GAGQTL	LRWGVIA	RSSNNIM	LGHVSVQSE	LKQVTEVYDLVREMPESG 300
	310	320	330	340	350	360	
							
00-1	LLHLRQSP	KAGLLS	LANCPNF	ASVVLGN	ASGLGI	IGMYRGRV	PNTELFSAAESYAKSLKE 360
99-1	LLHLRQSP	KAGLLS	LANCPNF	ASVVLGN	ASGLGI	IGMYRGRV	PNTELFSAAESYARSLKE 360
	370	380	390				
							
00-1	SNK	INFSSL	GLTDEE	KEAAEH	FLNVS	DSQNDYE	394
99-1	SNK	INFSSL	GLTDEE	KEAAEH	FLNMS	DNQDDYE	394

28/45

Fig.21

Fosfoprotein (P)

	10	20	30	40	50	60	
							
00-1	MSFPEGKDILFMGNEAAKLAFAFQKSLRKGHKRSQSIIGKVNIVSETLELPTISRPAK						60
99-1	MSFPEGKDILFMGNEAAKLAFAFQKSLKKGHKRTQSIVGEKVNITSETLELPTISKPAR						60
	70	80	90	100	110	120	
							
00-1	STTEPKLAWIDGGITKPKPKKADPIEEEESEKKVLPSSDGKTPAEKKKST						120
99-1	STTEPKLAWIDGGITKPKPKKADPVEEEESEKKVLPSSDGKTPAEKKKST						120
	130	140	150	160	170	180	
							
00-1	NKKKVSFTNEPGKYTKLEKDALDLLSDNEEEDAESSILTFEERDTSSLSIEARLESIE						180
99-1	SKKKVSFTNEPGKYTKLEKDALDLLSDNEEEDAESSILTFEEKDTSSLSIEARLESIE						180
	190	200	210	220	230	240	
							
00-1	EKLSMILGILLRTLNIAATAGPTAARDGIRDAMIGVREELIADIKEAKGKAAEMMEEMSQ						240
99-1	EKLSMILGILLRTLNIAATAGPTAARDGIRDAMIGIREELIAEIIKEAKGKAAEMMEEMNQ						240
	250	260	270	280	290		
							
00-1	RSKIGNGSVKLTEKAKELNKIVEDESTSGESEEEEEPKDTQDNSQDDIYQLIM					294	
99-1	RSKIGNGSVKLTEKAKELNKIVEDESTSGESEEEEEPKETQDNNQDDIYQLIM					294	

29/45

Fig.22

Matrix protein (M)

	10	20	30	40	50	60	
							
00-1	MESYLVD	TYQGIP	YTAAVQ	VDLIEK	DLLPAS	LTIWFP	LFOANTPP
99-1	MESYLVD	TYQGIP	YTAAVQ	VDLVEK	DLLPAS	LTIWFP	LFOANTPP
							
	70	80	90	100	110	120	
00-1	YAASONG	PILKVN	ASQAAM	SVLPKK	FEVNAT	VALDEY	SKLEFD
99-1	YAASONG	PILKVN	ASQAAM	SVLPKK	FEVNAT	VALDEY	SKLDFD
							
	130	140	150	160	170	180	
00-1	KPYGMV	SKFVSS	AKSVGK	KTHDLI	ALCDFM	DLKNI	PVTIPAF
99-1	KPYGMV	SKFVSS	AKSVGK	KTHDLI	ALCDFM	DLKNI	PVTIPAF
							
	190	200	210	220	230	240	
00-1	ISSEAD	QALTOA	KIAPYA	GLIMIM	TMMNPK	GIFKKL	GAGTQV
99-1	ISSEAD	QALTOA	KIAPYA	GLIMIM	TMMNPK	GIFKKL	GAGTQV
							
	250						
00-1	TWSHQG	TRYVLK	SR	254			
99-1	SWSHQG	TRYVLK	SR	254			

30/45

Fig.23

Fusionsprotein (F)

	10	20	30	40	50	60	
00-1	MSWKVVI	SLITPQHGLKESYL	EEESCSTITEGYLSVL	RTGWYTNVFTTLEV	GDVENLTC	60	
99-1	MSWKVMII	SLITPQHGLKESYL	EEESCSTITEGYLSVL	RTGWYTNVFTTLEV	GDVENLTC	60	
	70	80	90	100	110	120	
00-1	DGPSLIKTELDLT	KSALRELRTVSADQ	LAREEQIENPRQSR	FVLGAIALGVATAA	AVTA	120	
99-1	DGPSLIKTELDLT	KSALRELKTVSADQ	LAREEQIENPRQSR	FVLGAIALGVATAA	AVTA	120	
	130	140	150	160	170	180	
00-1	GVAIAKTIRLESEV	AIKALKKTNEAVST	LGNGVRVLATAVRE	LKDFVSKNLT	AINKN	180	
99-1	GIAIAKTIRLESEV	AIKALKQTNEAVST	LGNGVRVLATAVRE	LKEFVSKNLT	AINRN	180	
	190	200	210	220	230	240	
00-1	KCDIADLKMAVSF	SQFNRRFLNVVRQF	SDNAGITPAISLDL	MTDAELARAVS	MPTSAGQ	240	
99-1	KCDIADLKMAVSF	SQFNRRFLNVVRQF	SDNAGITPAISLDL	MTDAELARAVS	MPTSAGQ	240	
	250	260	270	280	290	300	
00-1	IKLMLNENRAMVRR	KGFGLIGVYGSSVI	YMQLPVIFGVIDTP	CWIVKAAPSCS	KGNYA	300	
99-1	IKLMLNENRAMVRR	KGFGLIGVYGSSVI	YMQLPVIFGVIDTP	CWIIKAAPSCS	KGNYA	300	
	310	320	330	340	350	360	
00-1	CLLREDQGWYCNAG	STVYYPNEKDCETR	GDHVFCDTAAGIN	VAEQSKECNINIS	TNYP	360	
99-1	CLLREDQGWYCKNAG	STVYYPNEKDCETR	GDHVFCDTAAGIN	VAEQSRECNINIS	TNYP	360	
	370	380	390	400	410	420	
00-1	CKVSTGRHPISMVAL	SPLGALVACYKGV	SCSIGSNVVGIIKQ	LKGCSYITNQDAD	TVTI	420	
99-1	CKVSTGRHPISMVAL	SPLGALVACYKGV	SCSIGSNVVGIIKQ	LKGCSYITNQDAD	TVTI	420	
	430	440	450	460	470	480	
00-1	DNTVYQLSKVEGEQ	HVIKGRPVSSSFD	PKFPEDQFNVALDQ	VFESIENSQALVDQ	SNRI	480	
99-1	DNTVYQLSKVEGEQ	HVIKGRPVSSSFD	PKFPEDQFNVALDQ	VFESIENSQALVDQ	SNKI	480	
	490	500	510	520	530		
00-1	LSSAEKGNTGFIIV	ILIAVLGTMIVSV	IIIKTKKPTGAPPE	LSGVTMGFIPHN	539		
99-1	LNSAEKGNTGFIIV	ILIAVLGTMIVSI	IIIKTKRPTGAPPE	LNGVTMGFIPHS	539		

31/45

Fig. 24

22K protein (M2-1)

	10	20	30	40	50	60
00-1	MSRKAPCKYEVRGKCNRGSECKT	ENYWSWPD	RYLLIRSN	YLLNQLLR	NTDRADGL	SIIS 60
99-1	MSRKAPCKYEVRGKCNRGSDCKT	MHNYWSWPD	RYLLIRSN	YLLNQLLR	NTDKADGL	SIIS 60

	70	80	90	100	110	120
00-1	GAGREDRTQDFVLG	STNVVQGYID	NOITKAAAC	YSLHNI	IKQLQSE	EVROARDNKLSD 120
99-1	GAGREDRTQDFVLG	STNVVQGYID	NOITKAAAC	YSLHNI	IKQLQSE	EVROARDNKLSD 120

	130	140	150	160	170	180
00-1	SKHVALHNLVLSY	MEMSKTPAS	LNNLKKLP	REKLKKLAK	LIIDLSAG	ENDSSYALQDS 180
99-1	SKHVALHNLILSY	MEMSKTPAS	LNNLKKLP	REKLKKLAR	LIIDLSAG	ENDSSYALQDS 180

00-1	ESTNQVQ 187
99-1	ESTNQVQ 187

32/45

Fig.25

M2-2 protein (M2-2)

10 20 30 40 50 60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
00-1 MTLHMPCKTVKALIKCEHGPFITIEVDDMIWTHKDLKE LSDGIVKSHTNIYNCYLEN 60
99-1 MTLHMPCKTVKALIKCSKHGPFITIEVDDMIWTHKELKE LSDGIVKSHTNIYSCYLEN 60

70
.....|.....|
00-1 IEIIYVKYLS 71
99-1 IEIIYVKYLS 71

33/45

Fig.26

Kort hydrofobt protein (SH)

	10	20	30	40	50	60																																																	
00-1	M	T	L	D	V	I	K	S	D	G	S	S	K	T	C	L	K	K	I	I	K	H	S	G	K	V	L	I	L	K	L	I	L	A	L	L	T	F	T	T	I	T	I	N	Y	I	K	V	E	N	N	L	Q	60	
99-1	M	T	L	D	V	I	K	S	D	G	S	S	E	T	C	L	K	K	I	I	K	H	S	G	K	V	L	I	L	K	L	I	L	A	L	L	T	F	T	T	I	V	N	Y	I	K	V	E	N	N	L	Q	60		
	70	80	90	100	110	120																																																	
00-1	L	C	O	K	K	E	S	D	R	K	K	S	S	E	N	T	T	S	T	T	K	T	N	I	L	I	Q	Y	K	E	L	I	Q	R	Y	T	N	S	A	L	L	S	D	T	C	W	K	I	N	R	N	Q	119		
99-1	L	C	O	K	K	E	S	D	R	K	K	V	K	E	N	T	T	S	T	T	I	R	T	I	D	I	V	V	E	H	K	E	L	I	Q	R	H	T	N	S	V	L	L	S	D	T	C	W	R	I	H	K	N	Q	120
	130	140	150	160	170	180																																																	
00-1	T	N	I	L	Y	K	F	L	C	F	K	S	E	D	T	K	I	N	C	D	K	I	T	L	C	N	K	K	K	P	A	V	G	V	Y	H	I	V	E	C	H	C	I	Y	T	K	W	C	H	H	T	T	179		
99-1	T	N	I	L	Y	K	F	L	C	G	G	I	N	S	K	I	D	C	E	E	I	T	L	C	N	K	K	K	I	V	E	K	H	K	A	E	C	H	C	L	H	T	E	W	C	H	H	T	T	177					
00-1		183																																																					
99-1		177																																																					

34/45

Fig.27

Feste glykoprotein (G)

	10	20	30	40	50	60	
00-1	MEVKVENIR	IDM	KARVKNRV	SKCFKNASLV	LIGIT	LSIALNIYLI	NY 60
99-1	MEVRVENIR	IDM	KAKIKNRI	SRCYRNATL	LILIGLT	LSMALNIFLI	IDH 60
	70	80	90	100	110	120	
00-1	ESER	ISREME	SRETPE	WIT	EDT	SPQHT	QSTBESTY 120
99-1	KTEN	ANIPPE	SKKTE	NT	ENPO	TO	TTT 120
	130	140	150	160	170	180	
00-1	EDTT	RE	VDHT	PF	AS	WAS	PAVKEN 180
99-1	EDTT	RE	VDHT	PF	AS	WAS	PAVKEN 180
	190	200	210	220	230		
00-1	ST	RR	STAS	VORD	BA	TUN	NS 236
99-1	NT	CKEN	AS	NT	ED	NT	TIQSS 224

35/45

Fig.28

N-terminal ende av polymeraseprotein (L)

	10	20	30	40	50	60
00-1	MDP	ESTVNVYLPDSYLKGVISF	SETNAIGSCLLKRPYLKNDNTAKVAIENPVIEHVRL	60		
99-1	MDP	ESTVNVYLPDSYLKGVISF	SETNAIGSCLLKRPYLKNDNTAKVAIENPVIEHVRL	60		
	70	80	90	100	110	120
00-1	KNAV	ISKMKISDYKIVEPVNMOHEIMKNVHSC	ELTLLKQFLTRSKNISTLKLNMICDWLQ	120		
99-1	RNAV	ISKMKISDYKIVEPVNMOHEIMKNVHSC	ELTLLKQFLTRSKNISTLKLNMICDWLQ	120		
	130	140	150	160	170	180
00-1	LKSTSDDTSILSFIDVEFIP	WVSNWFSNWNLNKLILEFRKEEVIRTGSILCRSLGKLV	180			
99-1	LKSTSDDTSILSFIDVEFIP	WVSNWFSNWNLNKLILEFRKEEVIRTGSILCRSLGKLV	180			
	190	200	210	220	230	240
00-1	FVVSSYGCIVKSNKSKRVSFTTYN	QLLTWKDVMLSRFNANFCIWVSNLNENQEGGLGLRS	240			
99-1	FIVSSYGCIVKSNKSKRVSFTTYN	QLLTWKDVMLSRFNANFCIWVSNLNENQEGGLGLRS	240			
	250	260	270	280	290	300
00-1	NLOGILTINKLYETVDYMLSLCCNEGFSIVKEFEGFIMSEILRITEHAQFSTRFRNTLLNG	300				
99-1	NLOGILTINKLYETVDYMLSLCCNEGFSIVKEFEGFIMSEILRITEHAQFSTRFRNTLLNG	300				
	310	320	330	340	350	360
00-1	LTDQLTELKKNRERV	GTVLENNDYPMYEVVLKLLGDTLR	IKLLINKNLNENAAELYI	360		
99-1	LTEQLS	LKKNRERV	GTILENNDYPMYEVVLKLLGDTLR	IKLLINKNLNENAAELYI	360	
	370	380	390	400	410	420
00-1	FRIFGHFPMVDERDAMDAVKLNNEITKILR	ESLTELRCAGFILRIIKGFVDNNKRWPKIKN	420			
99-1	FRIFGHFPMVDEREAMDAVKLNNEITKILR	ESLTELRCAGFILRIIKGFVDNNKRWPKIKN	420			
	430	440	450	460	470	480
00-1	LKVLSCRW	MYFKAKSYPSOLELS	QDFLELAQFEQEFVSPEKTNLEMVLNDKAI	480		
99-1	LKVLSCRW	MYFKAKSYPSOLELS	QDFLELAQFEQEFVSPEKTNLEMVLNDKAI	480		
	490					
00-1	KRLIWSVYPKNYLPEIKN	499				
99-1	KRLIWSVYPKNYLPEIKN	499				

36/45

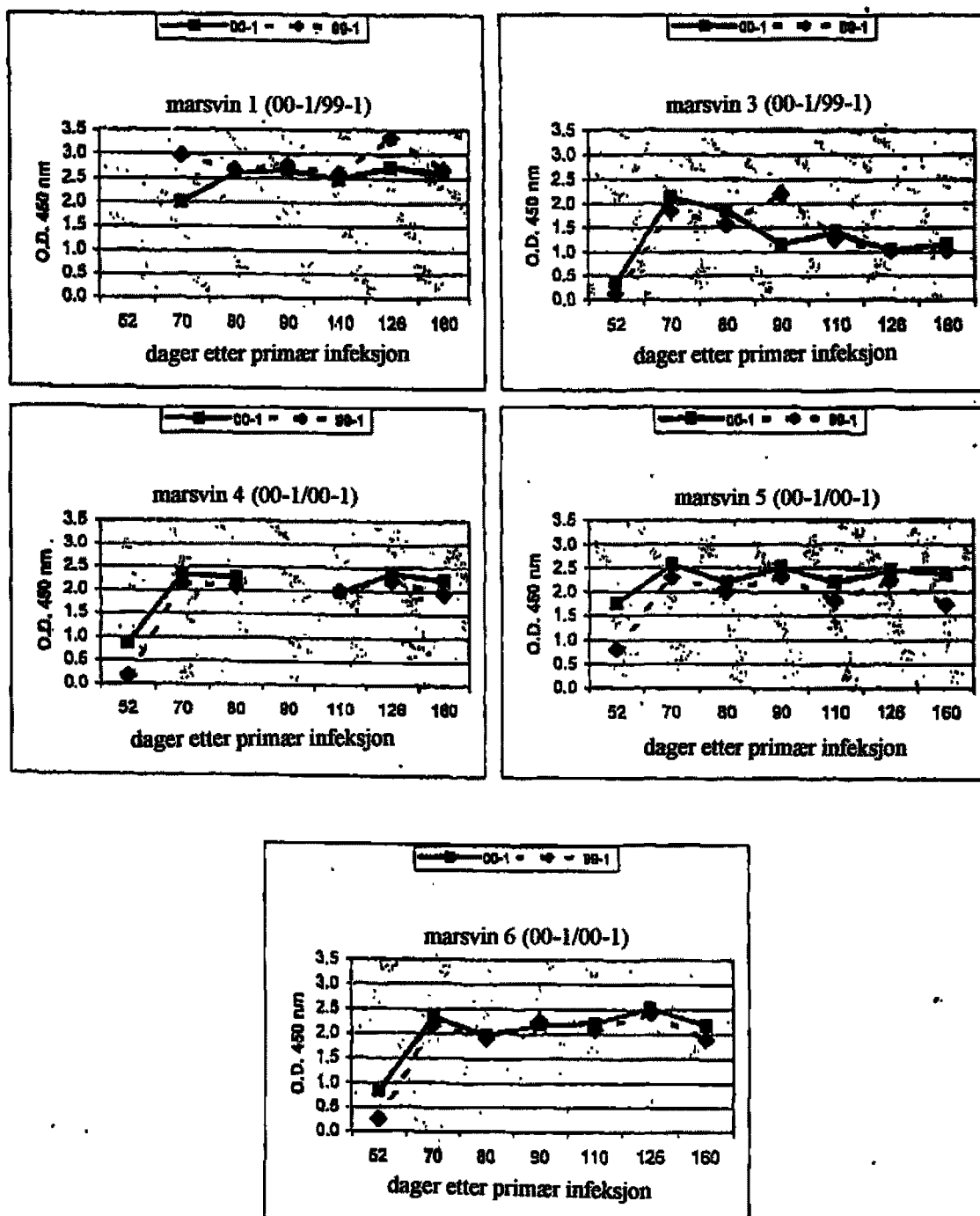
Fig. 29

+ = positiv; - = negativ; T = hals vattpinner; NO = nese vattpinner; N = ikke gjort; ? = ikke sikker; D = død; 0 til 12: dager etter infeksjon. 2. infeksjon er bare testet på nese vattpinner.

nr	1. infeksjon	Vatt pinne	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	2. infeksjon	0	1	2	3	4	5
1	00-1	T	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	+	N	+	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
2	00-1	T	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	D		N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	+	N	+	-	-	-	D		-	-	-	-	-	-
3	00-1	T	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	99-1	N	N	?	N	N	N
		NO	-	+	?	?	-	-	-	N	-	-	-	-	-		-	-	?	+	+	-
4	00-1	T	-	+	+	+	+	+	+	-	?	-	-	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	+	N	?	-	-	-	-		-	-	-	+	-	-
5	00-1	T	-	?	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	+	N	+	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
6	00-1	T	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	+	N	+	+	?	-	-		-	-	-	-	-	-
7	99-1	T	-	-	-	+	+	-	+	D	-	-	-	-	-		N	N	N	N	N	N
		NO	-	-	-	+	+	+	N	D	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
8	99-1	T	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	?	-	+	+	?	N	-	-	-	-	-	-		-	-	+	+	+	+
9	99-1	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	00-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	-	-	-	+	+	N	-	-	-	-	-	-		-	?	+	+	-	-
10	99-1	T	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
11	99-1	T	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	?	+	+	+	N	-	-	-	-	-	-		-	-	-	+	-	-
12	99-1	T	-	-	+	+	?	-	-	-	-	-	-	-	N	99-1	N	N	N	N	N	N
		NO	-	+	+	+	+	+	N	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-

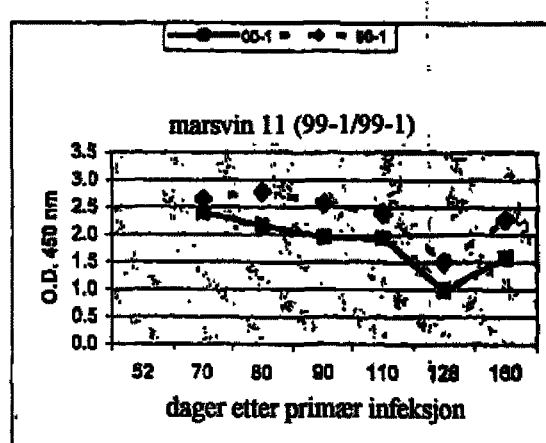
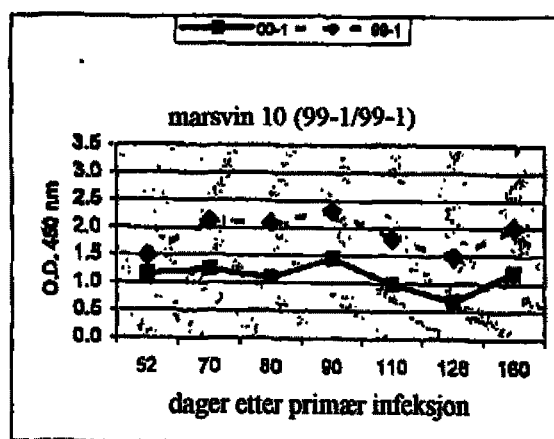
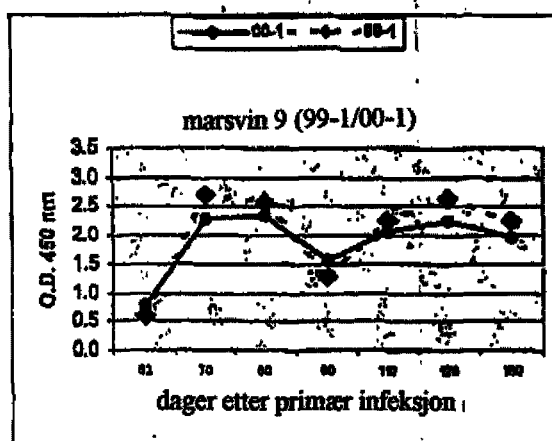
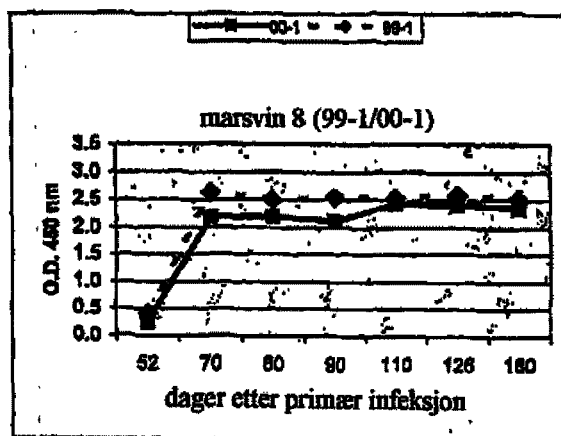
37/45

Fig. 30A



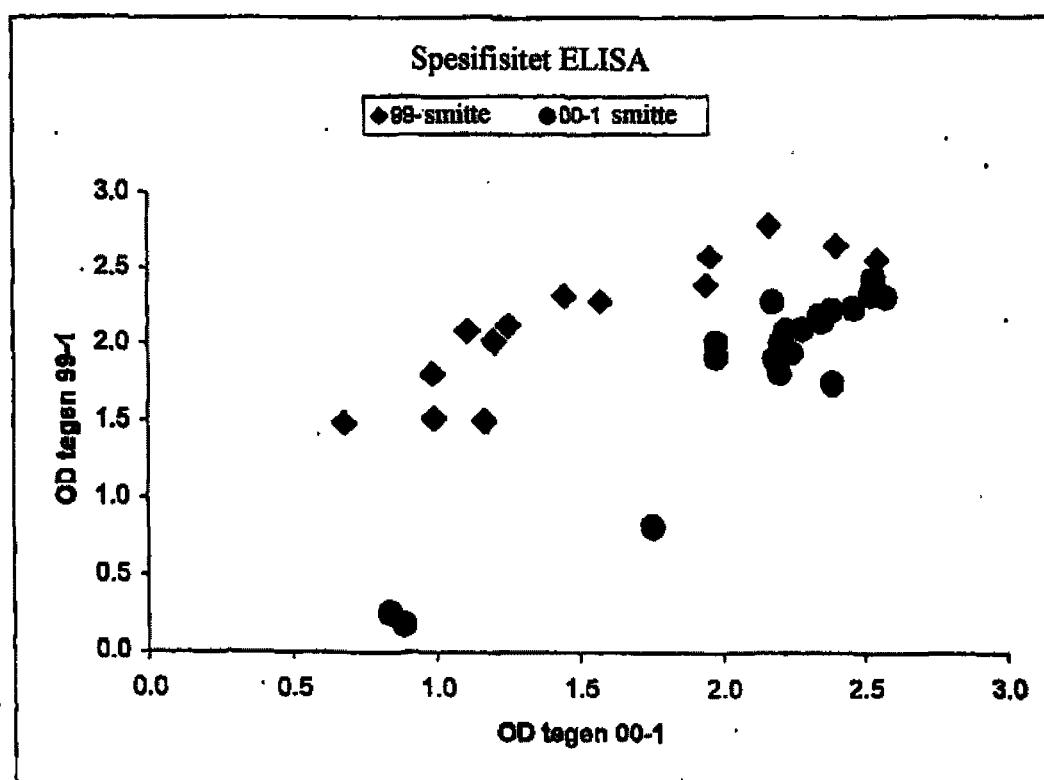
38/45

Fig. 30B



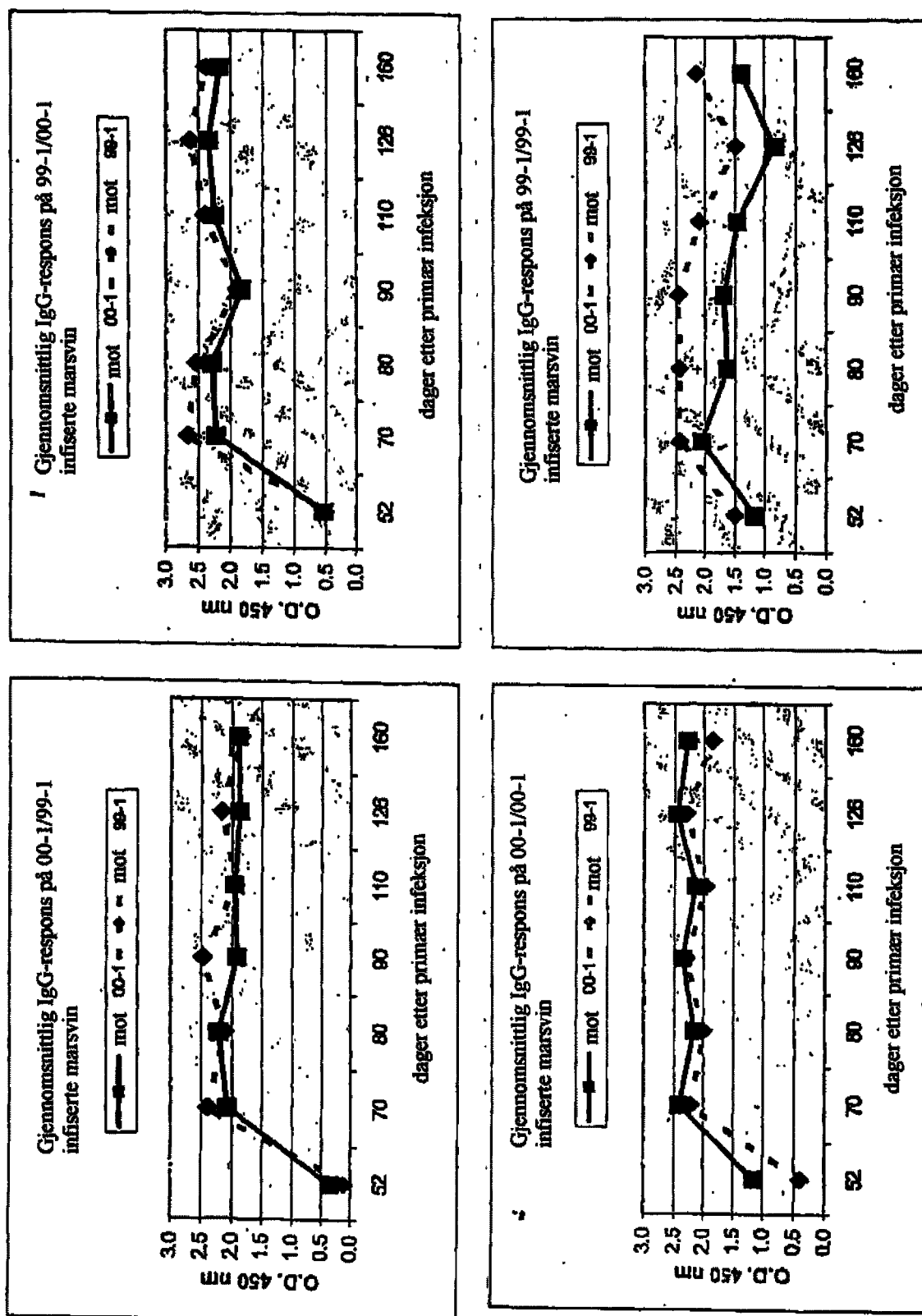
39/45

Fig. 31



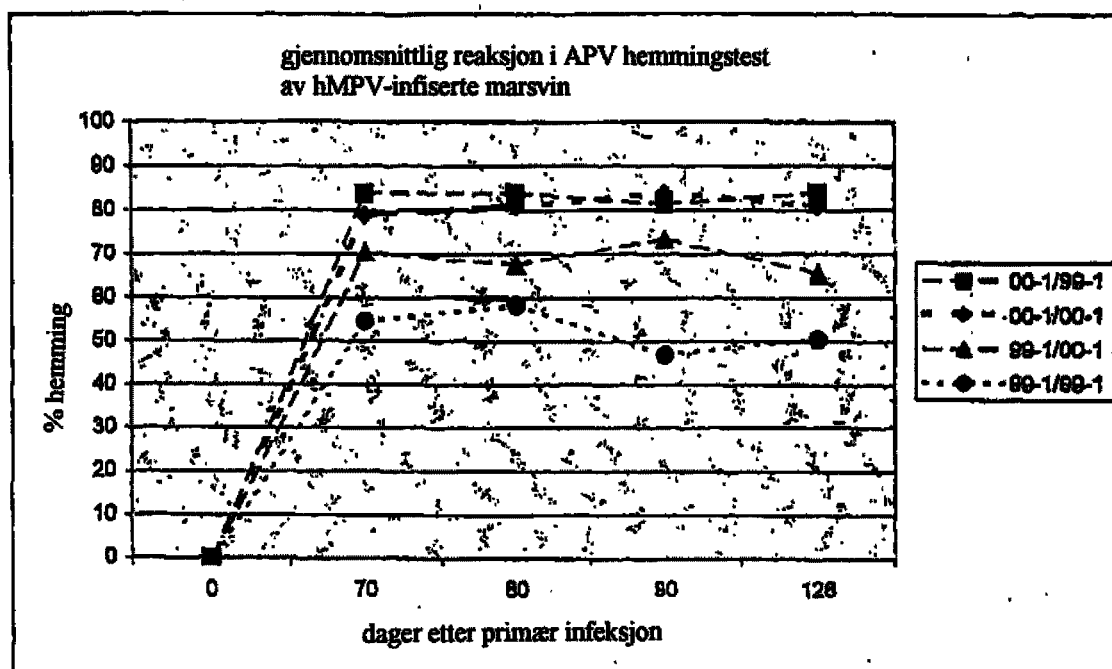
40/45

Fig. 32



41/45

Fig. 33



42/45

Fig. 34

	Mot 00-1	Mot 99-1	Mot APV-C
1 infeksjon med 00-1			
2 infeksjoner med 00-1			
1 infeksjon med 99-1			
2 infeksjoner med 00-1			

43/45

Fig. 35

+ = positive; - = negative; N = ikke gjort; ? = ikke sikker; 0 til 10: dager etter infeksjon

nr	1. infeksjon	0	2	3	4	5	6	7	8	9	11.	2. infeksjon	0	1	2	3	4	5	7	10
3	00-1	-	-	-	+	+	+	+	+	N	-		-	+	+	+	+	-	?	-
6	00-1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-		-	+	+	+	+	+	-	-

44/45

Fig. 36A

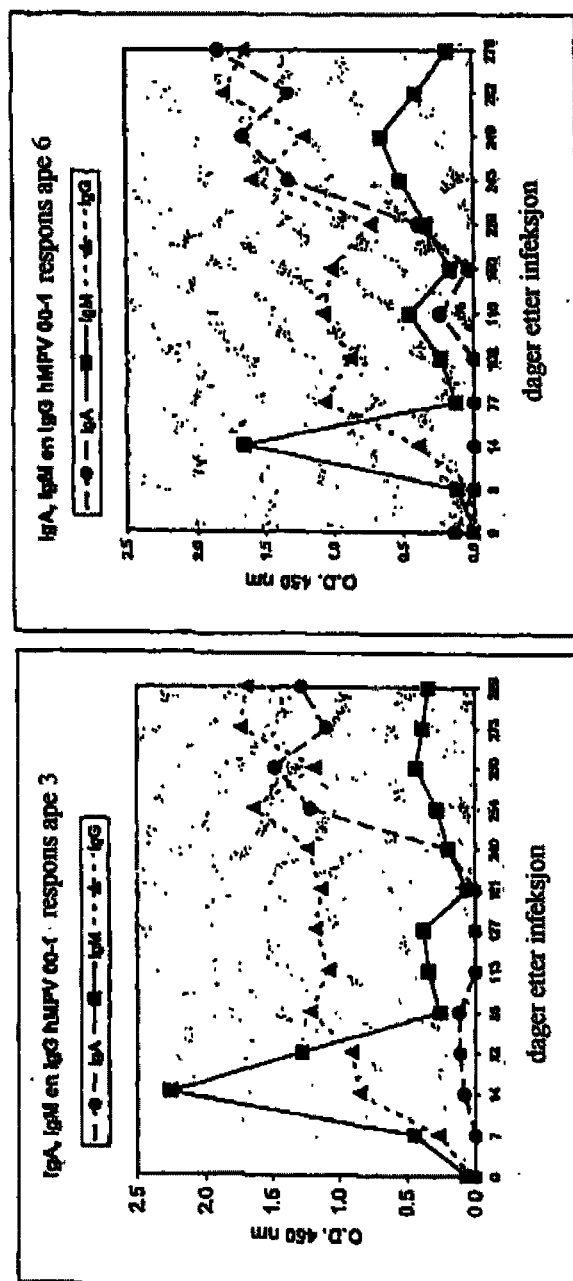
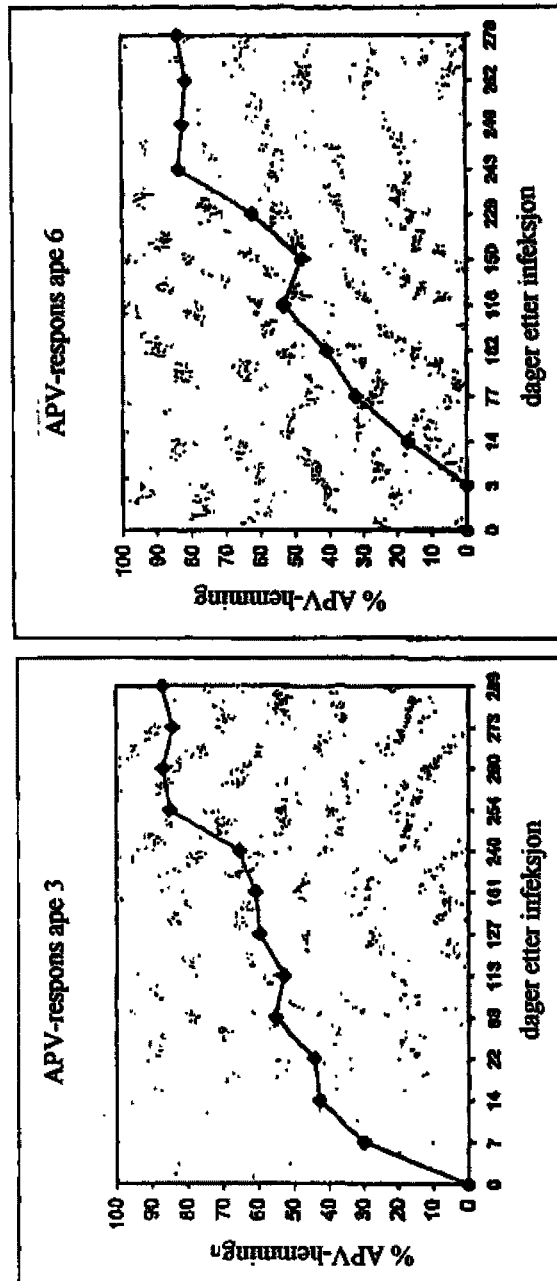


Fig. 36B



45/45

Fig. 37

