

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

*Παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας αδρανοποίησης του
εμβολιακού στελέχους SABIN1 μέσω κυτταροκαλλιέργειας και μιας
σύγχρονης αντίστροφης μεταγραφής (RT)-Loop Mediated Isothermal
Amplification*



Κουκλαμάνη-Γιαννούλη Γεωργία

Λάρισα 2019

Παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας αδρανοποίησης του εμβολιακού στελέχους SABIN1 μέσω κυτταροκαλλιέργειας και μιας σύγχρονης αντίστροφης μεταγραφής (RT)-Loop Mediated Isothermal Amplification.

Monitoring of inactivation efficiency of SABIN1 vaccine strain using an integrated cell culture system reverse transcription (RT)-Loop Mediated Isothermal Amplification.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π.ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ):

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ.ΜΟΣΙΑΛΟΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ.ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Ευχαριστίες

Η μεταπτυχιακή αυτή εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Τοξικολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερώς τον επιβλέποντα Καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα και να μάθω πλήθος τεχνικών, καθώς επίσης και για την πολύτιμη καθοδήγησή του κατά τη διεξαγωγή της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον διδάκτορα Δημητρίου Τηλέμαχο και την υποψήφια διδάκτορα Δάσκου Μαρία για την υπομονή τους και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στην ερευνητική μελέτη λύνοντάς μου οποιαδήποτε απορία και παρέχοντάς μου αμέριστη στήριξη και βοήθεια κατά την πειραματική διαδικασία, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την ομαλή συνεργασία μας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου που με την οικονομική και ηθική στήριξη τους, καθώς και με την υπομονή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν με βοήθησαν να ολοκληρώσω ένα μεγάλο και σημαντικό κομμάτι των σπουδών μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στη Λάρισα.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	Σελ.4
Περίληψη	Σελ.6
Abstract	Σελ.8
A) Εισαγωγή	Σελ.10
1. Βιολογία των εντεροϊών	Σελ.10
1.1 Ταξινόμηση των εντεροϊών	Σελ.10
1.2 Εντεροϊοί της ομάδας C	Σελ.12
1.3 Δομή και αντιγονικότητα των ισωματίων	Σελ.12
1.4 Οργάνωση του ιικού γενώματος	Σελ.14
1.5 Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών	Σελ.16
1.5.1 Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο	Σελ.17
1.5.2 Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης	Σελ.18
1.5.3 Αντιγραφή του ιικού γενώματος	Σελ.20
1.5.4 Καψιδίωση και απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ισωματίων	Σελ.22
1.6 Επιπτώσεις στο κύτταρο ξενιστή	Σελ.23
1.7 Παθογένεια	Σελ.24
1.8 Μηχανισμοί εξέλιξης των εντεροϊών	Σελ.25
1.8.1 Μεταλλάξεις	Σελ.25
1.8.2 Ανασυνδυασμός	Σελ.26
1.9 Επιδημιολογία	Σελ.27
B) Υλικά και Μέθοδοι	Σελ.29
2.1 Πρότυπα στελέχη	Σελ.29
2.2 Ενοφθαλμισμός Sabin1 σε κυτταροκαλλιέργειες	Σελ.29
2.3 Υπολογισμός του TCID₅₀ και σειριακές αραιώσεις	Σελ.29
2.4 Μέτρηση κυττάρων	Σελ.30
2.5 Αδρανοποίηση ιού και μόλυνση κυττάρων	Σελ.32
1) Εκχύλιση του ιικού RNA	Σελ.33
2) Αντίστροφη μεταγραφή (RT)	Σελ.33
3) 3.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	Σελ.35
3.1.1 PCR για την ανίχνευση του θετικής πολικότητας RNA κλώνου	Σελ.35
3.1.2 PCR για την ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου	Σελ.36
3.1.3 Nested-PCR για την ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου	Σελ.37
3.1.4 Real Time PCR	Σελ.38
4) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, της Nested PCR, της Real Time PCR και της LAMP	Σελ.39
5. RT-(LAMP) Loop Mediated Isothermal Amplification	Σελ.40
Γ) Αποτελέσματα	Σελ.43
6.1 Παρακολούθηση (CPE) στις κυτταροκαλλιέργειες	Σελ.43
6.1.1 Αποτελέσματα εμφάνισης CPE για τον Sabin1 [1] TCID₅₀	Σελ.43
6.1.2 Αποτελέσματα εμφάνισης CPE για τον Sabin1 [10] TCID₅₀	Σελ.44
6.1.3 Αποτελέσματα εμφάνισης CPE για τον Sabin1 [10⁶] TCID₅₀	Σελ.44
6.2 Αποτελέσματα RT-PCRγια τον Sabin1 [1] και [10⁶] TCID₅₀	Σελ.46
6.3 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων Sabin1 [10⁶] TCID₅₀ έπειτα από RT-PCR στα αδρανοποιημένα για 25 min δείγματα.	Σελ.50
6.4 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων Sabin1 [10⁶] TCID₅₀ έπειτα από Nested PCR και Real Time PCR στα αδρανοποιημένα δείγματα για 30 min.	Σελ.52
6.5 Αποτελέσματα Real Time PCR για δείγματα Sabin1 [10] TCID₅₀	Σελ.64
6.6 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων Sabin1 [10⁶] και [10] TCID₅₀ έπειτα από LAMP στα αδρανοποιημένα δείγματα για 30 min.	Σελ.67
Δ) Συζήτηση	Σελ.69
Ε) Βιβλιογραφία	Σελ.73

Περίληψη

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Picornaviridae*. Το γονιδίωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+)ssRNA μήκους περίπου 7.500 βάσεων και περικλείεται σε ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'αμετάφραστη περιοχή, ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και μία 3'αμετάφραστη περιοχή που καταλήγει σε πολύ(A)-ουρά. Οι εντεροϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο ταξινομούνται σε τέσσερις ομάδες: EV-A, EV-B, EV-C και EV-D. Οι πολιοϊοί, το σημαντικότερο μέλος της ομάδας C, διακρίνονται σε τρεις ορότυπους με τα αντίστοιχα εμβολιακά στελέχη σε παρένθεση: PV1 (SABIN1), PV2 (SABIN2), PV3 (SABIN3) και είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες της παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

Οι περισσότερες μολύνσεις με εντεροϊούς είναι ασυμπτωματικές, αλλά σε ένα ποσοστό οδηγούν στην εμφάνιση πιο σοβαρών ασθενειών όπως η άσηπτη μηνιγγίτιδα και η παραλυτική πολιομυελίτιδα. Η εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα για τη διάγνωση των εντεροϊών. Ωστόσο, λόγω του ότι οι εντεροϊοί συνήθως προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις μπορούν να κυκλοφορούν αθόρυβα μέσα σε έναν πληθυσμό με αποτέλεσμα να υπάρχει ο κίνδυνος για πιθανές εξάρσεις.

Η ανίχνευση απλά της παρουσίας του γονιδιώματος ενός εντεροϊού δεν σημαίνει απαραίτητα και την ενεργότητά του, για αυτό κρίνεται απαραίτητη και η διάκριση των αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών από τους μη αντιγραφικά ενεργούς εντεροϊούς στον πληθυσμό ώστε να κατανοήσουμε πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις που μπορούν να προκληθούν στον πληθυσμό ύστερα από προσβολή με εντεροϊούς.

Στην παρούσα εργασία, έγινε παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας θερμικής αδρανοποίησης του εμβολιακού στελέχους Sabin1 μέσω κυτταροκαλλιέργειας και μιας σύγχρονης αντίστροφης μεταγραφής (RT)-Loop Mediated Isothermal Amplification. Στο πρώτο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε θερμική αδρανοποίηση του εμβολιακού στελέχους Sabin1 σε διαδοχικές θερμοκρασίες με σκοπό τον εντοπισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας αδρανοποίησης. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε μόλυνση των κυτταροκαλλιεργειών με τα αδρανοποιημένα δείγματα Sabin1 και παρακολούθηση τους για την εμφάνιση CPE. Στο τρίτο μέρος της εργασίας ακολούθησε απομόνωση του γονιδιώματος του ιού από τις κυτταροκαλλιέργειες, μετατροπή του RNA σε DNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής και έλεγχος για την παρουσία αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών μέσω Real Time PCR. Στο τέταρτο και τελευταίο μέρος της εργασίας έγινε επαλήθευση των προηγούμενων αποτελεσμάτων αδρανοποίησης του στελέχους Sabin1 σε κάθε θερμοκρασία, μέσω μιας γρήγορης και ευαίσθητης τεχνικής αντίστροφης μεταγραφής (RT)-Loop Mediated Isothermal Amplification.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της μοριακής αυτής τεχνικής, επαληθεύονται τα αποτελέσματα των Real Time PCR που έχουν προηγηθεί και καταλήγουμε στις βέλτιστες θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Sabin1 ανάλογα με τη συγκέντρωση του. Πιο συγκεκριμένα για το στέλεχος Sabin1 [10^6] TCID₅₀ παρατηρείται πλήρης αδρανοποίηση τους 78 και 80°C ενώ για τον Sabin1 [10] TCID₅₀ η πλήρης αδρανοποίηση επιτυγχάνεται στους 60°C. Η επιτυχία επαλήθευσης των αποτελεσμάτων με την τεχνική αυτή την καθιστά προτιμότερη σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους PCR καθώς είναι πολύ πιο γρήγορη, σε μόλις 45min μπορούμε να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα , είναι απλή στη διεξαγωγή της και ειδική ως προς το στόχο τον οποίο ανιχνεύει.

Abstract

Enteroviruses belong to *Picornaviridae* family. Their genome is a positive sense, single strand RNA molecule (+ssRNA), of 7.500 nucleotides in length, surrounded by a viral icosahedral protein capsid. Their genome is consisted of a highly conserved 5' untranslated region, an open reading frame and a 3' untranslated region ending in a poly (A)-tract. Enteroviruses that infect humans are classified into four species: EV-A, EV-B, EV-C and EV-D. Polioviruses, the most significant member of EV-C species, are the causal agents of paralytic poliomyelitis and exist as three distinct serotypes (PV1, PV2 and PV3).

Most infections with enteroviruses are asymptomatic; but in some instances Enteroviruses can cause different clinical symptoms ranging from aseptic meningitis to paralytic poliomyelitis. The emergence of clinical symptoms is the main causal factor for the diagnosis of enteroviruses. However, due to the fact that enteroviruses usually cause asymptomatic infections, can move accidentally into a population resulting in a risk of possible outbreaks.

Simply detecting the presence of the enteroviruses genome does not necessarily indicates its replicating activity. For this reason it is necessary to distinguish the replicating active enteroviruses from the non-replicating active enteroviruses in the population in order to understand the possible adverse effects that can be caused to the population due to active enteroviruses.

In the present study, the thermal inactivation efficiency of the Sabin1 vaccine strain was monitored using an integrated cell culture system reverse transcription (RT)-Loop Mediated Isothermal Amplification. In the first part of the study thermal inactivation of the Sabin1 vaccine strain was performed at successive increased temperatures in order to establish the optimum inactivation temperature. In the second part of the study, cell cultures were infected with the inactivated Sabin1 samples and monitored for CPE appearance. The third part of the study was followed by isolation of the genome of the virus from cell cultures, conversion of RNA to DNA by reverse transcription, and assayed for the presence of replicative active enteroviruses by Real Time PCR. In the fourth and final part of the study, the previous Sabin1 strain inactivation results at each temperature were verified by a fast and sensitive (RT) Loop Mediated Isothermal Amplification technique.

According to our results obtained from the application of these molecular techniques (Real Time PCR and (RT) Loop Mediated Isothermal Amplification) we determined the optimum inactivation temperatures of the Sabin1 strain which were related to its initial TCID₅₀. In particular, Sabin1 [10⁶] TCID₅₀ was completely inactivated at 78 and 80°C while for Sabin1 [10] TCID₅₀ complete inactivation was achieved at 60°C. The application of this technique is preferable to conventional PCR

methods as it is much faster, in just 45 minutes, simple to carry out and highly reliable.

A) Εισαγωγή

1.Βιολογία των εντεροϊών

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια ιών *Picornaviridae* και στο γένος *Enterovirus*. Είναι ιοί χωρίς έλυτρο και το γονιδίωμα τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Η οικογένεια *Picornaviridae* περιλαμβάνει κι άλλους παθογόνους ιούς των ανθρώπων και των θηλαστικών όπως π.χ. ιός της ηπατίτιδας Α και FMDV (foot and mouth disease virus). Το όνομα της οικογένειας αυτής των ιών είναι σύνθετο καθώς περιγράφει το μικρό μέγεθος των ιών (*pico*) και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος που αποτελεί το ιικό γονιδίωμα (RNA) (Knipe D. M. et al, (2007)).

1.1 Ταξινόμηση των εντεροϊών

Η οικογένεια *Picornaviridae* αποτελείται από 35 γένη και 80 είδη, σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV), έως και τον Ιανουάριο του 2019 (Zell R. et al and ICTV Report Consortium, (2017)).

<i>Ampivirus</i>	<i>Dicpivirus</i>	<i>Kobuvirus</i>	<i>Parechovirus</i>	<i>Salivirus</i>
<i>Aphthovirus</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Kunsagivirus</i>	<i>Pasivirus</i>	<i>Sapelovirus</i>
<i>Aquamavirus</i>	<i>Erbovirus</i>	<i>Limnipivirus</i>	<i>Passerivirus</i>	<i>Senecavirus</i>
<i>Avihepatovirus</i>	<i>Gallivirus</i>	<i>Megrivirus</i>	<i>Potamipivirus</i>	<i>Sicinivirus</i>
<i>Avisivirus</i>	<i>Harkavirus</i>	<i>Mischivirus</i>	<i>Rabovirus</i>	<i>Teschovirus</i>
<i>Cardiovirus</i>	<i>Hepatovirus</i>	<i>Mosavirus</i>	<i>Rosavirus</i>	<i>Torchivirus</i>
<i>Cosavirus</i>	<i>Hunnivirus</i>	<i>Oscivirus</i>	<i>Sakobuvirus</i>	<i>Tremovirus</i>

Πίνακας 1: Τα 35 γένη των *Picornaviridae*.

Κάθε γένος αποτελείται από διακριτά αντιγονικά στελέχη, τα οποία διαχωρίζονται ανάλογα με τις ομοιότητες που εμφανίζουν ως προς τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ισωματίου, τη γενωμική αλληλουχία και την οργάνωση του γονιδιώματος (Knipe D. M. et al, (2007)).

Το πιο σημαντικό γένος ως προς την πρόκληση ασθενειών στον άνθρωπο είναι το γένος των εντεροϊών. Οι εντεροϊοί, αποτελούνται από μέλη που κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες: τους Πολιοϊοιούς (PV, ορότυποι 1-3), τους ιούς Coxsackie A (CAV, ορότυποι 1-24), τους ιούς Coxsackie B (CBV, ορότυποι 1-6) και τους ιούς Echo (E, ορότυποι 1-33) (Knipe D. M. et al, (2007)).

Με την εξέλιξη του ταξινομικού συστήματος οι εντεροϊοί χωρίστηκαν σε 12 διακριτά είδη με πολλαπλούς οροτύπους ο καθένας.

Γένος εντεροϊών	Ορότυποι
<i>Enterovirus A</i>	25
<i>Enterovirus B</i>	61
<i>Enterovirus C</i>	23
<i>Enterovirus D</i>	5
<i>Enterovirus E</i>	4
<i>Enterovirus F</i>	6
<i>Enterovirus G</i>	11
<i>Enterovirus H</i>	1
<i>Enterovirus J</i>	6
<i>Rhinovirus A</i>	80
<i>Rhinovirus B</i>	32
<i>Rhinovirus C</i>	54

Πίνακας 2: Τα γένη των εντεροϊών και ο αντίστοιχος αριθμός οροτύπων τους.

Κάθε ορότυπος συσχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου ξενιστή, την προστασία από την ασθένεια, τη χρήση των υποδοχέων και σε μικρότερη κλίμακα, το φάσμα της κλινικής νόσου. Οι συσχετισμοί αυτοί με βάση τις ασθένειες, έχουν μόνο μερική σχέση με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε πολιοϊούς, ιούς Coxsackie A ή B και ιούς Echo, η οποία έγινε βασισμένη στην βιολογική ενεργότητα και νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με χαλαρή παράλυση (πολιοϊοί)-χαλαρή παράλυση σε νεογνά ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ και στοματικές φλύκταινες (ιοί Coxsackie A)-σπαστική παράλυση σε νεογνά ποντίκια και ανθρώπινη καρδιακή νόσος και νόσος του ΚΝΣ (ιοί Coxsackie B). Μεταξύ αυτών των ομάδων, οι ιοί μπορούν να ξεχωρίσουν ανάλογα με την αντιγονικότητα τους, όπως αυτή προσδιορίζεται με την βοήθεια αντί-ορών (Pallansch M. et all (2013)).

Οι ομαδοποιήσεις βάσει της αντιγονικότητας, που προσδιορίζουν τον ορότυπο, έγιναν περισσότερο πολύπλοκες καθώς αυξάνονταν ο αριθμός των διαφορετικών ιών. Η διάκριση μεταξύ οροτύπων άρχισε να περιπλέκεται καθώς ανακαλύπτονταν ιοί που σχετίζονταν ελάχιστα αντιγονικά με γνωστούς οροτύπους. Ωστόσο, παρά τους περιορισμούς αυτούς, ο ορότυπος παραμένει μια ανοσολογική ιδιότητα που διαχωρίζει τους διαφορετικούς εντεροϊούς (Racaniello, V. R. (2013)).

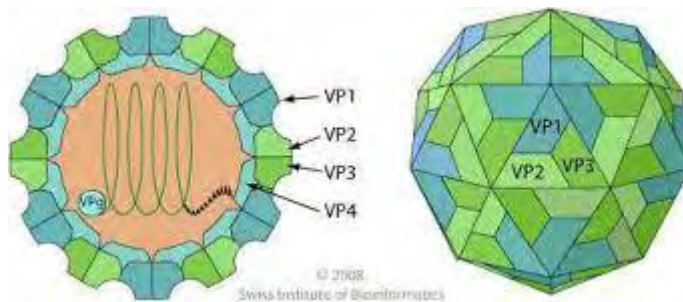
1.2 Εντεροϊοί της ομάδας C

Το είδος των εντεροϊών της ομάδας C αποτελείται από 23 διαφορετικούς ορότυπους, οι οποίοι χωρίζονται σε τρεις διακριτές υποομάδες:

- 1) Τους Πολιοϊούς, με τα αντίστοιχα εμβολιακά στελέχη σε παρένθεση: PV-1 (Sabin 1), PV-2 (Sabin 2), PV-3 (Sabin 3)
- 2) Τους ιούς Coxsackie A: CAV1, CAV11, CAV13, CAV17, CAV19, CAV20, CAV21, CAV22, CAV24
- 3) Και τους νέους εντεροϊούς που έχουν ταυτοποιηθεί και ταξινομηθεί με βάση το νέο σύστημα ταξινόμησης: EV 95, EV 96, EV 99, EV 102, EV 104, EV 105, EV 109, EV 113, EV 116, EV 117, EV 118

Οι πολιοϊοί εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια με τους ιούς Coxsackie A της ομάδας C. Αυτή η αυξημένη συγγένεια μεταφράζεται και ως αυξημένη πιθανότητα για εμφάνιση ετεροτυπικών ανασυνδυασμών μεταξύ των δυο ιών (Combelas N., (2011)).

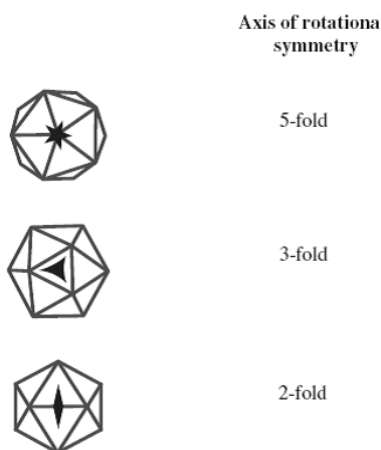
1.3 Δομή και αντιγονικότητα των ισωματιών



Εικόνα 1: Δομή ισωματίου εντεροϊού.

Τα ισωμάτια των εντεροϊών είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30 nm. Είναι απλά καθώς αποτελούνται αποκλειστικά από πρωτεϊνικό περίβλημα, το οποίο περιβάλλει το γυμνό RNA, δεν διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο και έχουν μικρή μολυσματικότητα σε οργανικούς διαλύτες.

Τα καψίδια των εντεροϊών σχηματίζονται από 60 αντίγραφα τεσσάρων πρωτεϊνών: VP1, VP2, VP3 και VP4. Ο καλύτερος τρόπος συναρμολόγησης ενός κελύφους με μη ταυτόσημες υπομονάδες είναι να διαταχθούν οι πρωτεΐνες με εικοσαεδρική συμμετρία (Caspar D. L., et all (1962)). Ένα εικοσάεδρο είναι ένα στερεό σώμα που αποτελείται από είκοσι τριγωνικές πλευρές και δώδεκα κορυφές. Ο μικρότερος αριθμός υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία μίας τέτοιας δομής, είναι 60. Στο καψίδιο εντοπίζονται 3 άξονες συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας, ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας.



Εικόνα 2: Άξονες συμμετρίας εικοσαεδρικού καψιδίου. (Rueckert, R. R., et al (1969))

Τα αποτελέσματα μελετών περίθλασης ακτίνων Χ ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και βιοχημικών μελετών στα ισοσώματα και τα προϊόντα διαχωρισμού τους, οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες σε εικοσαεδρική κατανομή (Rueckert R. R. et al (1969)). Βασικό δομικό στοιχείο του καψιδίου των εντεροϊών είναι το πρωτομερές (P1), το οποίο περιέχει ένα αντίγραφο από κάθε δομική πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3 και VP4. Η βασική μονάδα του εικοσαεδρικού καψιδίου είναι ένα πενταμερές το οποίο αποτελείται από πέντε αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης VP0, στην οποία συνδέονται ομοιοπολικά οι VP2 και VP4. Δώδεκα τέτοια πενταμερή ενώνονται κατά τη συναρμολόγηση του καψιδίου, ώστε να σχηματιστεί το προκαψίδιο.

Κατά την καψιδίωση του RNA του ιού, πραγματοποιείται η αντίδραση ωρίμανσης, κατά την οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 διασπάται στις VP2 και VP4 δομικές πρωτεΐνες του ιού, με σκοπό τη σταθεροποίηση του ώριμου πλέον ιού. Το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου σχηματίζεται από τις VP1, VP2 και VP3, ενώ η VP4 βρίσκεται εξολοκλήρου εσωτερικά του καψιδίου (Stanway G., (1990)). Η VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν καμία ομολογία όσον αφορά την αλληλουχία τους, ωστόσο και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β'-βαρελίου, το οποίο διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων για τον σχηματισμό ενός πυκνού και άκαμπτου πρωτεϊνικού περιβλήματος.

Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIII A και N-AgIII B (Pfister T. et al, (1999)):

- i. Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 97, 99-101 της VP1
- ii. Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-224 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.
- iii. Η N-AgIIIΑ αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60, 66, 70 και 73 της VP3 καθώς και 236 της VP2 και 286-290 της VP1.
- iv. Η N-AgIIIΒ από τα αμινοξέα 75-79 και 144 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.

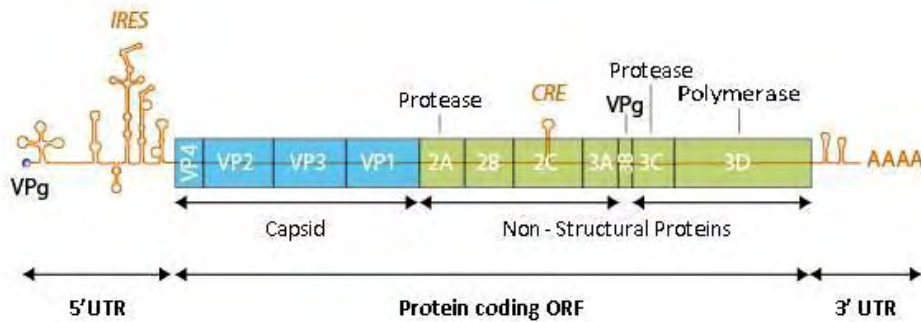
Αντιθέτως τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο με την VP4 η οποία είναι συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της με το μυριστικό οξύ.

Η εξωτερική επιφάνεια του ιού χαρακτηρίζεται τόσο από προεξοχές όσο και από αυλακώσεις. Σημαντικότερη είναι μια βαθιά αυλάκωση (canyon), η οποία διαμορφώνεται στη σύνδεση της VP1 με τη VP3 και εντοπίζεται περιμετρικά του άξονα πενταπλούς συμμετρίας, η οποία αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό του υποδοχέα (Pfister T. et al, (1999)).

1.4 Οργάνωση του ιικού γενώματος

Το γονιδίωμα των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+ssRNA), μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Μετά την είσοδο των ιών στο κύτταρο ξενιστή, το γονιδίωμα των εντεροϊών λειτουργεί απευθείας ως mRNA και μεταφράζεται στο κυτταρόπλασμα με σκοπό να παραχθούν όλες οι ιικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή του ιού. Το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελείται από τα επιμέρους τμήματα: την 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR), ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), την 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR) και την poly (A) ουρά, μία πολυαδενυλιωμένη περιοχή.

Το γενωμικό RNA των πολιοϊών είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται VPg (Virion Protein, genome linked) (Flanagan et al, (1977) & Lee Y. F., (1977)). Η VPg βρίσκεται στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, γεγονός που οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η VPg είναι ένας εκκινητής για τη σύνθεση του RNA (Nomoto, Detjen et al.& (1977), & Pettersson et al., (1978)).



Εικόνα 3: Το γονιδίωμα των Εντεροϊών (Ehrenfeld E. et all, (2010)).

Με τη βοήθεια ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αποκαλύφθηκε ότι οι 5' μη-κωδικές περιοχές των εντεροϊών είναι μεγάλες, περίπου 750 νουκλεοτίδια και υψηλά συντηρημένες. Σε αυτή την περιοχή του γονιδιώματος περιέχονται αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και τη μετάφραση του γενώματος. Πιο συγκεκριμένα, περιέχεται η εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES-Internal Ribosome Entry Site) που κατευθύνει τη μετάφραση των mRNAs με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα (Racaniello, V. R., (2013)).

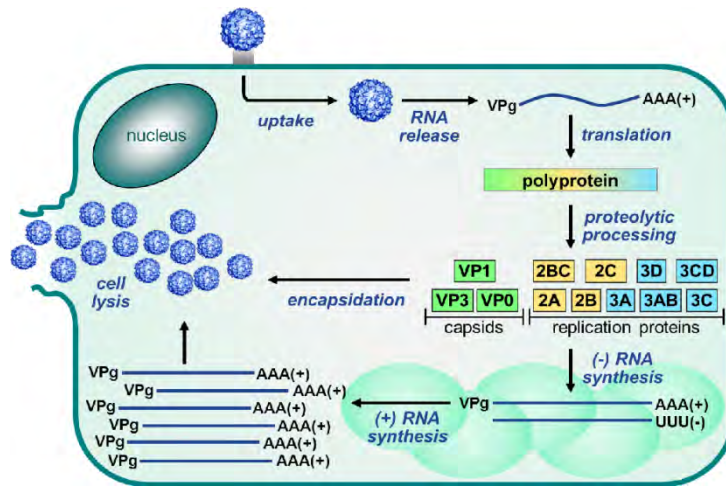
Βιοχημικές μελέτες σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊούς, προέβλεψαν την παρουσία ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ιικό RNA, το οποίο μετά από επεξεργασία χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό μεμονωμένων ικών πρωτεϊνών (Summers & Maizel, (1968)). Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος των πολιοϊών, κάτι που αποκάλυψε ότι το ιικό RNA κωδικοποιεί για ένα μοναδικό ανοιχτό αναγωστικό πλαίσιο ORF (Kitamura N. et all, (1981)).

Σε αντίθεση με την 5' μη-κωδική περιοχή η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών είναι αρκετά μικρή, περίπου 72-100 νουκλεοτίδια και φέρει επίσης μια δευτεροταγή δομή, που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA (Jacobson S. J. et all, (1993)). Αυτή η νουκλεοτιδική περιοχή αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA (Oberste M. S. et all, (2006)). Παρόλα αυτά, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών για τη μόλυνση των κυττάρων του ξενιστή (Brown D. M. et all, (2005) & Todd S. et all, (1997)). Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA των εντεροϊών φέρουν μια πολύ(A) ουρά (Yogo Y. et all, (1974)).

1.5 Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών

Οι εντεροϊοί ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους στο κυτταρόπλασμα. Το πρώτο βήμα στην ιική μόλυνση είναι η προσκόλληση του ιικού σωματίου στον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή. Η παρουσία ή η απουσία των υποδοχέων παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια του ιού (Brooks F. G. et al, (2013)). Μετά τη πρόσδεση στον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή, το ιοσωμάτιο εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω ενδοκύτωσης και πραγματοποιείται η απέκδυση του ιού. Η διαδικασία της απέκδυσης είναι ο φυσικός διαχωρισμός του ιικού νουκλεϊκού οξέος RNA από τα εξωτερικά δομικά συστατικά του ιοσώματος στο κυτταρόπλασμα έπειτα από δομικές αλλαγές στο καψίδιο του ιού. Το γονιδίωμα των εντεροϊών ως μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, λειτουργεί απευθείας ως mRNA, το οποίο μεταφράζεται αμέσως μετά τη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή χρησιμοποιώντας τα κυτταρικά ριβοσώματα. Από την μετάφραση προκύπτει μία πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται στις δομικές (VP1-VP4) και στις λειτουργικές πρωτεΐνες (2 πρωτεάσες, 1 ελικάση, RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση) του ιού. Μία από τις λειτουργικές πρωτεΐνες που παράγονται είναι η 3D ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, η οποία καταλύει την αντιγραφή. Η αντιγραφή του ιού πραγματοποιείται σε σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ιικό RNA. Αυτά τα αντιγραφικά σύμπλοκα περικλείονται σε κυστίδια τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Για να μπορέσει να αντιγραφεί ο ιός, πρέπει αρχικά το γονιδίωμα του να μετατραπεί σε μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση πολλών κλώνων RNA θετικής πολικότητας. Ένα μέρος των (+) RNA κλώνων θα χρησιμοποιηθεί ως mRNA και ένα μέρος θα αποτελέσει το γένωμα των ώριμων πλέον ιικών σωματιδίων. Αφού λοιπόν γίνει η σύνθεση του καψιδίου από τις δομικές πρωτεΐνες, ακολουθεί η καψιδίωση του ιού και η έξοδος του από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης του κυττάρου (Knipe D. M. et al, (2007)).

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη κύκλο ενός εντεροϊού, ποικίλλει από 5 έως 10 ώρες και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο ξενιστή και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης (Racaniello V. (2007)).

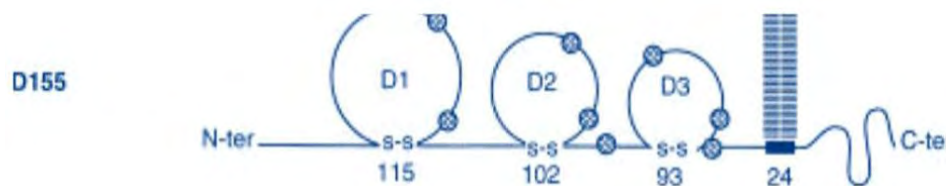


Εικόνα 4: Κύκλος ζωής των Εντεροϊών (Brooks F. G. et all, (2013)).

1.5.1 Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο

Όπως προαναφέρθηκε οι εντεροϊοί ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων με τη σύνδεσή τους σε έναν υποδοχέα της μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή. Μια μεγάλη ποικιλία από μόρια όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και γλυκολίπδια χρησιμοποιούνται από τους εντεροϊούς ως υποδοχείς. Η φύση των υποδοχέων αυτών παρέμενε άγνωστη μέχρι το 1989 που ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας των πολιοϊών (PVR) (Mendelsohn C. L. et all, (1989)). Στους περισσότερους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη αύλακα (canyon) και προκαλούν την αναδιάταξη του ιικού καψιδίου (Rossmann M. G. et all, (2002)).

Η εξειδίκευση και έκφραση του υποδοχέα καθορίζει ποια κύτταρα μπορεί να μολύνει κάθε ιός, δηλαδή τον τροπισμό του και εν μέρει, την παθογόνο δράση του, καθώς και τη φύση της ασθένειας που προκαλεί.



Εικόνα 5: Δομή του υποδοχέα PVR (Shaukat K. et all, (2008)).

Συγκεκριμένα για τους ευρέως μελετημένους πολιοϊούς, ο κυτταρικός υποδοχέας είναι ο CD155 ή PVR (poliovirus receptor). Η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα των πολιοϊών αποκάλυψε ότι ο υποδοχέας είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μια ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή ακολουθούμενη από δύο τύπου C2 περιοχές. Αποτελέσματα τριών διαφορετικών

πειραμάτων έδειξαν ότι η πρώτη Ig-like περιοχή είναι η περιοχή που φέρει τη θέση σύνδεσης των πολιοϊών (Koike S. et all, (1991) & Racaniello V. R. et all, (1981)).

Κάποια μέλη των εντεροϊών της ομάδας C, όπως για παράδειγμα οι ιοί Cocksackie A (CAV 13,17,20,21,24), χρησιμοποιούν τον υποδοχέα ICAM-1 ή αλλιώς CD54 για την είσοδό τους στο κύτταρο ξενιστή (Racaniello V. R. et all, (1981)). Ο CD54 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, που βρίσκεται στην επιφάνεια ενδοθηλιακών κυττάρων και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

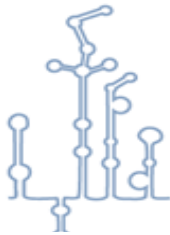
Οι περισσότεροι εντεροϊοί της ομάδας B χρησιμοποιούν τα ευρέως διαθέσιμα μόρια DAF (decay-accelerating factor) και CAR (Cocksackie and adenovirus receptor) προκειμένου να εισέλθουν στα κύτταρα ξενιστές τους (Marjomäki V. et all, (2015)). Ορισμένα μέλη των εντεροϊών της ομάδας B, όπως για παράδειγμα οι ιοί Cocksackie B (B1-B6) χρησιμοποιούν τον υποδοχέα CAR ενώ ορισμένοι Echo ιοί όπως (E6,E7,E11,E12,E13,E20,E21,E29,E33) χρησιμοποιούν τον υποδοχέα DAF. Τον υποδοχέα DAF μπορούν να χρησιμοποιήσουν επίσης οι ιοί Cocksackie B1, B3 και B5.

Η αλληλεπίδραση του εντεροϊού με τον υποδοχέα του, οδηγεί σε σημαντικές δομικές αλλαγές στον ιό. Τα σωματίδια που προκύπτουν, τα οποία καλούνται altered ή A σωματίδια, περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική καψιδιακή πρωτεΐνη VP4. Επιπρόσθετα, η N-τελική περιοχή της VP1, η οποία φυσιολογικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται στην επιφάνεια των σωματιδίων A (Fricks C. E. et all, (1990)). Η αλληλουχία αυτή της VP1 είναι υδροφοβική και τα σωματίδια A έχουν μια αυξημένη συγγένεια προς τις μεμβράνες σε σχέση με τα ιοσωμάτια. Το λιπόφιλο N-άκρο της VP1 εισέρχεται στη συνέχεια στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Το RNA δεν είναι γνωστό εάν εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την κυτταρική μεμβράνη ή από την μεμβράνη των ενδοσωμάτων (ενδοκύτωση). Είναι όμως σίγουρο ότι η ενδοκύτωση από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει στην απέκδυση του ιού, καθώς οι αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση είναι αυτές που οδηγούν στην απέκδυσή του (Racaniello V. (2007)).

1.5.2 Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης

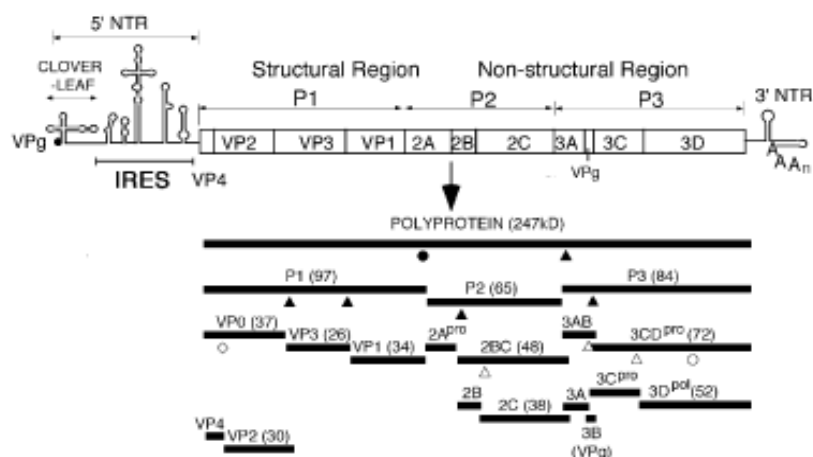
Κατά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα το θετικής πολικότητας RNA πρέπει να μεταφραστεί καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση και δεν έχει εισέλθει στο κύτταρο κανένα ιικό ένζυμο του καψιδίου. Το θετικής πολικότητας RNA δεν φέρει δομές 5'-καλύπτρας, είναι όμως συνδεδεμένο με την VPg πρωτεΐνη, η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο (Ambros V. et all, (1980)). Νουκλεοτιδική αλληλούχηση του θετικού κλώνου του πολιοϊού, ο οποίος αποτελεί και το καλύτερα μελετημένο μοντέλο των

εντεροϊών, αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο, που περιέχει επτά AUG κωδικόνια (Kitamura et al., (1981) & Racaniello & Baltimore, (1981)). Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή που προάγει τη σύνδεση με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα ονομάστηκε εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος IRES (Internal Ribosome Entry Site).



Εικόνα6: Περιοχή IRES Blondel B. et al, (2009)).

Οι πρωτεΐνες των πολιοϊών συντίθενται από τη μετάφραση του ORF που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας ιικό RNA γένωμα και ακολουθεί τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης από πρωτεϊνάσες που κωδικοποιούνται από τον ιό. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει τη σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη δεν είναι εμφανής στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται κατά τη σύνθεσή της. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη επεξεργάζεται συμμεταφραστικά από ενδομοριακές αντιδράσεις (in cis) που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί, ακολουθούμενοι από δευτερεύουσες επεξεργασίες in cis ή in trans (διαμοριακές). Το γένωμα των εντεροϊών κωδικοποιεί για δυο πρωτεϊνάσες: την 2A^{pro} και την 3C^{pro} ή 3CD^{pro} (Racaniello V. (2007)).



Εικόνα 7: Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης για παραγωγή των επιμέρους πρωτεϊνών των εντεροϊών.

Η 3Cpro και η 2Apro είναι ενεργές στο πολυπεπτίδιο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από αυτό με αυτό-τεμαχισμό. Μόλις ελευθερωθούν οι πρωτεΐνες, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη *in trans*. Σε κύτταρα μολυσμένα με εντεροϊούς, το αρχικό γεγονός αποτελεί η απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2-P3 μέσω της 2Apro. Στη συνέχεια η 3CDpro απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο με αυτοκαταλυτικό τεμαχισμό. Αυτή η πρωτεΐνη, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ιικής RNA πολυμεράσης, πραγματοποιεί δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπτίδια γλουταμινικού-γλυκίνης στον πολιοϊό τύπου 1 πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την 3Cpro. Τόσο η 3Cpro όσο και η 3CDpro επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια δραστηριότητα. Σε μία αλληλουχία γεγονότων διάσπασης *in-trans* από την 3CDpro, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3Cpro, 3Dpro και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Η 3Dpro αλληλουχία μέσα στην 3CDpro απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας δραστηριότητα από το 3Cpro μέρος του ενζύμου. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Ένα πλεονέκτημα της στρατηγικής αυτής είναι ότι η έκφραση μπορεί να ελεγχθεί από το ρυθμό και την έκταση την πρωτεολυτικής διαδικασίας. Εναλλακτική χρήση των θέσεων πρωτεόλυσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πρωτεϊνών με διαφορετικές δραστηριότητες (Racaniello V. (2007)).

1.5.3 Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Η αντιγραφή του ιού ξεκινάει μετά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή και πραγματοποιείται στα αντιγραφικά σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ιικό RNA. Πιο συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα αυτά αποτελούνται από ιικές πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}, η 2C^{ATPase}, η 3A, η 3B, οι πρόδρομες πρωτεΐνες 2BC και 3AB καθώς και κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2. Μέρος του συμπλόκου αυτού αποτελεί και το ιικό RNA, που περιέχει *cis-acting* όπως η δομή "cloverleaf" που βρίσκεται στην 5'-UTR και η δομή CRE η οποία εντοπίζεται στην 2C κωδική περιοχή. Αυτά τα αντιγραφικά σύμπλοκα περικλείονται σε κυστίδια τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Egger D. et al, (2000) & Egger D. et al, (2002) & Bienz K. et al, (1987) & Cho M. W. et al, (1994)). Οι ιικές πρωτεΐνες 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινητή VPg στην μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η 3AB δεσμεύει την 3Dpro και την 3CDpro, κατευθύνοντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να αγκυροβολήσει το ιικό RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής (Echeverri A. C. et al, (1995)).

Προκειμένου να αντιγραφεί ο ιός, πρέπει αρχικά το γονιδίωμα του να μετατραπεί σε μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση πολλών κλώνων RNA θετικής πολικότητας (Murray K. E. et all, (2003)).

Ένα μοντέλο αντιγραφής του RNA θα μπορούσε να είναι το εξής:

ικό RNA(+) → σύνθεση RNA(-) → RF → σύνθεση RNA(+) → RI → RNA(+)

Όπου RF (replicative form) δίκλωνο RNA πλήρους μήκους και RI (replicative intermediate) κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένος σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Η σύνθεση του ικού RNA είναι ασύμμετρη καθώς, η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών (Novak J. E. et all, (1991)).

Η αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού καταλύεται από το ένζυμο RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, η οποία είναι πολυμεράση του ιού (3Dpol) και παράγεται μετά από τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης 3CDpro, η οποία είναι άκρως δραστική ως πρωτεϊνάση αλλά δεν έχει δράση πολυμεράσης. Η 3Dpol είναι ένα ένζυμο που εξαρτάται από εκκινητή. Σε πειράματα *in vitro* η 3Dpol δεν αντιγράφει το RNA των ιών χωρίς έναν ολίγο(U) εκκινητή. Τον ρόλο του εκκινητή στους εντεροϊούς έχει η πρωτεΐνη VPg, η οποία είναι συνδεδεμένη στο ικό RNA, αλλά επίσης και στο 5'-άκρο των νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδιλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να σχηματίσει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element), που βρίσκεται στην κωδική περιοχή των εντεροϊών (Rieder E. et all, (2000) & Paul A.V. et all, (2000)) & Yin J. et all, (2003)).

Το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA, αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του κλώνου RNA αρνητικής πολικότητας. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Ως τέτοιος μηχανισμός προτάθηκε η δομή cloverleaf (τριφυλλιού) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA, η οποία ρυθμίζει τότε το RNA αντιγράφεται και τότε μεταφράζεται. Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, η σύνδεση της πολύ-r(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης (PCBP) στην δομή αυτή, επάγει τη μετάφραση. Όταν η 3CDpro συντεθεί, δεσμεύεται στη δομή cloverleaf, καταστέλλει τη μετάφραση και επάγει τη σύνθεση του RNA. Ωστόσο, από πειραματικά στοιχεία, προκύπτει ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα τη σύγκρουση της RNA πολυμεράσης με το ριβόσωμα (Gamarnik A. V. et all, (1998)).

1.5.4 Καψιδίωση και απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιοσωματίων

Κατά τη σύνθεση της πρόδρομης καψιδιακής πρωτεΐνης P1, πραγματοποιείται ο σχηματισμός των κεντρικών περιοχών β-βαρελίου και των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών όπου οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Μόλις η P1 πρωτεΐνη ελευθερωθεί από τη 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 πέπτονται από την πρωτεϊνάση 3CDpro. Οι θέσεις κοπής βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β-βαρελίων. Στο ώριμο καψίδιο, το καρβοξυτελικό άκρο των VP1, VP2 και VP3 βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ το αμινοτελικό άκρο στο εσωτερικό, όπου συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Μέσω αυτής της επεξεργασίας παράγεται το πρώτο συγκροτημένο ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, η ανώριμη δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο της VP0, VP3 και VP1. Έπειτα, πέντε πρωτομερή συγκροτούνται για το σχηματισμό ενός πενταμερούς. Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει την πέψη των περισσότερων VP0 μορίων σε VP4 και VP2, ωστόσο η πρωτεϊνάση που πραγματοποιεί τον τελευταίο αυτό τεμαχισμό ωρίμανσης δεν έχει ταυτοποιηθεί. Ο δεσμός της VP0 που πέπτεται, βρίσκεται στο εσωτερικό των καψιδίων και στα ώριμα ιικά σωματίδια και δεν είναι προσιτός από ικές και κυτταρικές πρωτεϊνάσες (Nomoto A. et al, (1977) & Novak J. E. et al, (1991)).

Η καψιδίωση των *picorna* ιών είναι εξαιρετικά ειδική και οδηγεί στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων RNA και όχι του ιικού mRNA, του αρνητικού κλώνου RNA ή οποιουδήποτε άλλο κυτταρικού RNA (Nomoto A. et al, (1977) & Novak J. E. et al, (1991)).

Η VPg δεν αποτελεί σήμα καψιδίωσης, καθώς ο αρνητικός κλώνος RNA που περιέχει την VPg δεν πακετάρεται. Η σύνδεση της καψιδίωσης με τη σύνθεση του ιικού RNA μπορεί να εξηγήσει την εκλεκτικότητα του πακεταρίσματος με τον ιικό θετικό κλώνο RNA. Σε ότι αφορά την απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιικών σωματιδίων, είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι εντεροϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης (Tucker S. P. et al, (1993)).

1.6 Επιπτώσεις στο κύτταρο ξενιστή

Η μόλυνση του κυττάρου ξενιστή από κάποιον εντερικό οδηγεί στην αναστολή ορισμένων φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών. Το γεγονός αυτό είναι απόρροια της δράσης ορισμένων ιικών πρωτεϊνών που προκύπτουν έπειτα από το τεμαχισμό της πολυπρωτεΐνης, η οποία παράγεται ύστερα από τη μετάφραση του θετικής πολικότητας RNA του εντεροϊού.

Η 2A πρωτεάση διασπά τον παράγοντα p220 του συμπλόκου eIF-4F, που απαιτείται για τη μετάφραση των κυτταρικών mRNAs που εξαρτάται από την 5' καλύπτρα. Το RNA των εντεροϊών δε φέρει μεθυλιωμένη καλύπτρα στο 5' άκρο του, αλλά είναι τροποποιημένο από την προσθήκη της VPg πρωτεΐνης, γεγονός που του επιτρέπει να συνεχίσει να μεταφράζεται. Συνεπώς με τον τρόπο αυτό ο ιός καταστέλλει την μετάφραση του κυττάρου ξενιστή ενώ δεν επηρεάζεται η μετάφραση του δικού του RNA (Whitton J. L. et all, (2005)).

Εκτός από τη μετάφραση, έχει δειχθεί ότι αναστέλλεται και η μεταγραφή του κυττάρου-ξενιστή έπειτα από λοίμωξη με κάποιον ιό ricorna. Μετά τη μόλυνση ενός κυττάρου ξενιστή με κάποιον πολιοϊό, αναστέλλεται η μεταγραφή που επιτελείται και από τα τρία είδη RNA πολυμερασών που υπάρχουν στα κύτταρα μέσω της μεσολάβησης της 3C πρωτεάσης, η οποία διασπά πλήθος κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων σε κατάλοιπα Gln-Gly (Whitton J. L. et all, (2005) & Sharma R. et all, (2004)).

Όπως έχει προαναφερθεί ο κύκλος ζωής των εντεροϊών ολοκληρώνεται στο κυτταρόπλασμα και η μεταγραφή του κυττάρου πραγματοποιείται στον πυρήνα. Πώς λοιπόν η 3C πρωτεάση αποκτά πρόσβαση στον πυρήνα; Μία σχετικά πρόσφατη μελέτη έδειξε πως λόγω του ότι η 3C πρωτεάση στερείται σήμα εντοπισμού για τον πυρήνα (NLS), εισέρχεται στον πυρήνα με την πρόδρομη μορφή 3CD, καθώς η 3D φαίνεται να διαθέτει ένα NLS. Η πρόδρομη μορφή 3CD ακολούθως παράγει την 3C με αυτοκατάλυση, οδηγώντας τελικά στη διάσπαση των μεταγραφικών παραγόντων στον πυρήνα (Sharma, R. et all, (2004)).

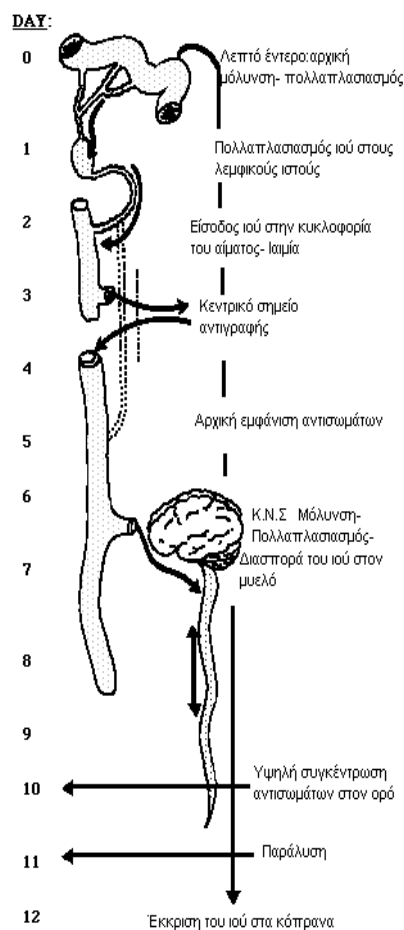
Επιπροσθέτως, έχει φανεί ότι μετά τη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή από έναν ιό ricorna έχουμε τόσο προ-αποπτωτικές όσο και αντι-αποπτωτικές επιδράσεις στο κύτταρο. Έχει προταθεί ότι ενώ αρχικά οι ιοί ricorna προάγουν την απόπτωση, λίγο πριν επιτευχθεί ο κυτταρικός θάνατος ενεργοποιούν ένα εναλλακτικό μονοπάτι ώστε να προλάβουν να ολοκληρώσουν την αντιγραφή τους (Whitton J. L. et all, (2005)).

1.7 Παθογένεια

Η είσοδος του εντεροϊού γίνεται κυρίως από το στόμα και η μόλυνση με εντεροϊούς ξεκινά από το πεπτικό σύστημα. Η μόλυνση συμβαίνει στις βλεννώδεις επιφάνειες του φάρυγγα και του εντέρου και στη συνέχεια των τοπικών λεμφαδένων και ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός του ιού. Έπειτα γίνεται είσοδος του ιού στην κυκλοφορία του αίματος (αιμία), όπου γίνεται εντονότερος ο πολλαπλασιασμός του ιού και τελικά πραγματοποιείται η μεταφορά στο όργανο-στόχο.

Ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας, είναι συνήθως 7-14 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2-35 ημέρες, σε ακραίες περιπτώσεις. Μετά τη μόλυνση με εντεροϊό, ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για 8 εβδομάδες και είναι παρών στο φάρυγγα για 1-2 εβδομάδες. Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί εκτός από κόπρανα και φαρυγγικά επιχρίσματα και από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, από το νωτιαίο μυελό, από τον εγκέφαλο, την καρδιά, τον επιπεφυκότα και από πληγές του δέρματος ή από βλεννώδεις μεμβράνες των ασθενών (Melnick J. L. et al, (1990) & Palacios G. et al, (2005)).

Οι κλινικές εκδηλώσεις των εντεροϊών ποικίλουν από ασυμπτωματικές μολύνσεις μέχρι την εκδήλωση πολύ σοβαρών ασθενειών όπως μυοκαρδίτιδας, εγκεφαλοπάθειας αλλά και χαλαρής παράλυσης. Η έκβαση της κλινικής εικόνας έπειτα από μόλυνση με εντεροϊούς σχετίζεται με την ηλικία αλλά και το ανοσολογικό επίπεδο του ασθενούς ((Melnick J. L. et al, (1990) & Palacios G. et al, (2005)).



Εικόνα 8: Μοντέλο του Sabin για την παθογένεια των πολιοϊών (Pallansch et al., 2013).

1.8 Μηχανισμοί εξέλιξης των εντεροϊών

Οι μεταλλάξεις και ο ανασυνδυασμός είναι οι δύο κύριοι μηχανισμοί που ευθύνονται για τη μεγάλη ποικιλομορφία και την εξέλιξη των εντεροϊών (Domingo E. et al, (1997)).

1.8.1 Μεταλλάξεις

Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των RNA λυτικών ιών και η μοριακή του βάση κατά την αντιγραφή του ιικού RNA εντοπίζεται i) στην επιρρεπή σε λάθη RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση η οποία υπολογίζεται ότι έχει συχνότητα λάθους ένα στα 10^3 έως 10^4 νουκλεοτίδια και ii) στην απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών (Wimmer E. et al, (1993)).

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις από τις οποίες οι μεταπτώσεις (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι μεταστροφές (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίθετο). Η μετάλλαξη A→G είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι πιο σπάνιες (Figlerowicz M. et al, (2003)).

Χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των εντεροϊών αποτελεί ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της αντιγονικής πίεσης που υφίστανται. Ως απόρροια αυτού ο ιός μπορεί να διαφύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά στις μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών, όπως ότι η δομή του καψιδίου πρέπει να διατηρείται σταθερή, καθώς και οι περιοχές που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα ή την αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα. Συνεπώς το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελεί μία συμβίωση γονιδίων όπου το καθένα από αυτά εξελίσσεται ανεξάρτητα από τα άλλα, δηλαδή οι καψιδιακές πρωτεΐνες, οι μη δομικές πρωτεΐνες και οι μη κωδικές περιοχές εξελίσσονται ανεξάρτητα (Lukashev A. N. et al, (2003)).

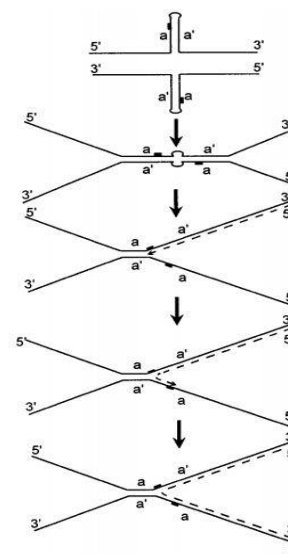
1.8.2 Ανασυνδυασμός

Ο γενετικός ανασυνδυασμός των RNA ιών αρχικά περιγράφηκε για τους πολιοϊούς από τον Hirst το 1962. Ο ανασυνδυασμός αποτελεί ισχυρότερο μηχανισμό εξέλιξης σε σχέση με τις μεταλλάξεις, διότι μπορεί να μεταφέρει έναν ορισμένο αριθμό ιδιοτήτων σε έναν ιό με ένα και μόνο γεγονός (Guillot S. et al, (2000)).

Ο ανασυνδυασμός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών καθώς ευνοεί την εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή οδηγώντας στην διατήρηση ενός γενοτύπου αγρίου τύπου. Επιπλέον, συμβάλλει στην δημιουργία ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση όπως π.χ. η βελτιωμένη ικανότητά τους να αντιγράφονται στον γαστρεντερικό σωλήνα σε σχέση με τα πατρικά στελέχη. Τέλος, μέσω του γενετικού ανασυνδυασμού επιταχύνεται η εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου (homotypic) ή και διαφορετικών οροτύπων (heterotypic) (Kottaridi C. et al, (2007) & Dedepsidis E. et al, (2008)).

Ο αντιγραφικός μηχανισμός ή αλλιώς μηχανισμός αλλαγής μήτρας είναι ο βασικότερος μηχανισμός πραγματοποίησης ανασυνδυασμού. Κατά τη διάρκεια σύνθεσης του αρνητικού κλώνου RNA από την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, το ένζυμο μπορεί να συναντήσει κάποιο εμπόδιο όπως μία δευτεροταγή δομή φουρκέτας (Romanova L. I. et al, (1986)) ή ένα λάθος ενσωματωμένο νουκλεοτίδιο και να σταματήσει τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου (Pilipenko E. V. et al, (1995)). Με τον τρόπο αυτό η ιική 3D πολυμεράση αποδεσμεύεται μαζί με το νεοσυντιθέμενο κλώνο και μεταπηδά σε έναν άλλον RNA κλώνο θετικής πολικότητας, τον οποίο θα χρησιμοποιήσει πλέον σαν καλούπι για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Αποτέλεσμα αυτού είναι η δημιουργία χμιαϊκών μορίων. Όταν η μετάβαση από το ένα εκμαγείο στο άλλο είναι ακριβής, ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος, αντίθετα μη ακριβής μετάβαση οδηγεί σε μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως π.χ. σε ελλείψεις και διπλασιασμούς (Kirkegaard K. et al, (1986)).

Ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά την σύνθεση των (-)RNA κλώνων για δύο κυρίως λόγους. Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται σημαντικά από την διαθεσιμότητα των RNA μορίων που δρουν ως δέκτες και οι (+)RNA κλώνοι σε σύγκριση με τους (-)RNA κλώνους είναι πολύ περισσότεροι στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων. Επίσης οι (-)RNA κλώνοι βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε



Εικόνα 9: Μηχανισμός αλλαγής μήτρας (Ago1 V. I. et al, (1997)).

δίκλωνη μορφή (replicative intermediate) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία. Εκτός από τον αντιγραφικό μηχανισμό, μπορεί να συμβεί ανασυνδυασμός και μέσω του μηχανισμού ρήξης και επανένωσης. Ο μηχανισμός αυτός προϋποθέτει τη διάσπαση δύο ανασυνδυαζόμενων RNA μορίων σε κάποια σημεία και την ένωση του 5' άκρου του ενός με το 3' άκρο του άλλου μορίου. Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός είναι πιο σπάνιος σε σχέση με τον μηχανισμό αλλαγής μήτρας που περιγράφηκε προηγουμένως (Agol V. I. et al, (1997)).

1.9 Επιδημιολογία

Χάρη στη βοήθεια μελετών μοριακής παραλλαγής ιικών πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων έχουμε αποκτήσει σημαντικές επιδημιολογικές πληροφορίες για ιογενείς ασθένειες.

Οι μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των εντεροϊών καθώς παρέχουν την ευκαιρία για ταυτοποίηση του στελέχους, παρέχουν γνώσεις σχετικά με την κατάταξη των εντεροϊών και την ταξινόμησή τους και διευκρινίζουν την προέλευση των κρουσμάτων.

Η αλληλούχηση αποτελεί την κύρια επιδημιολογική μέθοδο για την άμεση ανάλυση της γενετικής παραλλαγής των εντεροϊών. Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσδιορίσει ομοιότητες και μικρές διαφορές μεταξύ αρκετών στελεχών ιών. Η εισαγωγή της τεχνικής αυτής και η εφαρμογή της στη μελέτη των απομονώσεων άγριων εντεροϊών από διαφορετικά μέρη του κόσμου έχει επεκτείνει σημαντικά την επιδημιολογική δύναμη μοριακών μελετών (Rico-Hesse R. et al, (1987)).

Αλληλούχηση έχει εφαρμοστεί πιο διεξοδικά σε μελέτες PVs, όπου η πληροφορία έχει αποδειχθεί πολύτιμη, για την υποστήριξη του παγκόσμιου προγράμματος εξάλειψης των πολιοϊών (Kew O. et al, (1993) & Kew O. M. et al, (1995)). Από τις μελέτες αυτές, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί: (α) εάν ένα απομονωμένο στέλεχος πολιοϊού σχετίζεται με τον ιό του εμβολίου, (β) ομοιότητες μεταξύ των στελεχών σε μια επιδημία και (γ) διαφορές μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Συγκρίνοντας τις αλλαγές που παρατηρούνται μεταξύ των διαφόρων στελεχών του ιού, μπορεί να προσδιοριστεί η γεωγραφική και χρονική προέλευση τους (Lipskaya G. et al, (1995) & Mulders M. N. et al, (1995) & Zheng D.P. et al, (1993)).

Μελέτες σχετικά με τη μοριακή επιδημιολογία των μη-πόλιο εντεροϊών, έχουν επικεντρωθεί στο εξελικτικό συμπέρασμα που προέρχεται από τη σύγκριση των απομονώσεων του ιού μέσα σε ένα ορότυπο, καθώς και τη σύγκριση των απομονώσεων από διαφορετικούς ορότυπους και ακόμη και μεταξύ διαφορετικών γενών εντός της οικογένειας *Picornaviridae*.

Οι non-polio εντεροϊοί, όπως για παράδειγμα οι Coxsackie A και B ιοί, αποτελούν το κορυφαίο αναγνωρίσιμο αίτιο της άσηπτης μηνιγγίτιδας, η οποία είναι η πιο συχνή ασθένεια που σχετίζεται με λοιμώξεις εντεροϊών. Σε εύκρατα κλίματα, αυτές οι λοιμώξεις εμφανίζονται κατά τη διάρκεια των μηνών του καλοκαιριού και του φθινοπώρου. Τα μικρά παιδιά είναι τα πιο κοινά θύματα, επειδή ο αριθμός των μολύνσεων με εντεροϊούς είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την ηλικία των ευπαθών ατόμων. Τα νεογνά είναι σε κίνδυνο για σοβαρή συστηματική νόσο όπως ηπατική νέκρωση, μυοκαρδίτιδα, και νεκρωτική εντεροκολίτιδα, εκ των οποίων μηνιγγίτιδα ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, είναι οι πλέον συνήθεις νόσοι.

B) Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πρότυπα στελέχη

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin1 που ανήκει στους εντεροϊούς της ομάδας C, σε συγκεντρώσεις [10] και [10⁶] TCID₅₀.

Δείγμα	Στέλεχος	Αριθμός γονιδιακής καταχώρησης
PV-1	Sabin (LSc, 2ab)	V01150

Πίνακας 3: Πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1.

2.2 Ενοφθαλμισμός SABIN1 σε κυτταροκαλλιέργειες

Σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών που περιείχαν κύτταρα Rd ενοφθαλμίστηκαν 100μl πρότυπου στελέχους Sabin1 παρουσία θρεπτικού υλικού D-MEM με 2% ορό. Οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση CPE (εικόνα κυτταροπαθογόνου δράσης του ιού) λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα Rd μη μολυσμένα ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό D-MEM με 2% ορό). Στη συνέχεια, ακολούθησαν αρκετές ανακαλλιέργειες του ιού με σκοπό την αύξηση του ιικού τίτλου, έτσι ώστε να εμφανίζεται πλήρης καταστροφή των κυττάρων 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Τέλος, οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών διατηρήθηκαν στους -20°C έως ότου ακολούθησε το επόμενο στάδιο της μέτρησης του ιικού τίτλου του ιού.

2.3 Υπολογισμός του TCID₅₀ και σειριακές αραιώσεις

Ο αριθμός των ικών σωματιδίων που περιέχονται σε 100μl του ιικού δείγματος αποτελεί τον τίτλο του ιού. Η μέτρηση του ιικού τίτλου γίνεται με τον υπολογισμό της τιμής TCID₅₀. Το μέγεθος αυτό αντιστοιχεί στην ποσότητα του ιού που είναι απαραίτητη για να προκαλέσει κυτταρικές αλλοιώσεις στο 50% των κυττάρων μιας κυτταροκαλλιέργειας. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος είναι: $\log TCID_{50} = L - d(S - 0,5)$

Όπου:

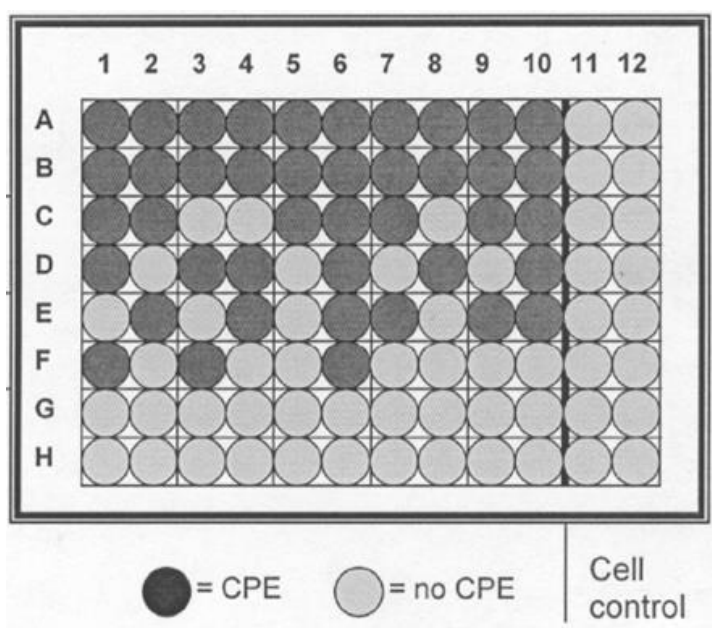
TCID: Cell Culture Infective Dose

L: η μεγαλύτερη αραιώση όπου εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είχε ως εξής: Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων προστέθηκαν 100μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση. Την επομένη μέρα αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στην πλάκα, για κάθε ιικό δείγμα έγιναν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση 10^{-8} . Στη συνέχεια, 100μl από την αντίστοιχη αραιώση ενοφθαλμίστηκαν στην πλάκα και αυτή τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C. Η παρακολούθησή της πλάκας για εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης σε καθημερινή βάση διήρκησε μέχρι την παρατήρηση καταστροφής των κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα. Έπειτα έγινε η μέτρηση του TCID₅₀ με τον τύπο που περιγράφηκε παραπάνω για το στέλεχος Sabin1.



Εικόνα 10: Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων

Μετά τον υπολογισμό του ιικού τίτλου, ακολούθησαν σειριακές αραιώσεις για την απόκτηση των επιθυμητών συγκεντρώσεων 10^6 , 10^5 και 10^4 TCID₅₀ για τα πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν.

2.4 Μέτρηση κυττάρων

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του MOI (Multiplicity of Infection) που θα περιγραφεί αναλυτικά παρακάτω. Η μέτρηση αφορούσε τον αριθμό των Rd κυττάρων που περιέχονταν σε σωλήνες κυτταροκαλλιέργειας, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για να γίνουν οι μολύνσεις.

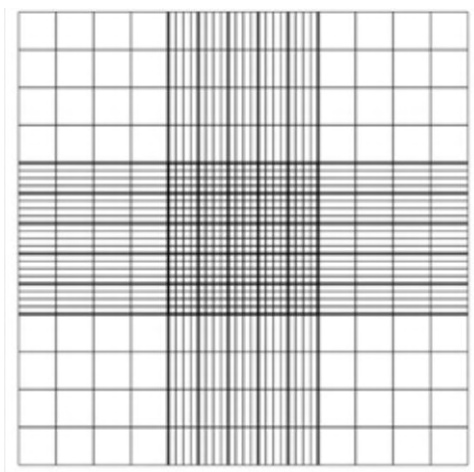
Αρχικά προστέθηκαν 2ml εναιωρήματος κυτταροκαλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό D-MEM με 2% ορό και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 h για την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας από τα Rd κύτταρα. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 0.5ml διαλύματος θρυψίνης-EDTA εις διπλούν για την αποκόλληση των κυττάρων. Έπειτα, προστέθηκαν 2ml θρεπτικού υλικού D-MEM απουσία ορού με ταυτόχρονη ανάδευση για την διάσπαση τυχόν

συσσωματωμάτων. Έπειτα, τοποθετήθηκαν 0.2ml εναιωρήματος κυττάρων και 0.2ml διαλύματος Trypan Blue (0.1% w/v) σε σωλήνα erpendorf (2ml) και αναμείχθηκαν με πιπετάρισμα. Χρησιμοποιώντας πιπέτα Pasteur μεταφέρθηκε αρκετή ποσότητα του μίγματος στην εγκοπή του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer, έτσι ώστε να καλύπτεται όλη η επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου, το οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο ανάστροφο μικροσκόπιο για την παρατήρηση και καταγραφή των ζωντανών κυττάρων. Λόγω του διαλύματος Trypan Blue τα νεκρά κύτταρα βάφονται μπλε, οπότε μετρήθηκαν μόνο τα λευκά κύτταρα και μόνο όσα βρίσκονταν στις τέσσερις γωνίες του αιμοκυτταρόμετρου. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων ανά ml έγινε με βάση τον τύπο: $C = tcn \times df \times 0.25 \times 10^4$

Όπου:

tcn: ο συνολικός αριθμός των κυττάρων

df: ο συντελεστής αραιώσης του διαλύματος που μελετήθηκε



Εικόνα 11: Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer Οι τέσσερις γωνίες είναι οι θέσεις στις οποίες γίνεται η καταμέτρηση των κυττάρων. Τα κύτταρα που βρίσκονταν σε όλες τις υπόλοιπες θέσεις, καθώς επίσης και πάνω στις γραμμές δεν μετρούνται.

Υπολογισμός MOI

Το MOI ή αλλιώς Multiplicity Of Infection είναι η αναλογία μεταξύ του αριθμού των ιών σε μία μόλυνση και των κυττάρων-ξενιστών και υπολογίζεται με τον τύπο:

$$MOI = \frac{TCID_{50}}{\text{Αριθμός Κυττάρων}}$$

Το MOI σε σωλήνα κυτταροκαλλιέργειας για τον Sabin1 [10^6] TCID₅₀ όπως και για τον Sabin1 [10] TCID₅₀ υπολογίσθηκε ώστε να είναι =10.

2.5 Αδρανοποίηση ιού και μόλυνση κυττάρων

Για την επίτευξη της αδρανοποίησης πραγματοποιήθηκε θέρμανση του στελέχους Sabin1, στο μηχάνημα της PCR Primus 25, για 30 min στις συγκεντρώσεις $[10^6]$, $[10]$ TCID₅₀, 25min στην συγκέντρωση $[10^6]$ TCID₅₀ και 20 min στις συγκεντρώσεις $[10^6]$ και $[1]$ TCID₅₀ σε θερμοκρασίες: α) για τη συγκέντρωση $[10^6]$ TCID₅₀: 50°C, 52°C, 54°C, 55°C, 56°C, 58°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 78°C και 80°C, β) για τη συγκέντρωση $[10]$ TCID₅₀: 45°C, 50°C, 58°C, 60°C, 65°C και 70°C, γ) για τη συγκέντρωση $[1]$ TCID₅₀ : 50°C, 60°C και 70°C.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μόλυνση, αρχικά μεταφέρθηκαν 2ml εναιωρήματος κυττάρων Rd σε σωλήνες καλλιέργειας παρουσία θρεπτικού υλικού D-MEM με 2% ορό και οι σωλήνες επώαστηκαν για 24h στους 37°C. Στη συνέχεια, αφού παρατηρήθηκαν οι σωλήνες ως προς την ποιότητα και την ποσότητα των κυττάρων, μεταφέρθηκαν σε διαφορετική συσκευή καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας 2 για τον ενοφθαλμισμό.

Μετά την αδρανοποίηση του ιικού στελέχους Sabin1 συγκέντρωσης $[10^6]$ πραγματοποιήθηκε μόλυνση των κυτταροκαλλιέργειών με τα αδρανοποιημένα στελέχη με 200μl σε κάθε σωλήνα για κάθε διαφορετική θερμοκρασία, αφού πρώτα είχε αντικατασταθεί το θρεπτικό υλικό των σωλήνων με D-MEM απουσία ορού. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση των σωλήνων στους 37°C και 2h μετά τη μόλυνση ακολούθησε πλύση, δηλαδή απόρριψη του θρεπτικού των σωλήνων και αντικατάσταση με 2ml D-MEM χωρίς προσθήκη FBS, προκειμένου να απομακρυνθούν όσα ισωμάτια δεν μπόρεσαν να προσδεθούν στους κυτταρικούς υποδοχείς και κατ' επέκταση να εισέλθουν στα κύτταρα. Οι σωλήνες μετά τη μόλυνση τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο κύλινδρο υπό κλίση (5°) στους 37°C. Ακολούθησε καθημερινή παρατήρηση των σωλήνων στο ανάστροφο μικροσκόπιο για τον εντοπισμό της ύπαρξης κυτταροπαθογόνου δράσης και τα αποτελέσματα καταγράφονταν. Η παρατήρηση των σωλήνων ολοκληρωνόταν με τον εντοπισμό αλλοίωσης ή νέκρωσης σε μεγάλο ποσοστό στα κύτταρα του αρνητικού μάρτυρα συνήθως στις πέντε ημέρες μετά την μόλυνση. Η ίδια διαδικασία ακολούθηθηκε και για την μόλυνση των κυττάρων με τις συγκεντρώσεις $[10]$ και $[1]$ TCID₅₀. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν και τέσσερις σωλήνες ως μάρτυρες, δύο θετικοί μάρτυρες για την κάθε συγκέντρωση στους οποίους τοποθετήθηκαν 200μl Sabin1 στελέχους γνωστής συγκέντρωσης και από δύο αρνητικοί μάρτυρες στους οποίους τοποθετήθηκαν 200μl θρεπτικού μέσου D-MEM απουσία ορού.

Πραγματοποιήθηκε δεύτερη και τρίτη ανακαλλιέργεια αδρανοποιημένων ιών για την αύξηση του ιικού τίτλου, όπου μετά το τέλος της πρώτης καλλιέργειας ακολουθούσε νέα μόλυνση κυττάρων χρησιμοποιώντας 200μl από την πρώτη καλλιέργεια και ούτω καθεξής. Το υλικό μετά το τέλος της τελευταίας ανακαλλιέργειας συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω ανάλυση. Οι σωλήνες με τις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για την εξακρίβωση της αδρανοποίησης έκαστης θερμοκρασίας με μοριακές τεχνικές.

Η διαδικασία που ακολούθησε θα περιγραφεί αναλυτικά στη συνέχεια, ωστόσο τα βήματα εν συντομία είναι : 1) Εκχύλιση RNA, 2) Αντίστροφη μεταγραφή, 3) PCR, Nested PCR, Real Time PCR και LAMP 4) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, Nested PCR, Real Time PCR και LAMP.

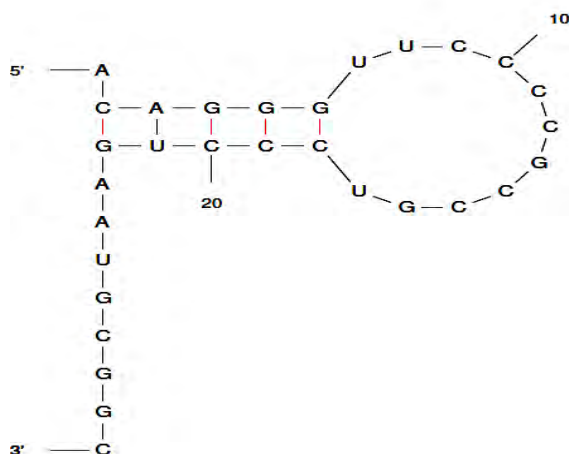
1) Εκχύλιση του ιικού RNA

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas. Συγκεκριμένα, μέσα σε erpendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5% N-lauroylsacrosine, 1mM dithiothreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (100 mg/ml) και τέλος 100μl δείγματος από τον σωλήνα κυτταροκαλλιέργειας. Ακολούθησε ανάδευση του μείγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και πραγματοποιήθηκε ξανά ανάδευση του μείγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 14000rcf και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση για τη διαλυτοποίηση του ιζήματος και ακόμη μία φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000rcf. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH₂O. Το RNA των δειγμάτων φυλάχθηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

2) Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει Real Time PCR, PCR ή Nested PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γενώματος που μας ενδιαφέρει. Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 20μl. Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 1μl random primers HEPTAN d(N7) (Macrogen, South Korea) (5 pmol), 1μl dNTPs (2mM) και ddH₂O (5μl/tube). Σε erpendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl από το ιικό RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των erpendorf στους 65 °C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf-Mastercycler για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του μονόκλωνου RNA. Μετά την επώαση, τα erpendorfs τοποθετήθηκαν αμέσως στον πάγο και προετοιμάστηκε το δεύτερο μίγμα το οποίο περιείχε 1X First strand Buffer, 0.01M Dithiothreitol, 20 Units RNase out, 100 Units RT M-MLV (Invitrogen) και ddH₂O έως τα 8μl. Στη συνέχεια προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε erpendorf και ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 min στους 25°C για τον υβριδισμό των εκκινητών, 50 min στους 37°C για τη σύνθεση του cDNA και 15 min στους 70°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Για την ανίχνευση της αντιγραφικής ενεργότητας του ιού δεν αρκεί μόνο η ανίχνευση του θετικής πολικότητας RNA κλώνου του ιού, αλλά απαιτείται και η ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας κλώνου. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επίσης στα δείγματα εκχύλισης RNA αντίστροφη μεταγραφή με τη χρήση του εκκινητή EntNS4-RT ο οποίος διαθέτει μια χαρακτηριστική δομή στελέχους θηλιάς στο 5'-άκρο του και μια ειδική ική αλληλουχία στο 3'-άκρο, η οποία του προσδίδει υψηλή εξειδίκευση για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου. Το 3'-άκρο του εκκινητή είναι συμπληρωματικό σε συντηρημένη περιοχή της 5'-UTR του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου των εντεροϊών. Το 5'-άκρο του εκκινητή στην περιοχή της θηλιάς φέρει μια συγκεκριμένη αλληλουχία η οποία δεν εντοπίζεται στο γονιδίωμα των εντεροϊών και δημιουργεί μια θέση υβριδισμού του sense εκκινητή της PCR που ακολουθεί.



Εικόνα 12: Εκκινητικό μόριο EntNS4-RT που χρησιμοποιήθηκε στην RT για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου. Στο 5'-άκρο υπάρχει μια δομή στελέχους θηλιάς, ενώ στο 3'-άκρο μια ειδική ική αλληλουχία.

Μετά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής ακολούθησε η PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκε το ειδικό ζεύγος εκκινητών EntNS2-F/UC53-Flap. Ο εκκινητής EntNS2-F είναι σχεδιασμένος με τέτοιο τρόπο ώστε να συνδέεται πάνω σε ένα συγκεκριμένο σημείο του εκκινητή EntNS4 και συγκεκριμένα πάνω στη δομή στελέχους-θηλιάς. Το μέγεθος του προϊόντος που αναμένεται στην ηλεκτροφόρηση είναι 155bp.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Θέση	Πολικότητα
Heptan	NNN NNN N	-	-
EntNS4-RT	ACA GGG TTC CCC GCC GTC CCT GAA TGC GGC	451-469	Sense

Πίνακας 4: Εκκινητικά μόρια αντίστροφης μεταγραφής.

3) 3.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Μέσω της PCR ενισχύεται ένα τμήμα του παραγόμενου cDNA που ορίζεται από το ζεύγος των εκκινητών που επιλέγονται. Ανάλογα λοιπόν με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε PCR αντίδραση τα τμήματα που ενισχύονταν χρησιμοποιούν για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του εντεροϊού Sabin1 και για την ανίχνευση της ενεργότητας του στελέχους.

3.1.1 PCR για την ανίχνευση του θετικής πολικότητας RNA κλώνου

Χρησιμοποιώντας το cDNA που προέκυψε από την RT, με τυχαίο εκκινητή, πραγματοποιήθηκε PCR με τη χρήση του εκκινητικού ζεύγους UG52-Flap/UC53-Flap, ζεύγος το οποίο ενισχύει ένα προϊόν μήκους 450bp.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Θέση	Πολικότητα
UG52-Flap	AATAAATCATAACAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	168-188	Sense
UC53-Flap	AATAAATCATAATTGTCACCATAACCAGCCA	588-606	Antisense

Πίνακας 5: Εκκινητικά μόρια.

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επιτυγχάνει τον πολλαπλασιασμό μιας γνωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέχρι και δισεκατομμύρια φορές μετά από 30-40 κύκλους.

Αρχικά προετοιμάστηκε ένα μίγμα σε μικροσωληνάρια erpendorf (0,2ml) αποτελούμενο από: 1mM dNTPs (Invitrogen, UK), 1X Dream Taq Buffer (Thermo Fisher scientific), 25pmol από κάθε εκκινητή, 1U Dream Taq (Thermo Fisher scientific) και ddH₂O μέχρι τα 47μl. Στο παραπάνω μίγμα προστέθηκαν 3μl του cDNA και τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf-Mastercycler στις παρακάτω συνθήκες:

1 κύκλος	3 min στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλοι	-30 sec στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 63°C για τον υβριδισμό των εκκινητών -1 min στους 72°C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλος	5 min στους 72°C για την πλήρη σύνθεση των ημιτελών κλώνων

Πίνακας 6: Συνθήκες PCR για την ενίσχυση του θετικού RNA κλώνου.

3.1.2 PCR για την ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου

Χρησιμοποιώντας το cDNA που προέκυψε από την RT, με εκκινητή τον ειδικό για τον αρνητικής πολικότητας RNA κλώνο ENTNS4-RT, πραγματοποιήθηκε PCR με τη χρήση του εκκινητικού ζεύγους ENTNS2-F/UC53-Flap, ζεύγος το οποίο ενισχύει ένα προϊόν μήκους 155bp.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')	Θέση	Πολικότητα
EntNS4-RT	ACA GGG TTC CCC GCC GTC CCT GAA TGC GGC	451-469	Sense
EntNS2F	CGT TCC CCG CCG TCC CTG	-	Sense
UC53-Flap	AAT AAA TCA TAA TTG TCA CCA TAA CCA GCC A	588-606	Anti-sense

Πίνακας 7: Εκκινητικά μόρια.

Αρχικά προετοιμάστηκε ένα μίγμα σε μικροσωληνάρια erpendorf (0,2ml) αποτελούμενο από: 1mM dNTPs (Invitrogen, UK), 1X Invitrogen Taq Buffer (Invitrogen, UK), 1.25mM MgCl₂ (Invitrogen, UK), 15.5 pmol από κάθε εκκινητή, 2U Invitrogen Taq (Invitrogen, UK) και ddH₂O μέχρι τα 47μl. Στο παραπάνω μίγμα προστέθηκαν 3μl του cDNA και τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf-Mastercycler στις παρακάτω συνθήκες:

1 κύκλος	3 min στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλοι	-30 sec στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55°C για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 sec στους 72°C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλος	2 min στους 72°C για την πλήρη σύνθεση των ημιτελών κλώνων

Πίνακας 8: Συνθήκες PCR για την ενίσχυση του αρνητικού RNA κλώνου

3.1.3 Nested-PCR για την ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου

Η Nested-PCR είναι μία μοριακή τεχνική που προσφέρει αυξημένη ευαισθησία σε σχέση με την απλή PCR. Η Nested-PCR αποτελεί τον συνδυασμό δυο διαδοχικών PCR αντιδράσεων κατά τις οποίες τα προϊόντα της πρώτης PCR χρησιμεύουν ως στόχοι της δεύτερης PCR αντίδρασης. Κατά την δεύτερη PCR χρησιμοποιείται ένα νέο εκκινητικό ζεύγος το οποίο τοποθετείται εσωτερικά του αρχικού εκκινητικού ζεύγους, αυξάνοντας έτσι την ειδικότητα της μεθόδου. Ωστόσο η μεγάλη ενίσχυση που προσφέρει η μέθοδος μπορεί να αποτελέσει και μειονέκτημα της καθώς αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης επιμολύνσεων. Για το λόγο αυτό, η πρώτη PCR εκτελείται στους 20 με 25 κύκλους, ενώ η δεύτερη PCR στους 30 με 35 κύκλους, με σκοπό την μείωση της πιθανότητας εμφάνισης επιμολύνσεων.

Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόστηκε για την ανίχνευση στον Sabin1 [1] TCID₅₀, καθώς δεν ήταν δυνατός ο εντοπισμός του σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του ιού, ενώ επίσης εφαρμόστηκε και σε λίγες θερμοκρασίες αδρανοποίησης του Sabin1 [10⁶] TCID₅₀ οι οποίες θα αναφερθούν στην συνέχεια. Για την Nested-PCR χρησιμοποιήθηκε το εκκινητικό ζεύγος UG52-Flap/UC53-Flap για την PCR προενίσχυσης με μέγεθος προϊόντος στις 450bp και στη συνέχεια το εσωτερικό εκκινητικό ζεύγος ENV-2/ENV-1 με αντίστοιχο μέγεθος προϊόντος στις 148bp. Η PCR προενίσχυσης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε νωρίτερα για τη PCR θετικού κλώνου, με τη μόνη διαφορά ότι διήρκεσε 20 κύκλους. Στη συνέχεια για την δεύτερη PCR προετοιμάστηκε ένα μίγμα το οποίο αποτελούταν από: 1mM dNTPs, 1X Dream Taq Buffer, 25pmol από τον κάθε εκκινητή, 1.5U Dream Taq Polymerase και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl από το προϊόν της πρώτης PCR. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η διαδικασία ήταν οι εξής:

1 κύκλος	3 min στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA
40 κύκλοι	-30 sec στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55°C, για τον υβριδισμό των εκκινητών -1 min στους 72°C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλος	5 min στους 72°C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

Πίνακας 9. Συνθήκες Nested PCR (δεύτερη PCR).

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'→3')	Θέση	Πολικότητα
UG52-Flap	AATAAATCATAACAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	168-188	Sense
UC53-Flap	AATAAATCATAAATTGTCACCATAACCAGCCA	588-606	Antisense
ENV-2	CCCCTGAATGCGGCTAATC	451-469	Sense
ENV-1	GATTGTCACCATAAGCAGC	580-598	Antisense

Πίνακας 10: Εκκινητικά μόρια.

3.1.4 Real Time PCR

Η Real-Time PCR επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του αρχικού υπό μελέτη δείγματος. Η ποσοτικοποίηση επιτελείται χάρη σε μια χρωστική, η οποία στην παρούσα διατριβή ήταν η SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να προσδέεται σε δίκλωνο DNA φθορίζοντας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (520nm). Η μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο οδηγεί στην κατασκευή ενός σχεδιαγράμματος (Amplification Plot), μέσω του οποίου υπολογίζεται το Ct (Cycle threshold), ο κύκλος δηλαδή στον οποίο υπερβαίνει την ουδό (threshold) η τιμή φθορισμού. Συγχρόνως, χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων δημιουργήθηκε μια πρότυπη καμπύλη αρχικών αντιγράφων σχετιζόμενα με την τιμή Ct, μέσω της οποίας υπολογίστηκε η ποσότητα των αρχικών αντιγράφων των υπό μελέτη δειγμάτων. Για την μελέτη της εξειδίκευσης της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το Melting Curve Analysis ή Dissociation Curve στο οποίο παρουσιάζεται ένα σχεδιάγραμμα μεταβολής φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία. Τμήματα ίσου μήκους με ίδια αλληλουχία εμφανίζουν μεταβολή στο φθορισμό στην ίδια θερμοκρασία, λόγω του T_m , ενώ η εμφάνιση μεταβολής φθορισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες υποδηλώνει την ύπαρξη παραπροϊόντων.

Για την ανίχνευση του θετικής πολικότητας RNA του στελέχους Sabin1 στις δύο συγκεντρώσεις [10^6] και [10] TCID₅₀ για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης, εφαρμόστηκε Real Time PCR χρησιμοποιώντας την τεχνολογία SYBR Green. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκε μία κινητική ανίχνευσης της παρουσίας και των αντιγράφων του εντεροϊού που χρησιμοποιήθηκε ανάλογα με την στιγμή ανίχνευσης του θετικού κλώνου. Πιο συγκεκριμένα δημιουργήθηκε ένα μίγμα που περιείχε 2X SYBR Select qPCR Master Mix (Thermo Fischer Scientif), 5pmol από τον κάθε εκκινητή (ENV1/ENV2) και ddH₂O μέχρι τα 17μl. Το μίγμα αυτό προστέθηκε σε ειδικά μικροσωληνάρια για Real-Time PCR των 0.2ml και προστέθηκαν 3μl από κάθε δείγμα. Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον ειδικό για Real-Time PCR θερμοκυκλοποιητή Mx3005P (STRATAGENE, USA) στις συνθήκες:

1^{ος} κύκλος	-2 min στους 50°C για την ενεργοποίηση UDG -2 min στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA
35 κύκλοι	-15 sec στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA -1 min στους 60°C για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση των κλώνων
1^{ος} κύκλος	-Ramping 55°C-95°C για τη δημιουργία του Melting Curve Analysis

4) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, της Nested PCR, της Real Time PCR και της LAMP

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR, από την Nested PCR, την Real Time PCR και την LAMP χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 2%. Το προϊόν της αντίδρασης της απλής PCR είναι στις 450bp, της Nested PCR στις 150bp και της Real Time PCR στις 150bp. Για την κατασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν 0,8gr αгарόζης (Ultra-Pure Gel Agarose, Invitrogen, UK) και 40ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA), τα οποία προστέθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1min, ώστε να λιώσει η αгарόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr2) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αгарόζης, 10µl από το προϊόν της PCR, της Nested PCR ή της Real Time PCR και 6µl από τη LAMP, ανάλογα την περίπτωση αναμίχθηκαν με 2µl 10X Gel Loading Buffer (κυανό της βρωμοφαινόλης, σουκρόζη 40%w/v και TBE) και ακολούθησε η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για περίπου 30 min. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα αгарόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε χρησιμοποιώντας ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

5. RT-(LAMP) Loop Mediated Isothermal Amplification

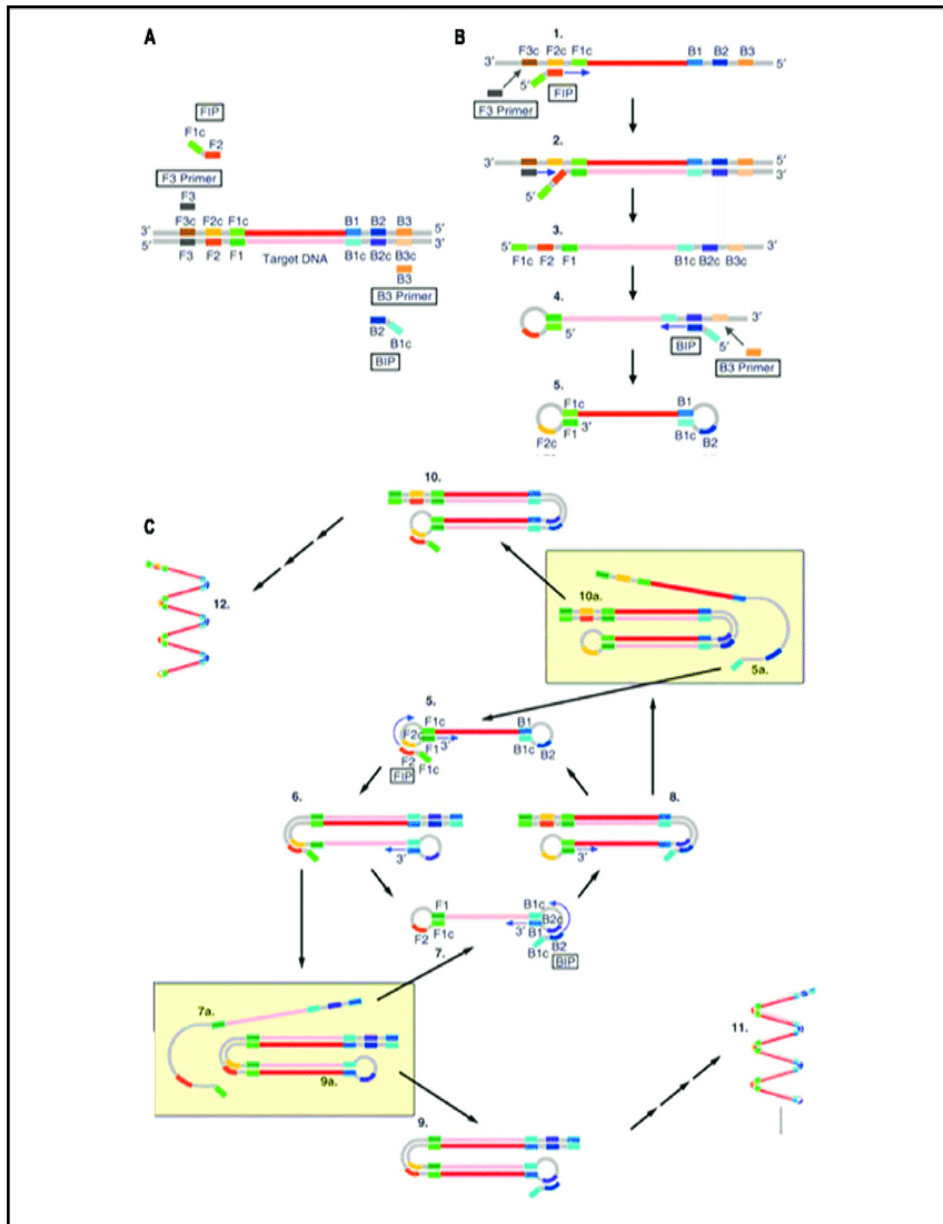
Η LAMP είναι μία μοριακή τεχνική ενίσχυσης νουκλεοτιδικού στόχου απλή, γρήγορη και ειδική. Στη μέθοδο αυτή γίνεται χρήση τεσσάρων ή έξι διαφορετικών εκκινητών που στοχεύουν σε έξι ή οκτώ αντίστοιχα διακριτές περιοχές του γονιδίου στόχου. Η LAMP έχει υψηλή αποτελεσματικότητα ενίσχυσης του στόχου, καθώς αυτός ενισχύεται 10^9 περίπου φορές μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία χρησιμοποιώντας μία ειδική πολυμεράση, την Bst 3.0 η οποία έχει ενεργότητα εκτόπισης κλώνου.

Η αντίδραση της LAMP πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl, σε τελικό όγκο 25μl. Κάθε μικροσωληνάριο περιείχε: 3μl cDNA του στόχου, dNTPs 5,6mM, Isothermal Amplification Buffer II 1x, MgSO₄ 8mM, FIP 1,6 pmol/μl, BIP 1,6 pmol/μl, F3 0,2 pmol/μl, B3 0,2 pmol/μl, Bst 3.0 DNA Pol 0,32 U/μl, ddH₂O μέχρι τα 25μl.

Στη συνέχεια τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Primus 25/96) στις εξής συνθήκες:

- Επώαση στους 65°C για 40 λεπτά
- Επώαση στους 80°C για 5 λεπτά

Κατά τη διάρκεια του πρώτου βήματος πραγματοποιείται η ενίσχυση του στόχου και κατά τη διάρκεια του δεύτερου βήματος γίνεται η απενεργοποίηση του ενζύμου.



Εικόνα 13: Διαδικασία παραγωγής των προϊόντων της LAMP.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3a) στη LAMP συμμετέχουν τέσσερις διαφορετικοί εκκινητές που στοχεύουν έξι διαφορετικές περιοχές του γονιδίου. Ο εσωτερικός εκκινητής (FIP) αποτελείται από μια περιοχή F2 στο 3'-άκρο και μια F1c περιοχή στο 5'-άκρο. Ο εξωτερικός εκκινητής (F3) αποτελείται από μια περιοχή F3 που είναι συμπληρωματική της F3c περιοχής του εκμαγείου. Ο εσωτερικός εκκινητής (BIP) αποτελείται από μια B2 περιοχή στο 3'-άκρο και μια B1c περιοχή στο 5'-άκρο. Ο εξωτερικός εκκινητής (B3) αποτελείται από μια B3 περιοχή η οποία είναι συμπληρωματική της B3c περιοχής του εκμαγείου. b) Αρχικά υβριδοποιείται η περιοχή F2 FIP στην F2c περιοχή του DNA και ξεκινά η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου, ενώ συγχρόνως υβριδοποιείται και ο εκκινητής F3 στην F3c περιοχή του DNA στόχου και επεκτείνεται μετατοπίζοντας τον συνδεδεμένο FIP συμπληρωματικό κλώνο. Η μετατόπιση αυτή οδηγεί στη δημιουργία ενός βρόχου

στο 5'-άκρο. Το μονόκλωνο τμήμα DNA με τον βρόγχο στο 5'-άκρο χρησιμεύει ως εκμαγείο για τον υβριδισμό του BIP. Η B2 περιοχή του BIP υβριδοποιείται στην B2c περιοχή του DNA και ξεκινά η σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου και ο σχηματισμός ενός επιπλέον βρόγχου. Στη συνέχεια ο B3 εκκινήτης υβριδοποιείται στην B3c περιοχή του DNA και επεκτείνεται μετατοπίζοντας τον συνδεδεμένο BIP συμπληρωματικό κλώνο, οδηγώντας στο σχηματισμό μιας μορφής "αλτήρα" DNA. Τέλος νουκλεοτίδια προστίθενται στο 3'-άκρο της F1 περιοχής από την Bst DNA πολυμεράση, η οποία επίσης ανοίγει τον βρόγχο στο 5'-άκρο. Έπειτα στην αντίδραση συμμετέχουν μόνο οι δύο εσωτερικοί εκκινήτες. Οι δομές που προκύπτουν χρησιμεύουν ως εκμαγεία για την σύνθεση νέων κλώνων. c) Με τον τρόπο αυτό παράγονται τα διαφορετικά ως προς τη δομή προϊόντα της LAMP.

Γ) Αποτελέσματα

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να γίνει παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας αδρανοποίησης του εμβολιακού στελέχους Sabin1 μέσω κυτταροκαλλιέργειας και εν συνεχεία μέσω μιας σύγχρονης αντίστροφης μεταγραφής (RT)-Mediated Isothermal Amplification. Στο πρώτο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκαν αδρανοποιήσεις του εμβολιακού στελέχους Sabin1 σε διάφορες θερμοκρασίες και σε συγκεντρώσεις [1], [10] και [10⁶] TCID₅₀, σύμφωνα με την διαδικασία αδρανοποίησης που έχει προαναφερθεί. Τα αδρανοποιημένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση κυτταροκαλλιεργειών και την παρακολούθηση εμφάνισης κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) του ιού μέσω των κυτταρικών αλλοιώσεων που προκαλούσε.

6.1 Παρακολούθηση (CPE) στις κυτταροκαλλιέργειες

Κυτταρικές αλλοιώσεις	CPE
Χωρίς καμία αλλοίωση	-
Καταστροφή 20% των κυττάρων	1+
Καταστροφή 50% των κυττάρων	2+
Καταστροφή 75% των κυττάρων	3+
Καταστροφή 100% των κυττάρων	4+

Κάθε θερμοκρασία αδρανοποίησης σε κάθε συγκέντρωση Sabin1 ελέγχθηκε εις διπλούν και σε όλες τις μολύνσεις δεν παρατηρήθηκε αλλοίωση των αρνητικών μαρτύρων, οι οποίοι ήταν κύτταρα Rd μη μολυσμένα με ιό.

6.1.1 Αποτελέσματα εμφάνισης CPE για τον Sabin1 [1] TCID₅₀

Πρώτη καλλιέργεια (αδρανοποίηση για 20min)

Δείγμα	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα
Sabin1 [1] 50°C	-	-	-	-	-
Sabin1 [1] 60°C	-	-	-	-	-
Sabin1 [1] 70°C	-	-	-	-	-
Sabin1 [10 ⁶] θετικός μάρτυρας	4+ καταψύχθηκε				

Δεύτερη ανακαλλιέργεια

Δείγμα	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα
Sabin1 [1] 50°C	-	-	-	-	-/?
Sabin1 [1] 60°C	-	-	-	-	-/?
Sabin1 [1] 70°C	-	-	-	-	-/?

Τρίτη ανακαλλιέργεια

Δείγμα	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα
Sabin1 [1] 50°C	-	-	-	-	?/1+
Sabin1 [1] 60°C	-	-	-	-	?
Sabin1 [1] 70°C	-	-	-	-	-

6.1.2 Αποτελέσματα εμφάνισης CPE για τον Sabin1 [10] TCID₅₀

Πρώτη καλλιέργεια (αδρανοποίηση για 30min)

Δείγμα	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα
Sabin1 [10] θετικός μάρτυρας	-	3+	4+ καταψύχθηκε		
Sabin1 [10] 45°C	-	-	2+	3+	4+
Sabin1 [10] 50°C	-	-	2+	3+	4+
Sabin1 [10] 55°C	-	?	1+	2+	3+
Sabin1 [10] 58°C	-	-	-	-/1+	1+/2+
Sabin1 [10] 60°C	-	-	-	-	1+
Sabin1 [10] 65°C	-	-	-	-	1+
Sabin1 [10] 70°C	-	-	-	-/?	?/1+

6.1.3 Αποτελέσματα εμφάνισης CPEγια τον Sabin1 [10⁶] TCID₅₀

Πρώτη καλλιέργεια (αδρανοποίηση για 20 min)

Δείγμα	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα
Sabin1 [10 ⁶] 50°C	?	3+	4+	καταψύχθηκαν	
Sabin1 [10 ⁶] 60°C	?	1+	2+	2+	3+
Sabin1 [10 ⁶] 70°C	-	-	-/?	?	1+

Δεύτερη ανακαλλιέργεια

Δείγμα	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα
Sabin1 [10 ⁶] 60°C	-	-	-	-	-
Sabin1 [10 ⁶] 70°C	-	-	-	-	-

Τρίτη ανακαλλιέργεια

Δείγμα	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα
Sabin1 [10 ⁶] 60°C	-	-	-/?	?	?
Sabin1 [10 ⁶] 70°C	-	-	-	-	-

Πρώτη καλλιέργεια (αδρανοποίηση για 25min)

Δείγμα	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα
Sabin1 [10 ⁶] θετικός μάρτυρας	3+	4+	καταψύχθηκε		
Sabin1 [10 ⁶] 52°C	-	1+	2+	3+	4+
Sabin1 [10 ⁶] 54°C	-	2+	4+	καταψύχθηκε	
Sabin1 [10 ⁶] 56°C	-	2+	3+	4+	καταψύχθηκε
Sabin1 [10 ⁶] 58°C	-	1+/2+	4+	καταψύχθηκε	
Sabin1 [10 ⁶] 60°C	-	-/?	4+	καταψύχθηκε	

Πρώτη καλλιέργεια (αδρανοποίηση για 30min)

Δείγμα	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	4 ^η ημέρα	5 ^η ημέρα
Sabin1 [10 ⁶] θετικός μάρτυρας	3+	4+	καταψύχθηκε		
Sabin1 [10 ⁶] 55°C	-	-	3+	4+	καταψύχθηκε
Sabin1 [10 ⁶] 60°C	-	-	-	1+	2+
Sabin1 [10 ⁶] 65°C	-	-	-	-/1+	1+
Sabin1 [10 ⁶] 70°C	-	-	-	-	-/?
Sabin1 [10 ⁶] 75°C	-	-	-	-	-/?
Sabin1 [10 ⁶] 78°C	-	-	-	2+	3+
Sabin1 [10 ⁶] 80°C	-	-	-	1+	2+

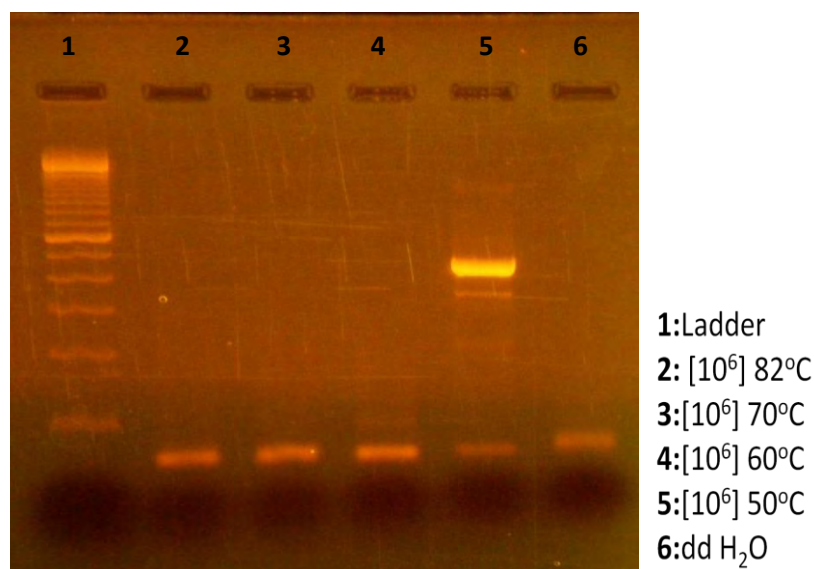
Σταδιακά έως την πέμπτη ημέρα παρακολούθησης των σωλήνων κυτταροκαλλιέργειας αποθηκεύτηκαν όλοι στους -20°C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εις διπλούν απόψυξη-ψύξη και ακολούθησε η εκχύλιση του ιικού RNA σύμφωνα με την διαδικασία εκχύλισης κατά Casas που έχει περιγραφεί για κάθε σωλήνα κυτταροκαλλιέργειας. Μετά τη εκχύλιση του ιικού RNA τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20 °C και σταδιακά χρησιμοποιήθηκαν για την μετατροπή τους σε cDNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφής. Έπειτα τα cDNA χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω μοριακή ανάλυση με σκοπό την επαλήθευση της ανίχνευσης του ιού στα δείγματα όπως είχε φανεί και από τις κυτταροκαλλιέργειες. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων (PCR,

Nested PCR, Real Time PCR και LAMP) έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων συγκέντρωσης [1], [10], και [10⁶] TCID₅₀ του Sabin1.

6.2 Αποτελέσματα RT-PCR για τον Sabin1 [1] και [10⁶]TCID₅₀

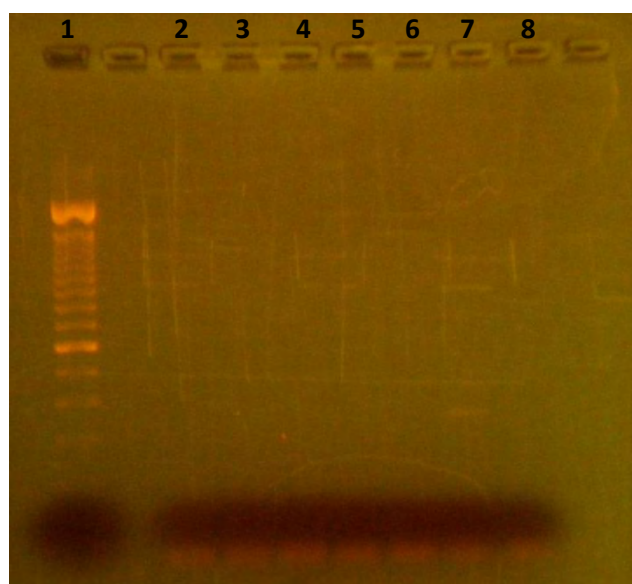
Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί, με τη χρήση τυχαίου εκκινητή HEPTAN (N7). Ακολούθησε PCR και ηλεκτροφόρηση για την ανίχνευση της παρουσίας του ιού, με την χρήση του εκκινητικού ζεύγους UG52-Flap/UC53-Flap που στοχεύουν στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του θετικού κλώνου στην PCR. Στην ηλεκτροφόρηση το προϊόν αναμένεται στις 450bp.

RT-PCR στη πρώτη καλλιέργεια [10⁶] TCID₅₀ του Sabin1 έπειτα από αδρανοποίηση στα 20min



Παρατηρώντας την εικόνα της ηλεκτροφόρησης διαπιστώνουμε πώς το δείγμα [10⁶] TCID₅₀ του Sabin1 που αδρανοποιήθηκε στους 50°C εμφανίζει προϊόν στις 450bp, δηλαδή ύπαρξη του ιού, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα δεν εμφανίζεται σήμα στις 450bp. Η εικόνα αυτή συμφωνεί και με τα αποτελέσματα παρατήρησης των κυτταροκαλλιεργειών καθώς στους 50°C είχαμε εμφάνιση CPE εξαιτίας του ιού. Σύμφωνα με την εικόνα των κυτταροκαλλιεργειών αναμέναμε την εμφάνιση σήματος στις 450bp και στο δείγμα που αδρανοποιήθηκε στους 60°C, ωστόσο δεν έδωσε ειδικό προϊόν στην ηλεκτροφόρηση. Οι μπάντες που εμφανίζονται στο κάτω μέρος της πηκτής προέρχονται από τους εκκινητές της αντίδρασης.

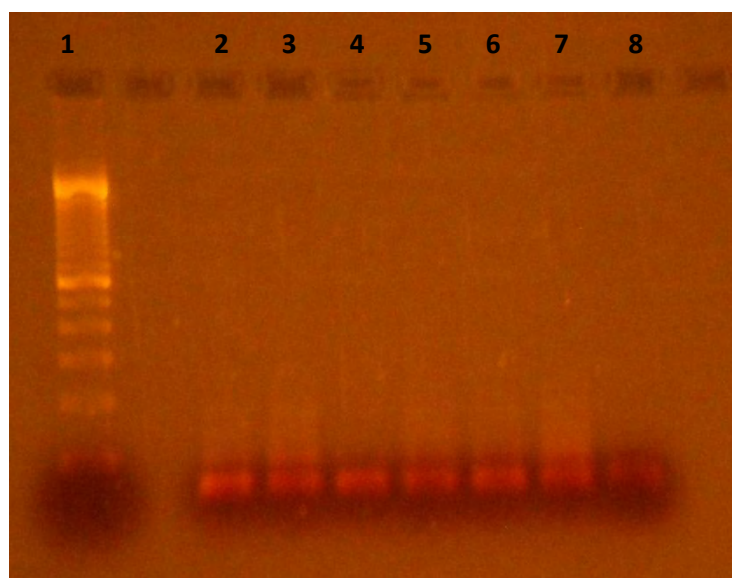
RT-PCR στη δεύτερη ανακαλλιέργεια [1] και [10⁶] TCID₅₀ του Sabin1



- 1:Ladder
- 2: [10⁶] 60° C
- 3:[10⁶] 70° C
- 4:[1] 50° C
- 5:[1] 60° C
- 6:[1] 70° C
- 7: Rd (-)
- 8: dd H₂O

Όπως φαίνεται στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης τα παραπάνω δείγματα στην δεύτερη ανακαλλιέργεια ήταν αρνητικά ως προς την παρουσία του ιού καθώς δεν ανιχνεύεται προϊόν στις 450bp όπου αναμένεται. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει και τα αποτελέσματα παρατήρησης των αντίστοιχων κυτταροκαλλιιεργειών ως προς την εμφάνιση CPE.

RT-PCR στη τρίτη ανακαλλιέργεια [1] και [10⁶] TCID₅₀ του Sabin1

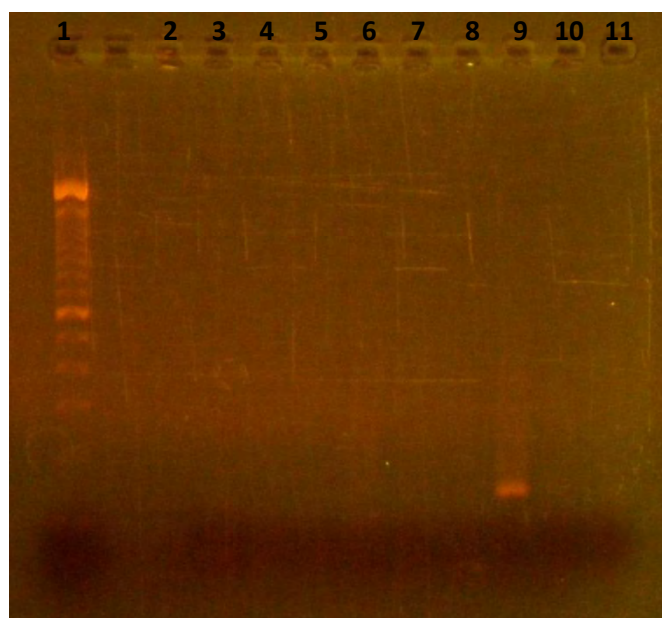


- 1:Ladder
- 2: [10⁶] 60° C
- 3:[10⁶] 70° C
- 4:[1] 50° C
- 5:[1] 60° C
- 6:[1] 70° C
- 7: Rd (-)
- 8: dd H₂O

Σύμφωνα με την εικόνα της ηλεκτροφόρησης τα παραπάνω δείγματα στην τρίτη ανακαλλιέργεια ήταν αρνητικά ως προς την παρουσία του ιού καθώς δεν ανιχνεύεται προϊόν στις 450bp όπου αναμένεται. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει και τα αποτελέσματα παρατήρησης των αντίστοιχων κυτταροκαλλιιεργειών ως προς την εμφάνιση CPE.

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε Nested PCR τόσο στη δεύτερη όσο και στην τρίτη ανακαλλιέργεια των παραπάνω δειγμάτων συγκέντρωσης [1] TCID₅₀, με σκοπό την ανίχνευση του θετικού κλώνου, σε περίπτωση που βρίσκεται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση κάτω από τα όρια ανίχνευσης της απλής PCR, ενισχύοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου. Έτσι πραγματοποιήθηκε αρχικά μια απλή PCR χρησιμοποιώντας ως πρώτο ζεύγος εκκινητών τους UG52-Flap/UC53-Flap και κατόπιν ακολούθησε μια Nested PCR χρησιμοποιώντας ως δεύτερο ζεύγος εκκινητών τους ENV1/ENV2 οι οποίοι υβριδοποιούνται πάνω στα προϊόντα της πρώτης PCR και οδηγούν στην παραγωγή ενός δεύτερου προϊόντος μικρότερου μεγέθους σε σχέση με το πρώτο, το οποίο και αναμένεται στις 150bp στην ηλεκτροφόρηση.

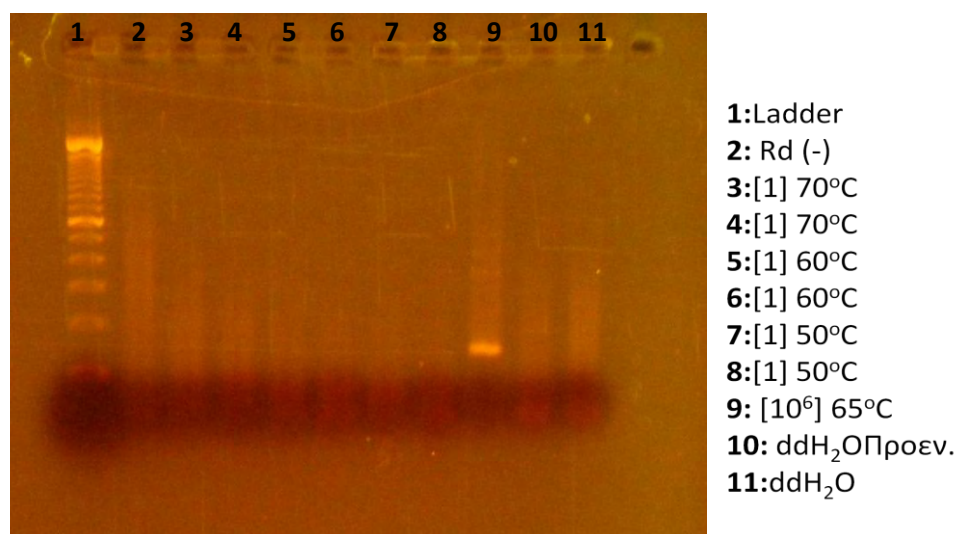
Nested PCR στη δεύτερη ανακαλλιέργεια [1] TCID₅₀ του Sabin1



- 1:Ladder
- 2: Rd (-)
- 3:[1] 70° C
- 4:[1] 70° C
- 5:[1] 60° C
- 6:[1] 60° C
- 7:[1] 50° C
- 8:[1] 50° C
- 9: [10⁶] 65° C
- 10: dd H₂O
- 11:dd H₂OΠροεν.

Παρατηρώντας την εικόνα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαιώνεται η απουσία του ιού από τα δείγματα της δεύτερης ανακαλλιέργειας, όπως αναμενόταν και από τις παρατηρήσεις μη εμφάνισης CPE στις κυτταροκαλλιέργειες. Στην ηλεκτροφόρηση έχει χρησιμοποιηθεί ως θετικός μάρτυρας δείγμα Sabin1 [10⁶] αδρανοποιημένο στους 65°C για 30min, το οποίο σε προηγούμενη μοριακή ανάλυση είχε δώσει θετικό αποτέλεσμα, δηλαδή ύπαρξη του ιού (θέση 9). Επιπλέον το νερό της πρώτης PCR προενίσχυσης όσο και το νερό της Nested PCR δεν παρουσιάζουν επιμόλυνση γεγονός που σημαίνει ότι και οι δύο διαδικασίες έχουν γίνει σωστά.

Nested PCR στη τρίτη ανακαλλιέργεια [1] TCID₅₀ του Sabin1



Από την ηλεκτροφόρηση της Nested PCR για την τρίτη ανακαλλιέργεια διαπιστώσαμε πως και σε αυτή την περίπτωση επιβεβαιώνεται η απουσία του ιού όπως είχε φανεί και από τις παρατηρήσεις μη εμφάνισης CPE των καλλιιεργειών. Και σε αυτή την περίπτωση ως θετικός μάρτυρας έχει χρησιμοποιηθεί δείγμα Sabin1 [10⁶] αδρανοποιημένο στους 65°C για 30min το οποίο παρουσιάζει προϊόν στις 150bp και συνεπώς ύπαρξης του ιού (θέση 9). Αντίθετα τόσο το νερό της πρώτης PCR προενίσχυσης όσο και το νερό της Nested PCR δεν παρουσιάζουν επιμόλυνση γεγονός που σημαίνει ότι και οι δύο διαδικασίες έχουν γίνει σωστά.

Σε επόμενο βήμα της παρούσας εργασίας ελέγχθηκαν τα δείγματα Sabin1 [10⁶] TCID₅₀ έπειτα από αδρανοποίηση στα 25min για την παρουσία και για την αντιγραφική ενεργότητα του ιού με RT-PCR καθώς στις αντίστοιχες κυτταροκαλλιέργειες όλα τα δείγματα παρουσίαζαν εικόνα CPE.

Αφού προηγήθηκε η εκχύλιση του RNA από τους σωλήνες των κυτταροκαλλιιεργειών ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή για την μετατροπή του RNA σε cDNA με τη χρήση τυχαίου εκκινητή HEPTAN (N7) για την ανίχνευση του θετικής πολικότητας RNA κλώνου, PCR με το ζεύγος εκκινητών UG52-Flap/UC53-Flap και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση της ύπαρξης του ιού στις 450bp.

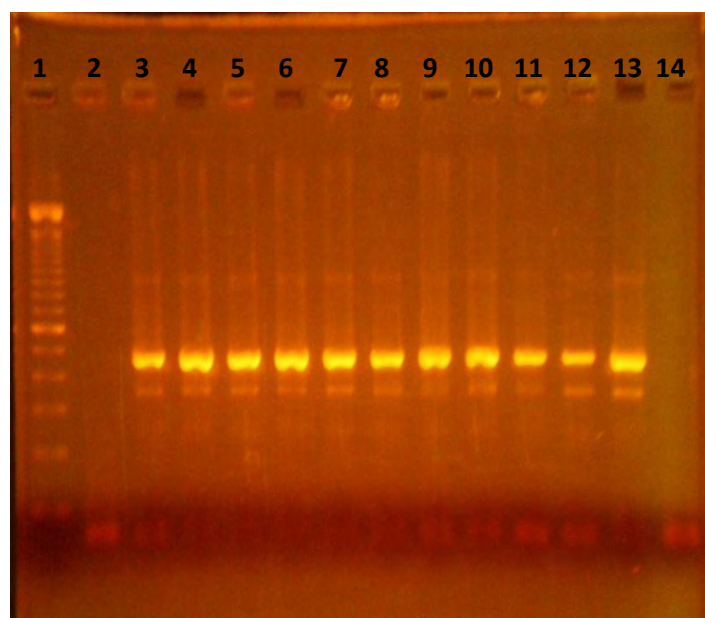
Για την ανίχνευση της αντιγραφικής ενεργότητας του ιού δεν αρκεί μόνο η ανίχνευση του θετικής πολικότητας RNA κλώνου του ιού, αλλά απαιτείται και η ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας κλώνου. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επίσης στα δείγματα εκχύλισης RNA αντίστροφη μεταγραφή με τη χρήση του εκκινητή EntNS4-RT ο οποίος διαθέτει μια χαρακτηριστική δομή στελέχους θηλιάς στο 5'-άκρο του και μια ειδική ιική αλληλουχία στο 3'-άκρο, η οποία του προσδίδει υψηλή εξειδίκευση για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου. Το 3' άκρο του

εκκινητή είναι συμπληρωματικό σε συντηρημένη περιοχή της 5'-UTR του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου των εντεροϊών. Το 5' άκρο του εκκινητή στην περιοχή της θηλιάς φέρει μια συγκεκριμένη αλληλουχία η οποία δεν εντοπίζεται στο γονιδίωμα των εντεροϊών και δημιουργεί μια θέση υβριδισμού του sense εκκινητή της PCR που ακολουθεί.

Μετά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής ακολούθησε η PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκε το ειδικό ζεύγος εκκινητών EntNS2-F/UC53-Flap. Το μέγεθος του προϊόντος που αναμένεται στην ηλεκτροφόρηση είναι 155bp.

6.3 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων Sabin1 [10^6] TCID₅₀ έπειτα από RT-PCR στα αδρανοποιημένα για 25 min δείγματα.

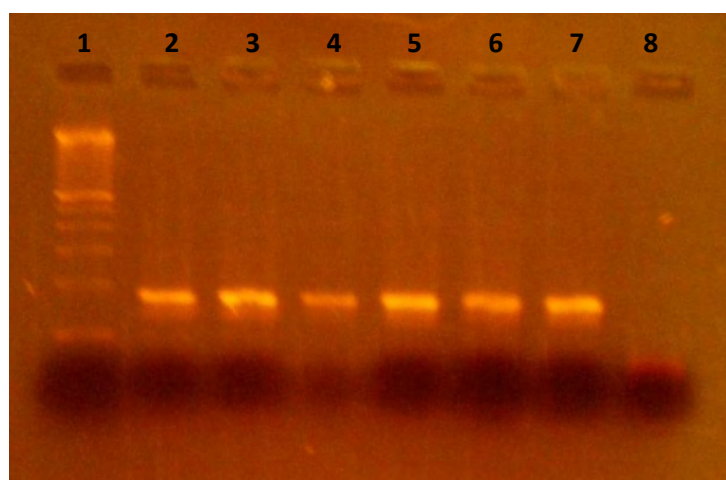
Ανίχνευση θετικής πολικότητας RNA κλώνου



Με τους αριθμούς 1. και 2. στο υπόμνημα της ηλεκτροφόρησης αναφέρονται οι σωλήνες κυτταροκαλλιέργειας.

Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR διαπιστώνουμε την εμφάνιση σήματος στις 450bp που υποδηλώνει την παρουσία του θετικής πολικότητας RNA κλώνου, άρα την παρουσία του ιού στις κυτταροκαλλιέργειες παρά την αδρανοποίηση την οποία υπέστη σε κάθε θερμοκρασία. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης συμφωνούν απόλυτα με τις παρατηρήσεις των κυτταροκαλλιεργειών καθώς είχαν παρατηρηθεί κυτταροπαθογόνες αλλοιώσεις (CPE) εξαιτίας της παρουσίας του ιού στις καλλιέργειες. Τόσο ο αρνητικός μάρτυρας Rd κύτταρα χωρίς ιό όσο και το νερό της αντίδρασης δεν παρουσιάζουν προϊόν στις 450bp συνεπώς δεν υπάρχει επιμόλυνση και η PCR έχει πραγματοποιηθεί σωστά. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα κυτταροκαλλιέργειας που είχε μολυνθεί με Sabin1 [10^6] ενεργό ιό που παρουσιάζει σήμα στις 450b (θέση 13).

Ανίχνευση αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου



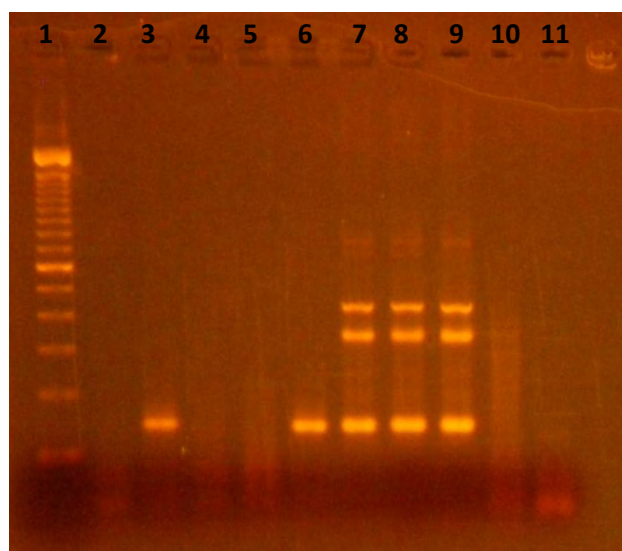
- 1:Ladder
- 2: [10⁶] 60°C 1.
- 3: [10⁶] 58°C1.
- 4: [10⁶] 56°C1.
- 5: [10⁶] 54°C1.
- 6:[10⁶] 52°C1.
- 7:[10⁶] (+)
- 8: dd H₂O

Έπειτα από την ηλεκτροφόρηση για την ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου εμφανίστηκε προϊόν στις 155bp σε όλα τα δείγματα, γεγονός που σημαίνει ότι εκτός του ότι ο ιός υπάρχει είναι και αντιγραφικά ενεργός. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως παρά τις θερμικές αδρανοποιήσεις στα 25min ο ιός καταφέρνει να εισέλθει στα κύτταρα και διατηρεί την αντιγραφική του ενεργότητα, άρα πολλαπλασιάζεται. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας δείγμα κυτταροκαλλιέργειας που είχε μολυνθεί με Sabin1 [10⁶] ενεργό ιό (θέση 7), το οποίο εμφανίζει ειδικό προϊόν στις 155bp. Στην θέση οκτώ της πηκτής όπου ήταν το νερό της αντίδρασης δεν εμφανίζεται προϊόν στις 155bp, συνεπώς δεν έχει γίνει επιμόλυνση κατά την διεξαγωγή της αντίδρασης και η αντίδραση έχει εκτελεστεί σωστά.

6.4 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων Sabin1 [10^6] TCID₅₀ έπειτα από Nested PCR και Real Time PCR στα αδρανοποιημένα δείγματα για 30 min.

Αποτελέσματα Nested PCR

Για μία πρώτη μόλυνση σωλήνων κυτταροκαλλιέργειας έγινε αδρανοποίηση Sabin1 [10^6] στις θερμοκρασίες 55°C, 60°C και 65°C. Μετά την εκχύλιση του RNA πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή με τυχαίο εκκινητή HEPTAN d(N7), Nested PCR με τα εκκινητικά ζεύγη UG52-Flap/UC53-Flap και ENV1/ENV2 και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested PCR, περιμένοντας εμφάνιση σήματος στις 155bp.

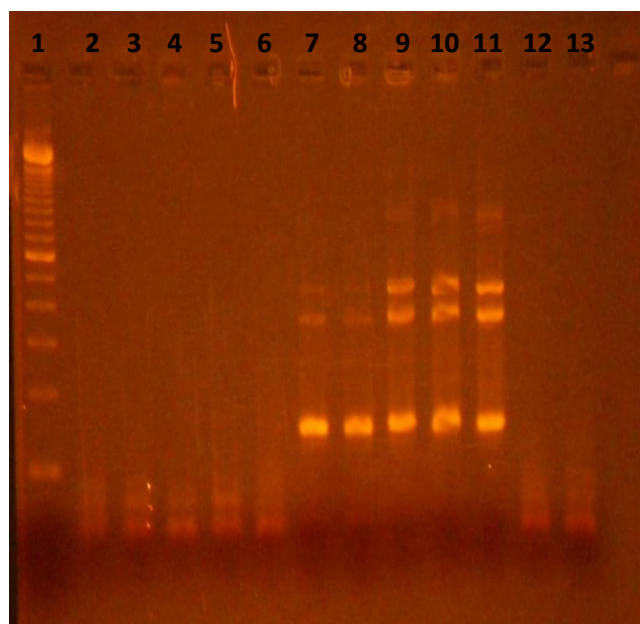


- 1:Ladder
- 2: Rd (-)
- 3: [10^6] 65°C1.
- 4: [10^6] 65°C2.
- 5: [10^6] 60°C1.
- 6:[10^6] 60°C2.
- 7: [10^6] 55°C1.
- 8: [10^6] 55°C2.
- 9: [10^6] (+)
- 10: dd H₂OΠροεν.
- 11: dd H₂O

Στην ηλεκτροφόρηση έχει χρησιμοποιηθεί ως θετικός μάρτυρας δείγμα κυτταροκαλλιέργειας που έχει μολυνθεί με μη αδρανοποιημένο ιό Sabin1 [10^6] TCID₅₀ (θέση 9). Από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης βλέπουμε ότι παρουσιάζουν θετικό προϊόν συγκρίνοντας και με τον θετικό μάρτυρα (9), το δείγμα (3) που προέρχεται από κυτταροκαλλιέργεια μολυσμένη με αδρανοποιημένο ιό στους 65°C, το δείγμα (6) που προέρχεται από κυτταροκαλλιέργεια μολυσμένη με αδρανοποιημένο ιό στους 60°C, καθώς και τα δείγματα (7) και (8) που προέρχονται από κυτταροκαλλιέργειες μολυσμένες με αδρανοποιημένο ιό στους 55°C. Τόσο ο αρνητικός μάρτυρας (2) που προέρχεται από κυτταροκαλλιέργεια μη μολυσμένη με ιό όσο και το νερό της προενίσχυσης και της Nested PCR δεν παρουσιάζουν σήμα. Συνεπώς δεν έχει γίνει επιμόλυνση των δειγμάτων μεταξύ τους και η αντίδραση έχει πραγματοποιηθεί ορθά. Ωστόσο παρατηρώντας την εμφάνιση θετικού σήματος σε ένα από τα δείγματα των 65°C και 60°C και όχι και στις δύο κυτταροκαλλιέργειες τους δημιουργήθηκαν αμφιβολίες και για το λόγο αυτό συνεχίσαμε με επανάληψη των αδρανοποιήσεων σε αυτές τις θερμοκρασίες για 30min καθώς και σε νέες αδρανοποιήσεις σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Τα νέα αδρανοποιημένα δείγματα

χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση νέων κυτταροκαλλιιεργειών και εν συνεχεία ελέχθησαν για την παρουσία του ιού.

Ετοιμάσαμε νέες κυτταροκαλλιέγειες τις οποίες μολύναμε με αδρανοποιημένο Sabin1 [10^6] TCID₅₀ στις θερμοκρασίες 60°C, 65°C, 70°C και 75°C για 30min. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του RNA, αντίστροφη μεταγραφή με τυχαίο εκκινητή HEPTAN d(N7), Nested PCR με τα εκκινητικά ζεύγη UG52-Flap/UC53-Flap και ENV1/ENV2 και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested PCR, περιμένοντας εμφάνιση σήματος στις 155bp.



- 1:Ladder
- 2: Rd (-)
- 3: [10^6] 75°C1.
- 4: [10^6] 75°C2.
- 5: [10^6] 70°C1.
- 6:[10^6] 70°C2.
- 7: [10^6] 65°C1.
- 8: [10^6] 65°C2.
- 9: [10^6] 60°C1.
- 10: [10^6] 60°C2.
- 11: [10^6] (+)
- 12: dd H₂OΠροεν.
- 13:dd H₂O

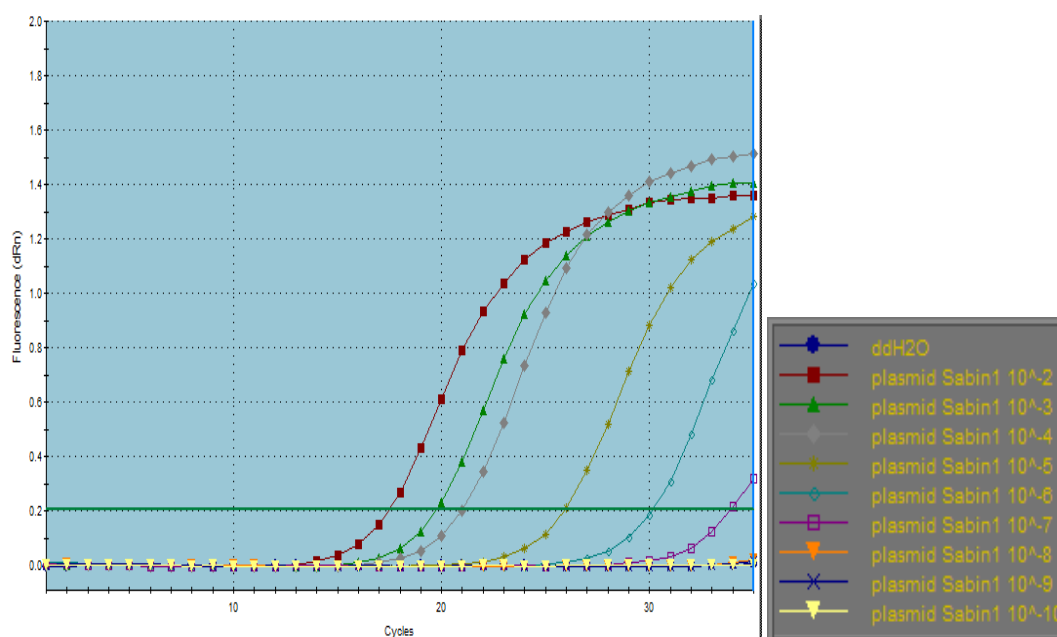
Στην εικόνα αυτή της ηλεκτροφόρησης παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται ο ιός παρά την αδρανοποίηση που έχει υποστεί στις θερμοκρασίες 60°C, 65°C (στις θέσεις 7, 8, 9 και 10) και στους δύο σωλήνες κυτταροκαλλιέργειας από τους οποίους προέρχεται κάθε δείγμα καθώς έχουμε εμφάνιση προϊόντος στις 155bp όμοιο με αυτό του θετικού μάρτυρα (προέρχεται από κυτταροκαλλιέργεια μολυσμένη με μη αδρανοποιημένο ιό Sabin1 [10^6] TCID₅₀). Στις υπόλοιπες θερμοκρασίες αδρανοποίησης 70°C και 75°C (θέσεις 3, 4, 5, 6) δεν παρατηρείται σήμα στις 155bp συνεπώς η αδρανοποίηση έχει επιτύχει και ο ιός κατέστη ανίκανος να εισέλθει στα κύτταρα. Ο αρνητικός μάρτυρας (θέση 2) όπως και τα νερά της προενίσχυσης και της Nested PCR (θέσεις 12 και 13) επίσης δεν εμφανίζουν σήμα στην ηλεκτροφόρηση που αποδεικνύει πως δεν έχει υπάρξει επιμόλυνση μεταξύ των δειγμάτων και η αντίδραση έχει τελεστεί ορθά.

Αποτελέσματα Real Time PCR

Η πρώτη Real Time PCR πραγματοποιήθηκε σε πλασμίδια Sabin1 σε σειριακές αραιώσεις $10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}$ και 10^{-10} , με το εκκινητικό ζεύγος ENV1/ENV2 με σκοπό των προσδιορισμό των πλασμιδιακών αντιγράφων μέσω της κατασκευής της πρότυπης καμπύλης ανάλογα με το Ct (Cycle threshold), ο κύκλος στον οποίο η τιμή φθορισμού υπερβαίνει την ουδό (threshold)). Το πλασμίδιο Sabin1 είχε κατασκευαστεί στο εργαστήριο για προηγούμενες μελέτες.

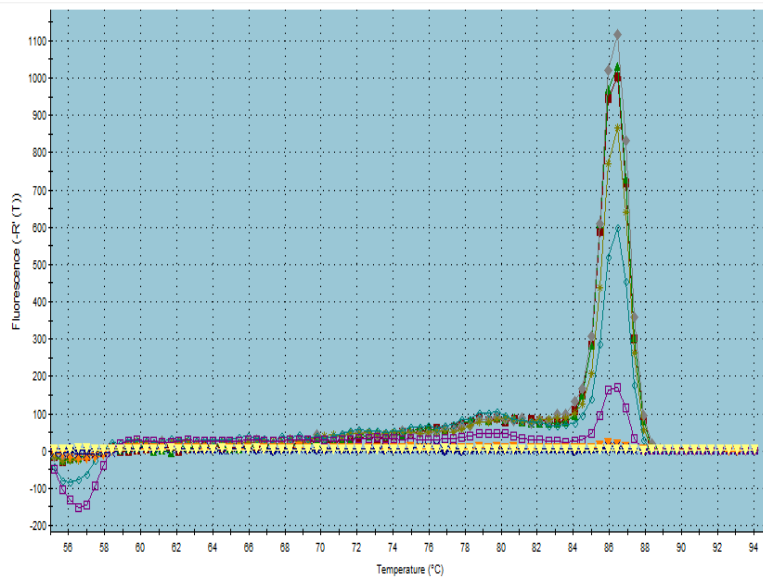
Οι σειριακές αραιώσεις του πλασμιδίου Sabin1 $10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}$ και 10^{-10} παρουσίασαν με βάση το Amplification Plot και το Dissociation Curve μια καλή γραμμικότητα και εξειδίκευση αντίστοιχα.

Ακολούθησε μια δεύτερη Real Time PCR στις σειριακές αραιώσεις των πλασμιδίων Sabin1 $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$ και στις σειριακές αραιώσεις του στελέχους Sabin1 με ικό τίτλο $10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10$ και 1 με το εκκινητικό ζεύγος ENV1/ENV2 που είχε ως σκοπό την κατασκευή μιας δεύτερης πρότυπης καμπύλης για τον προσδιορισμό του TCID₅₀ των ικών δειγμάτων ανάλογα με τα πλασμιδιακά αντίγραφα. Έτσι σε επόμενες Real Time PCR στα υπό μελέτη δείγματα θα είναι δυνατόν να εκφραστεί ο αριθμός των αντιγράφων τους ή το TCID₅₀ τους ανάλογα με το Ct εμφάνισής τους.

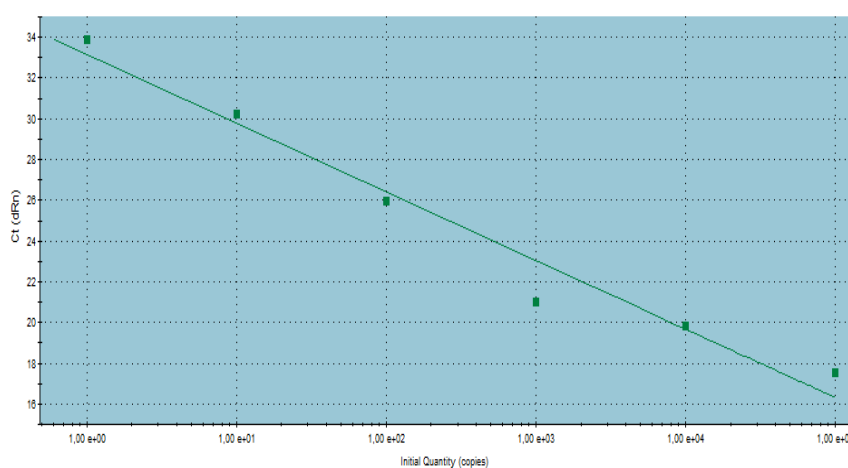


Εικόνα 14: Amplification Plots. Αποτελέσματα της Real Time για τις πλασμιδιακές Sabin1 σειριακές αραιώσεις.

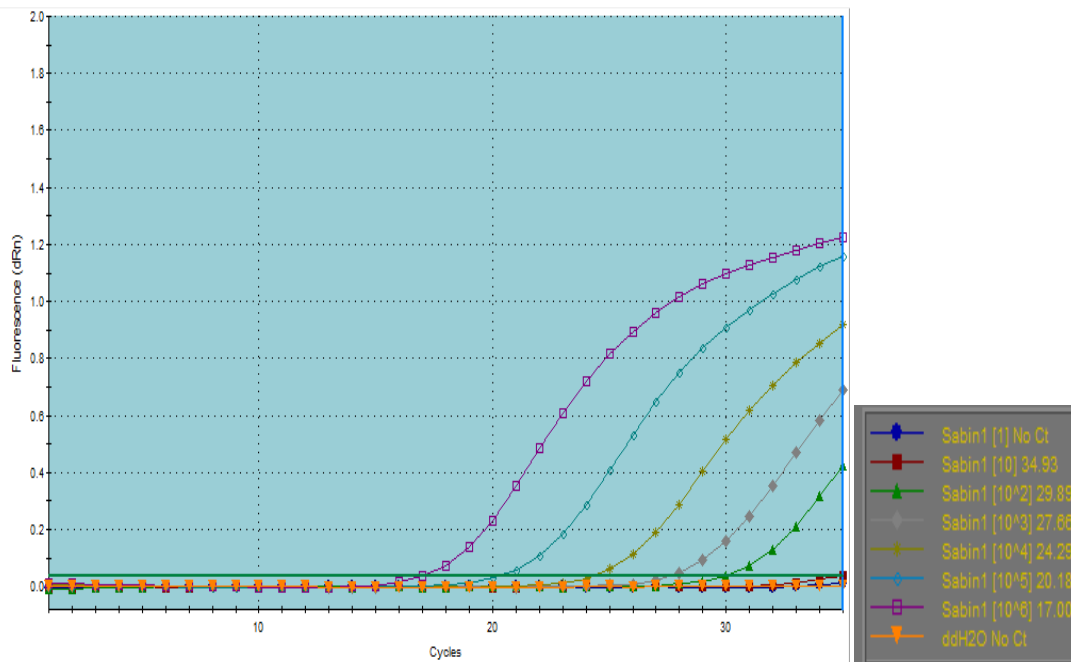
Από το Amplification Plots βλέπουμε πως το ένα αντίγραφο αντιστοιχεί στην αραιώση 10^{-7} .



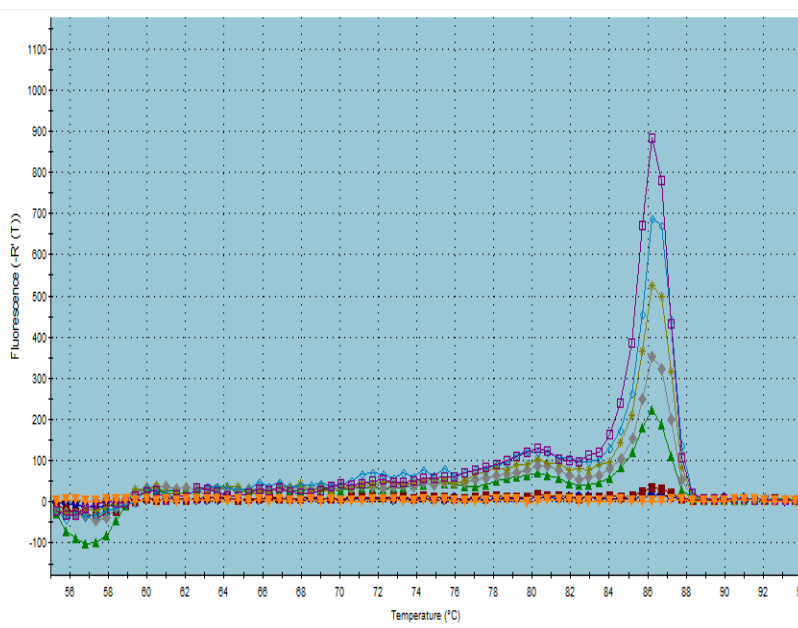
Εικόνα 15: Dissociation Curve των πλασμιδιακών Sabin1 σειριακών αραιώσεων.



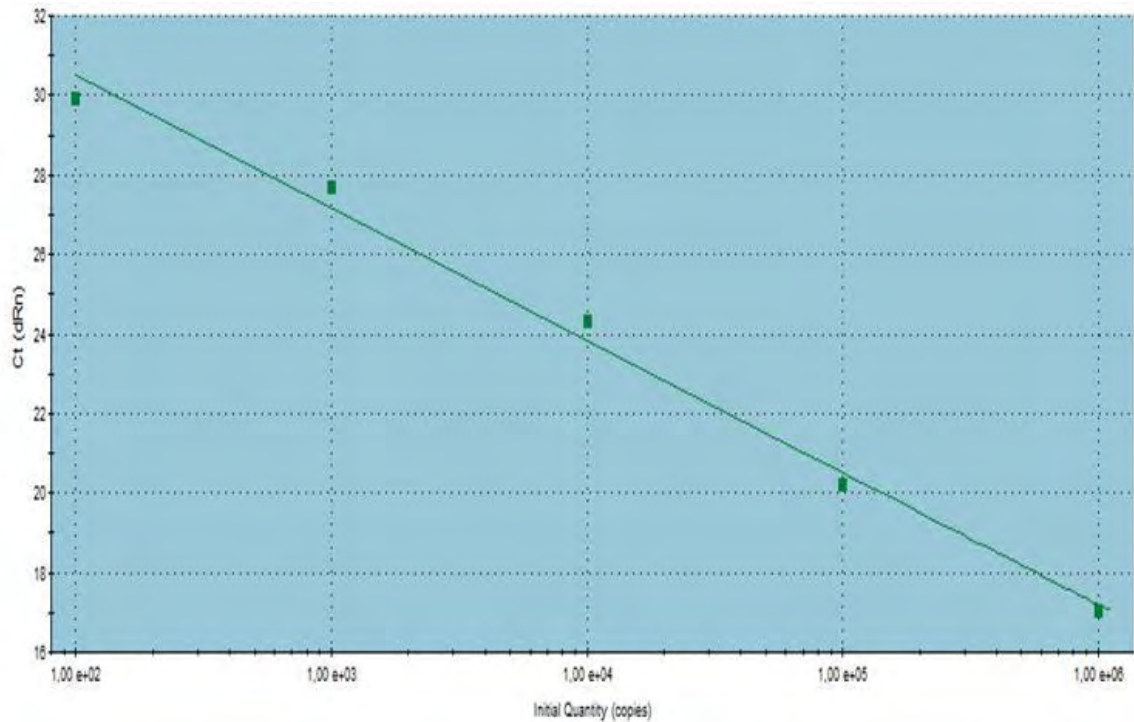
Εικόνα 16: Πρότυπη καμπύλη πλασμιδιακών Sabin1 σειριακών αραιώσεων.



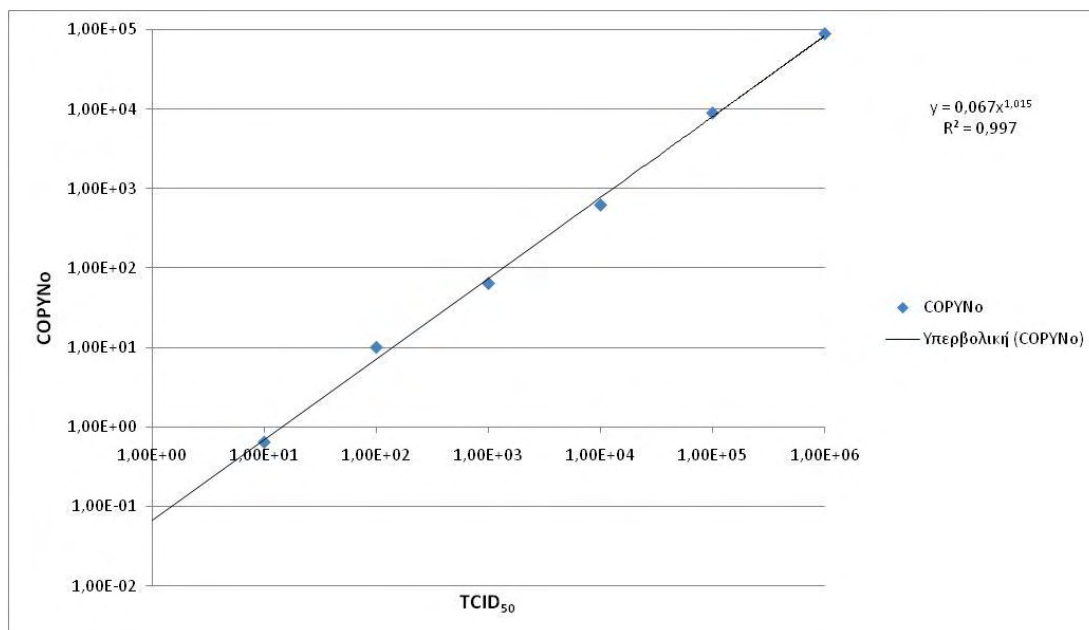
Εικόνα 17: Amplification Plots. Αποτελέσματα της Real Time για τις Sabin1 σειριακές αραιώσεις.



Εικόνα 18: Dissociation Curve των Sabin1 σειριακών αραιώσεων.



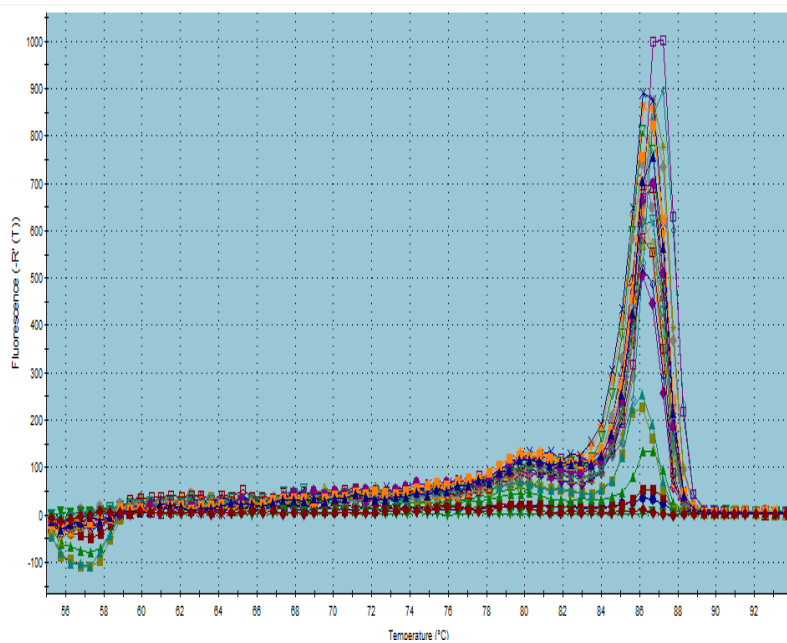
Εικόνα 10: Πρότυπη καμπύλη συσχέτισης TCID₅₀ με το Ct.



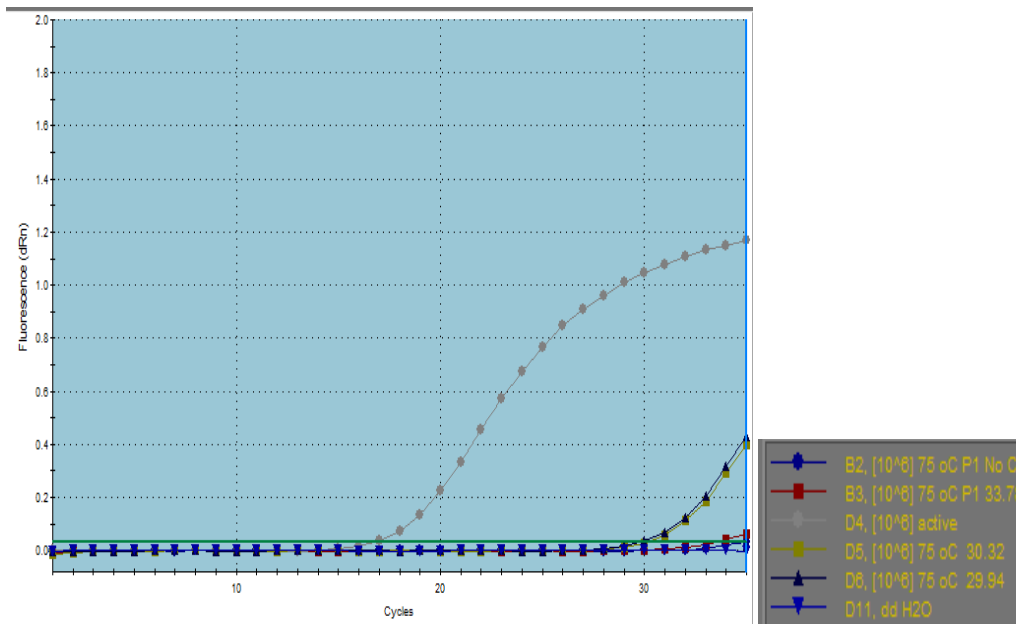
Εικόνα 11: Πρότυπη καμπύλη συσχετισμού TCID₅₀ με τον αριθμό αντιγράφων.

Στη συνέχεια έγινε μία τρίτη Real Time με το εκκινητικό ζεύγος ENV1/ENV2 σε δείγματα Sabin1 [10⁶] τα οποία μετά την αδρανοποίησή τους στις θερμοκρασίες 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C και 75°C, ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες και μετά το πέρας των πέντε ημερών εκχυλίστηκε το RNA τους και έγινε RT με τυχαίο εκκινητή HEPTAN d(N7) και σε δείγματα Sabin1 [10⁶] τα οποία αδρανοποιήθηκαν

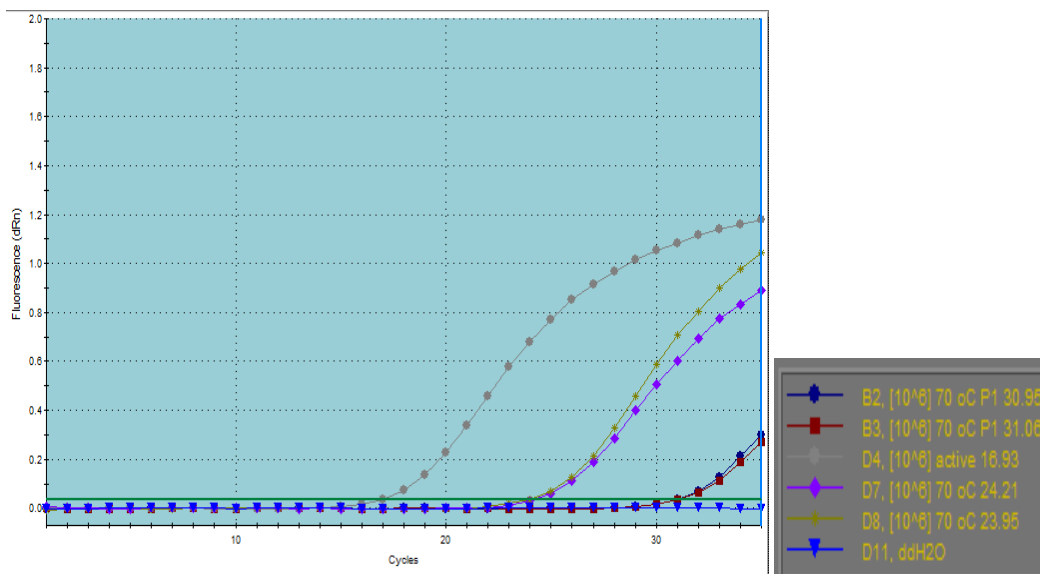
στις ίδιες θερμοκρασίες αλλά δεν ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες αλλά ακολούθησαν και αυτά την ίδια διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής με τα δείγματα από τις κυτταροκαλλιέργειες. Στο σύνολο των δειγμάτων έγινε σύγκριση ανάλογα με την θερμοκρασία αδρανοποίησης στα δείγματα που περάστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες και σε εκείνα που απλά αδρανοποιήθηκαν με την πρότυπη καμπύλη που είχε κατασκευαστεί με σκοπό τον υπολογισμό του TCID₅₀. Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα Amplification Plots για την κάθε θερμοκρασία αδρανοποίησης και το Dissociation Curve για το σύνολο των δειγμάτων όπου παρατηρείται ότι εμφανίζουν όλα τα δείγματα κοινή κορυφή που αντιπροσωπεύει την παρουσία του ιού.



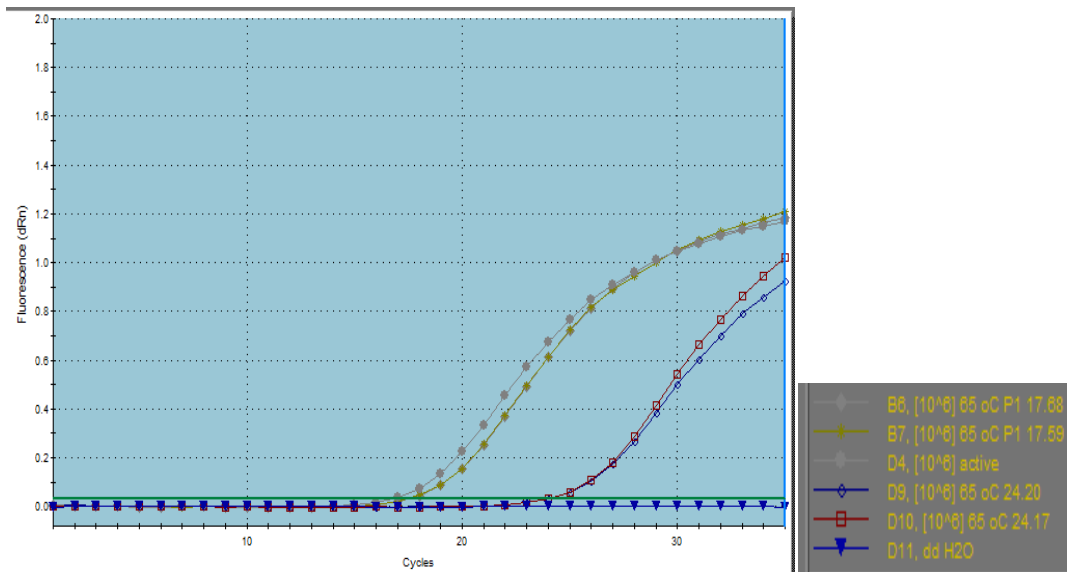
Εικόνα 19: Dissociation Curve των αδρανοποιημένων δειγμάτων που ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες, των αδρανοποιημένων δειγμάτων που δεν πέρασαν από κυτταροκαλλιέργεια, του θετικού μάρτυρα-ενεργού Sabin1 [10^6] και του νερού της αντίδρασης.



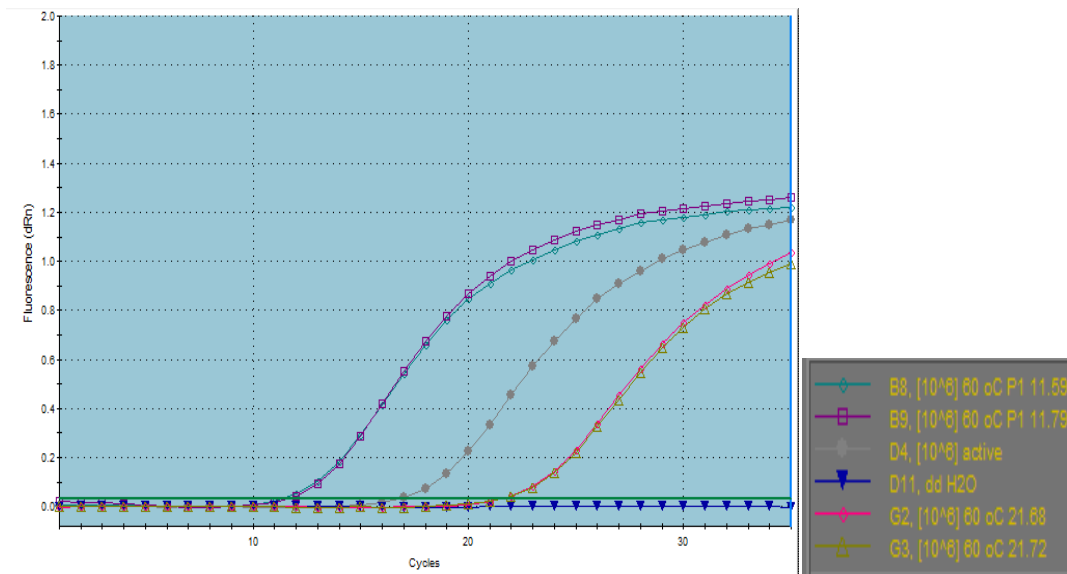
Εικόνα20: Amplification Plots Sabin1 [10^6] 75°C. B2 και B3 είναι τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν και ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργεια, ενώ D5 και D6 τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν αλλά δεν περάστηκαν από κυτταροκαλλιέργεια.



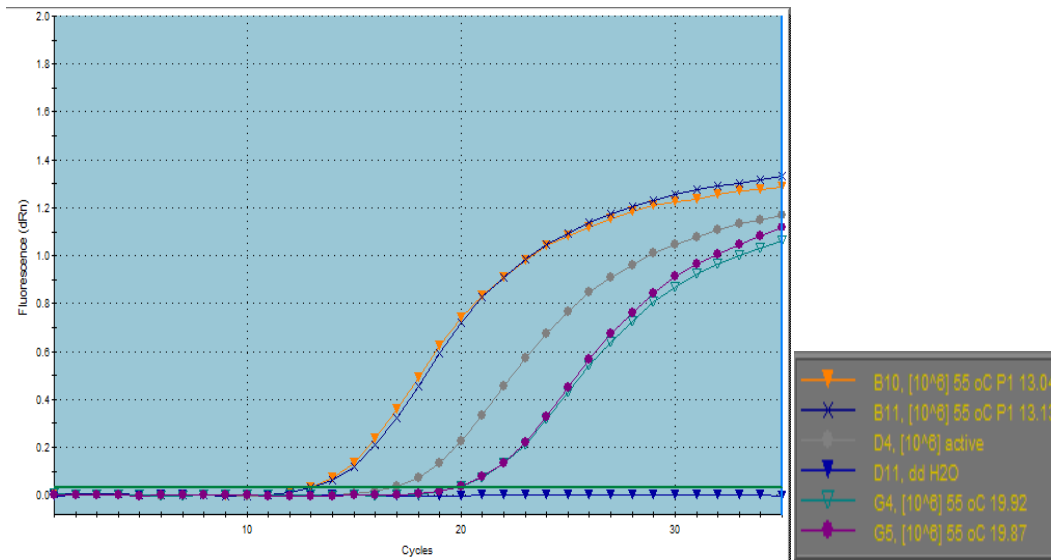
Εικόνα21: Amplification Plots Sabin1 [10^6] 70°C. B2 και B3 είναι τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν και ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργεια, ενώ D7και D8 τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν αλλά δεν περάστηκαν από κυτταροκαλλιέργεια.



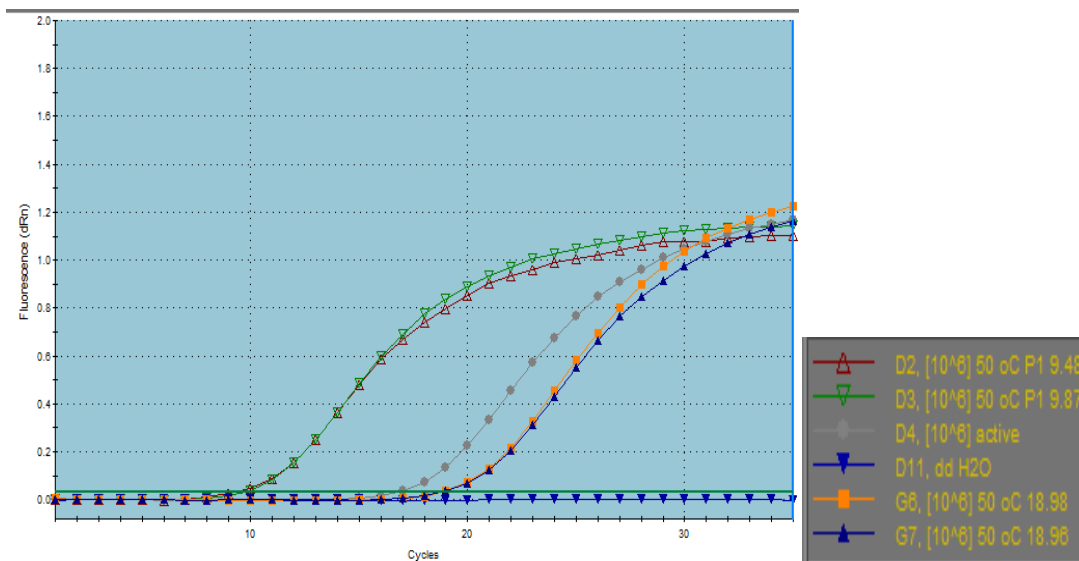
Εικόνα22: Amplification Plots Sabin1 [10^6] 65°C. B6 και B7 είναι τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν και ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργεια, ενώ D9 και D10 τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν αλλά δεν περάστηκαν από κυτταροκαλλιέργεια.



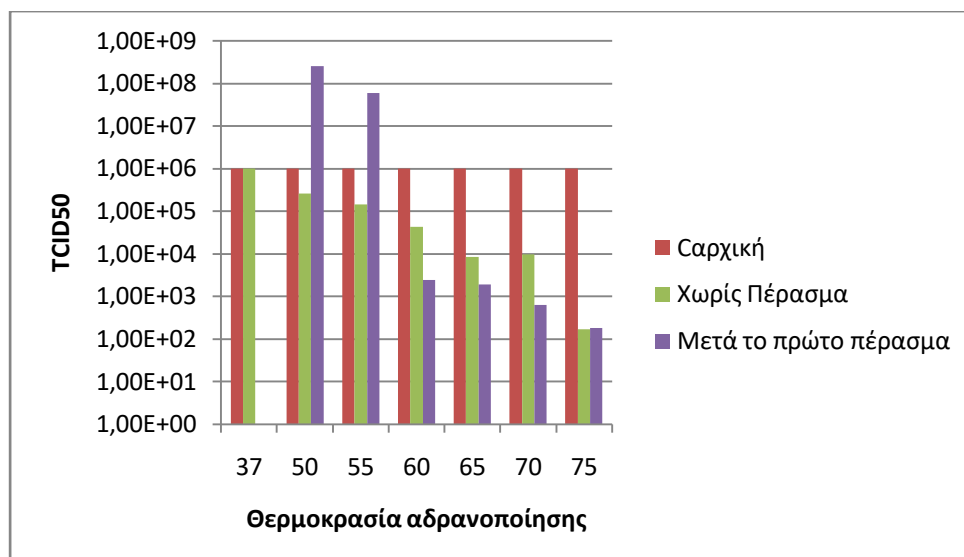
Εικόνα23: Amplification Plots Sabin1 [10^6] 60°C. B8 και B9 είναι τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν και ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργεια, ενώ G2 και G3 τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν αλλά δεν περάστηκαν από κυτταροκαλλιέργεια.



Εικόνα24: Amplification Plots Sabin1 [10^6] 55°C. B10 και B11 είναι τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν και ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργεια, ενώ G4 και G5 τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν αλλά δεν περάστηκαν από κυτταροκαλλιέργεια.



Εικόνα25: Amplification Plots Sabin1 [10^6] 50°C. D2 και D3 είναι τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν και ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργεια, ενώ G6 και G7 τα δείγματα που αδρανοποιήθηκαν αλλά δεν περάστηκαν από κυτταροκαλλιέργεια.

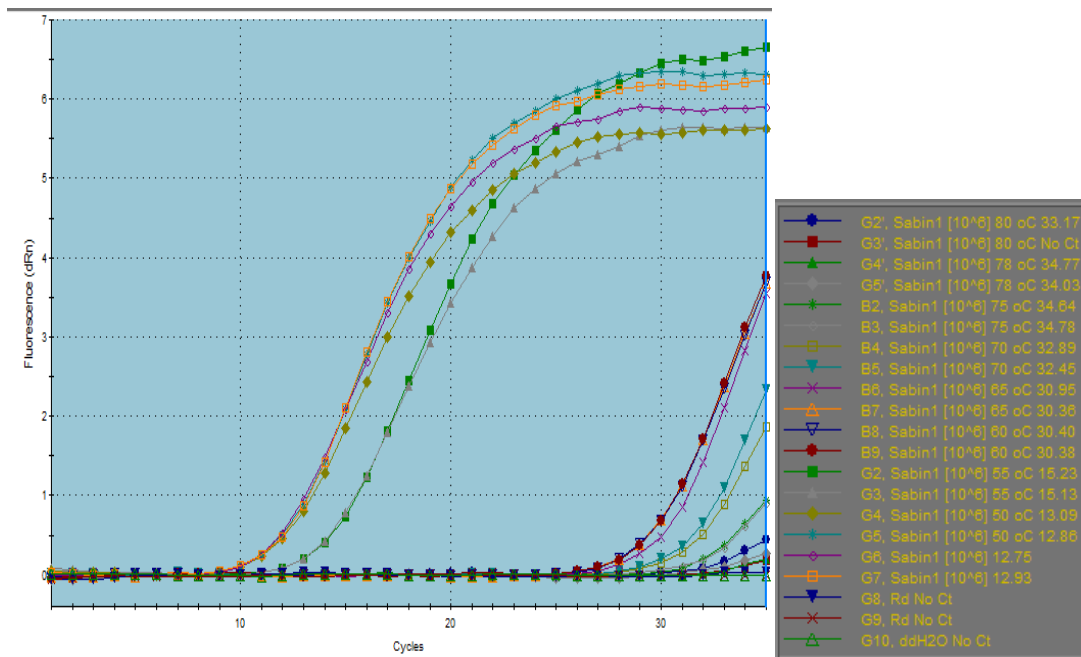


Εικόνα 26: Γράφημα συσχέτισης θερμοκρασίας αδρανοποίησης με $TCID_{50}$ σε δείγματα Sabin1 [10^6] μετά από κυτταροκαλλιέργεια και χωρίς το πέρασμα από κυτταροκαλλιέργεια.

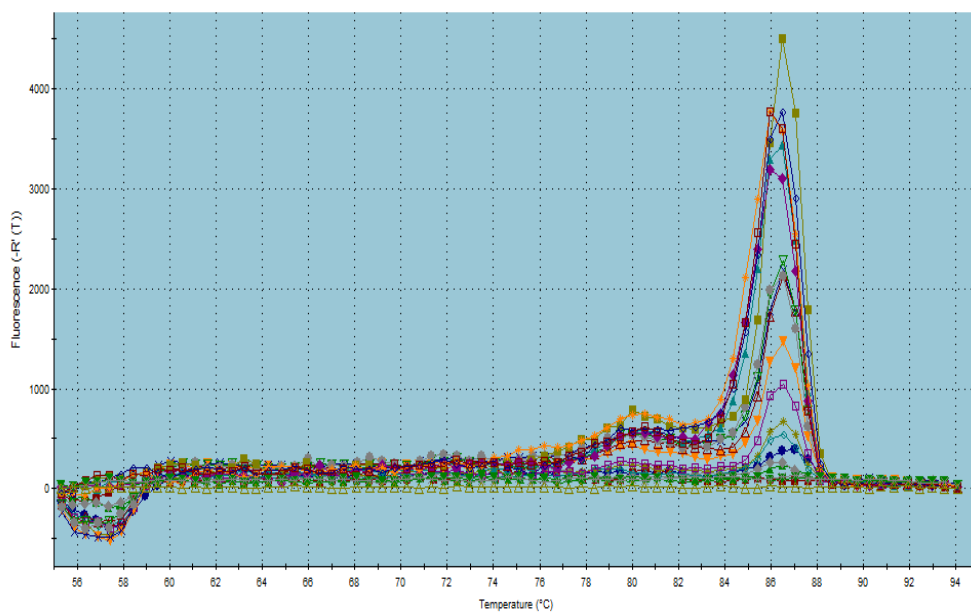
Από το παραπάνω γράφημα συμπαίρνουμε πως όσο αυξάνεται η θερμοκρασία αδρανοποίησης μειώνεται ο ιικός τίτλος, άρα και ο αριθμός των ικών αντιγράφων και στα δείγματα που περάστηκαν από κυτταροκαλλιέργεια αλλά και στα δείγματα που δεν περάστηκαν από κυτταροκαλλιέργεια. Συγκρίνοντας μεταξύ τους τα δείγματα που περάστηκαν από κυτταροκαλλιέργεια με τα αντίστοιχα που δεν περάστηκαν διαπιστώνουμε μεγαλύτερη μείωση του ιικού τίτλου στα δείγματα που ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες από τα αντίστοιχα που δεν ενοφθαλμίστηκαν. Σε θερμοκρασίες αδρανοποίησης μικρότερες των 60°C αν και αρχικά παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του ιού σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση, μετά το πέρασμα σε κυτταροκαλλιέργεια η συγκέντρωση του αυξάνεται, υποδεικνύοντας ότι ο ιός δεν έχει αδρανοποιηθεί επαρκώς.

Για τα δείγματα Sabin1 [10^6] πραγματοποιήθηκαν για μία τελευταία φορά αδρανοποιήσεις στις θερμοκρασίες 50°C , 55°C , 60°C , 65°C , 70°C , 75°C , 78°C και 80°C , ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες, έγινε εκχύλιση του RNA και Real Time PCR με το εκκινητικό ζεύγος ENV1/ENV2. Τα αποτελέσματα της Real Time παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες μέσω του Amplification Plots και του Dissociation Curve. Από αυτά συμπεραίνουμε πως στις υψηλές θερμοκρασίες αδρανοποίησης 78°C και 80°C υπάρχει αδρανοποίηση του ιού καθώς το Ct σε αυτές τις θερμοκρασίες εμφανίζεται πολύ κοντά στον τριακοστό πέμπτο κύκλο που είναι και το τέλος της αντίδρασης. Αντίθετα στις μικρότερες θερμοκρασίες όπως οι 50°C φαίνεται να μην αδρανοποιούν τον ιό καθώς το Ct τους είναι πολύ κοντά στον θετικό μάρτυρα (ενεργός ιός). Στις ενδιάμεσες θερμοκρασίες 60°C , 65°C , 70°C και 75°C παρατηρείται μερική αδρανοποίηση του ιού ο οποίος όμως σταδιακά ανάλογα με τη θερμοκρασία θέρμανσης καταφέρνει να ανακάμψει και να διεισδύσει στα κύτταρα ώστε να επάγει τον πολλαπλασιασμό του. Στις θερμοκρασίες αυτές το Ct της αντίδρασης αυξάνεται εφόσον ο ιός έχει χαμηλότερο ιικό τίτλο.

Μέσω του Dissociation Curve βλέπουμε την ειδικότητα του προϊόντος και συνεπώς την εξειδίκευση της αντίδρασης.



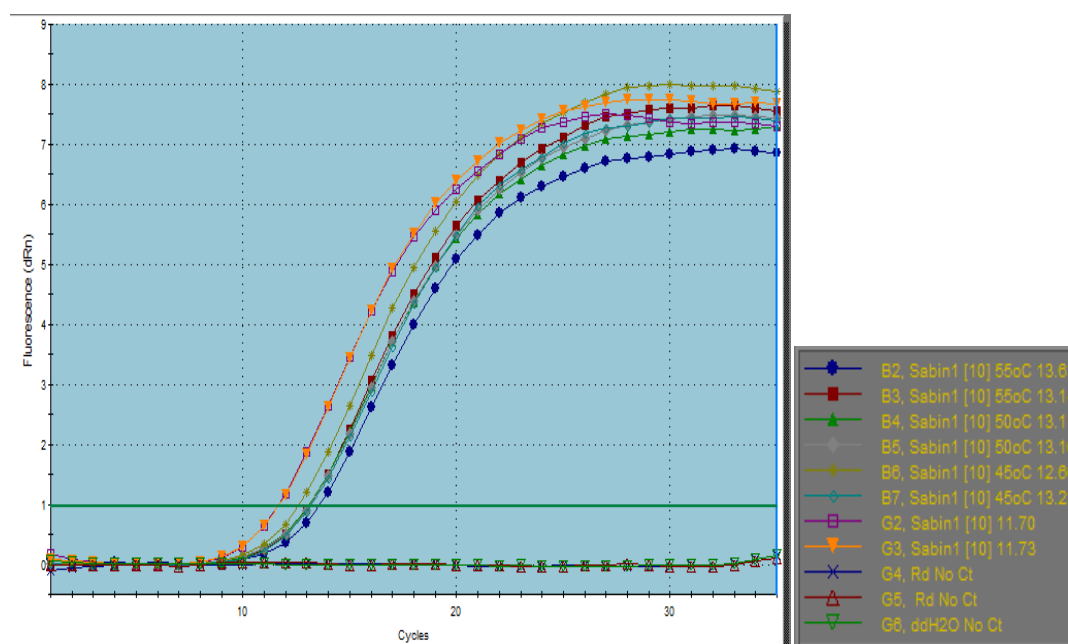
Εικόνα 27: Amplification Plots της Real Time για το σύνολο των αδρανοποιημένων δειγμάτων Sabin1 [10⁶] TCID₅₀, του θετικού μάρτυρα και των αρνητικών μαρτύρων.



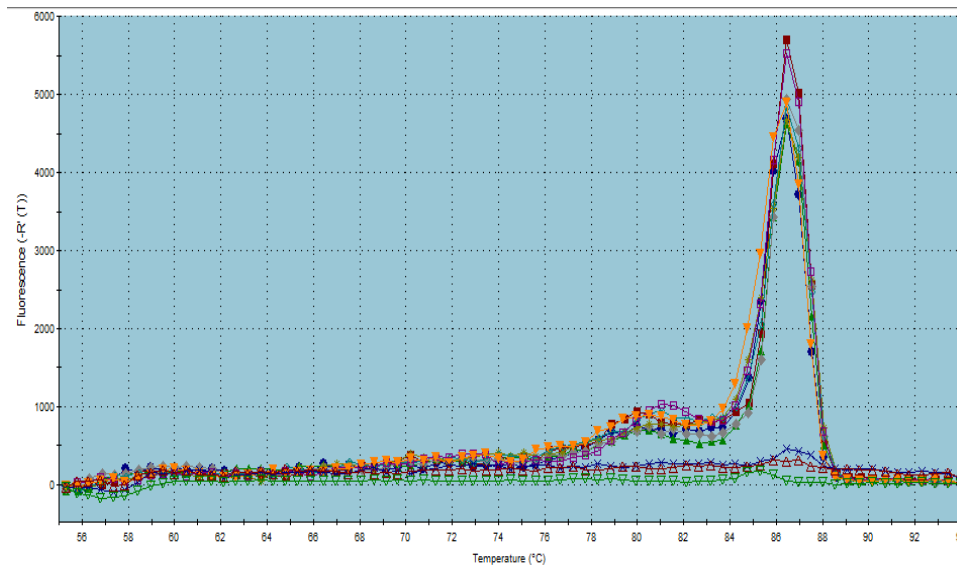
Εικόνα 28: Dissociation Curves της Real Time για το σύνολο των αδρανοποιημένων δειγμάτων Sabin1 [10⁶] TCID₅₀, του θετικού μάρτυρα και των αρνητικών μαρτύρων.

6.5 Αποτελέσματα Real Time PCR για δείγματα Sabin1 [10] TCID₅₀

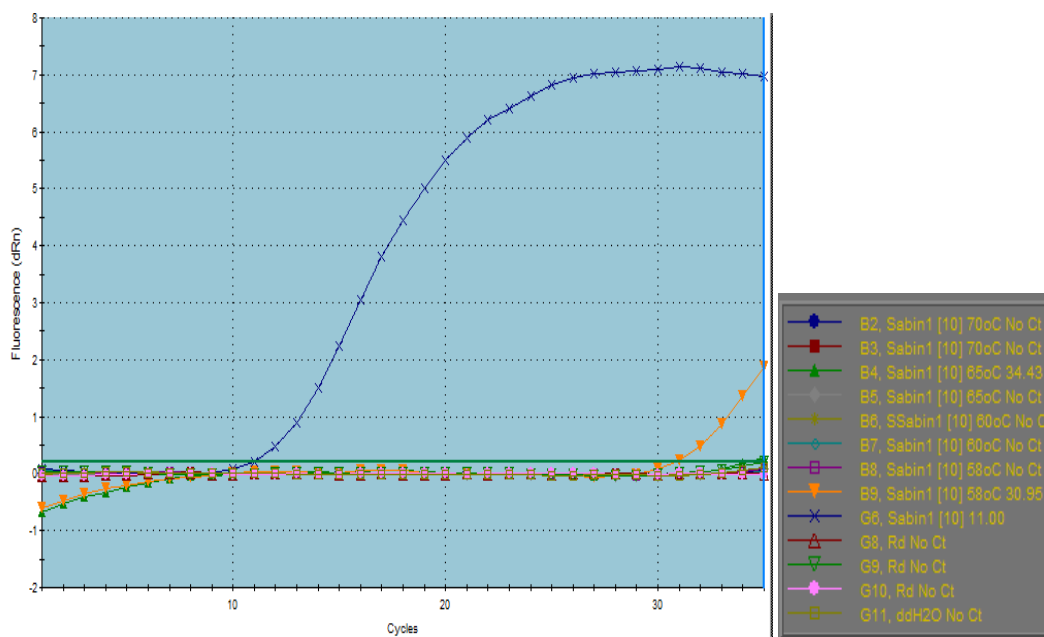
Για το στέλεχος Sabin1 [10] TCID₅₀ πραγματοποιήθηκαν δύο φορές αδρανοποιήσεις σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Την πρώτη φορά έγιναν αδρανοποιήσεις των δειγμάτων στις θερμοκρασίες 45°C, 50°C και 55°C. Τα δείγματα ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε εκχύλιση RNA, σε αντίστροφη μεταγραφή με τυχαίο εκκινητή HEPTAN d(N7) και Real Time PCR με το εκκινητικό ζεύγος ENV1/ENV2. Από τα αποτελέσματα της Real Time PCR διαπιστώσαμε πως δεν είχε γίνει εντελώς αδρανοποίηση του ιού αφού ακόμα και στους 55°C ο ιός περνούσε στα κύτταρα. Για το λόγο αυτό συνεχίσαμε με αδρανοποιήσεις δειγμάτων Sabin1 [10] TCID₅₀ στις θερμοκρασίες 58°C, 60°C, 65°C και 70°C. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για νέα μόλυνση κυτταροκαλλιεργειών, υποβλήθηκαν σε εκχύλιση RNA, σε αντίστροφη μεταγραφή με τυχαίο εκκινητή HEPTAN d(N7) και Real Time PCR με το εκκινητικό ζεύγος ENV1/ENV2. Από τα αποτελέσματα της δεύτερης Real Time PCR διαπιστώσαμε πως το στέλεχος Sabin1 [10] TCID₅₀ αδρανοποιείται μεταξύ 58°C και 60°C αφού εκεί σταματά να εμφανίζει Ct η αντίδραση.



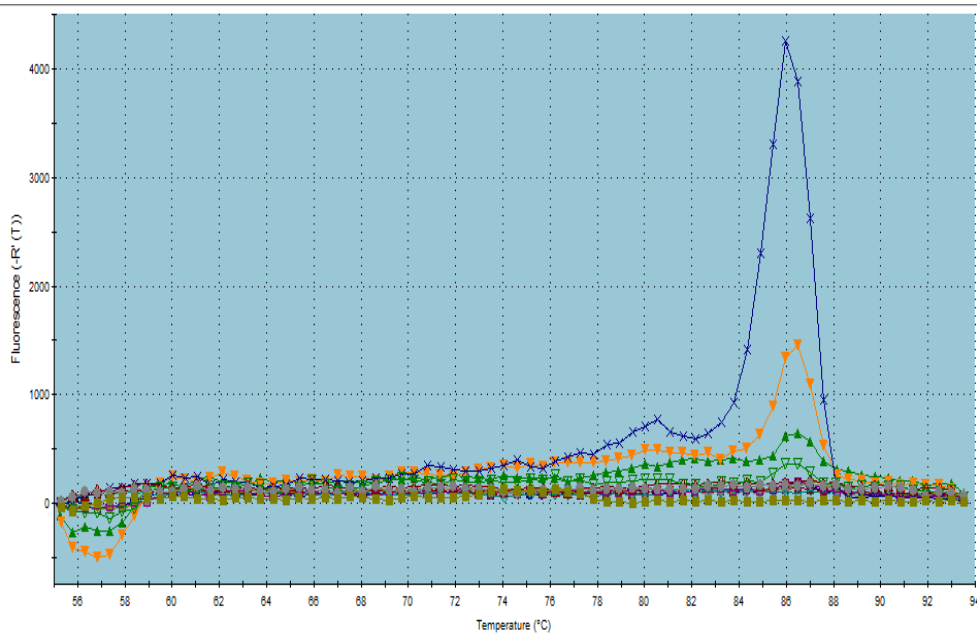
Εικόνα29: Amplification Plots πρώτης Real Time PCR για το στέλεχος Sabin1 [10] TCID₅₀.



Εικόνα30: Dissociation Curve πρώτης Real Time PCR για το στέλεχος Sabin1 [10] TCID₅₀.



Εικόνα 31: Amplification Plots της δεύτερης Real Time PCR για το στέλεχος Sabin1 [10] TCID₅₀.

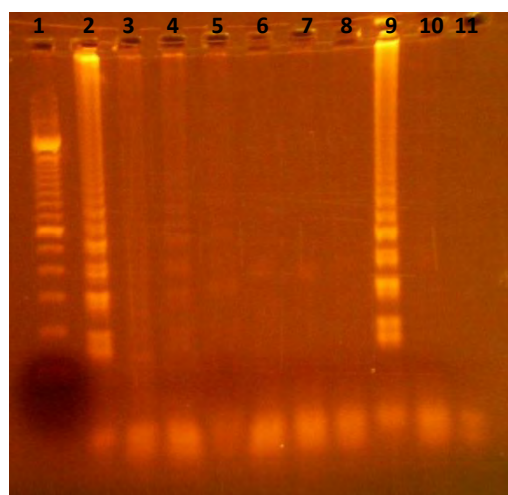


Εικόνα 32: Dissociation Curve της δεύτερης Real Time PCR για το στέλεχος Sabin1 [10] TCID₅₀.

6.6 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων Sabin1 [10⁶] και [10] TCID₅₀ έπειτα από LAMP στα αδρανοποιημένα δείγματα για 30 min.

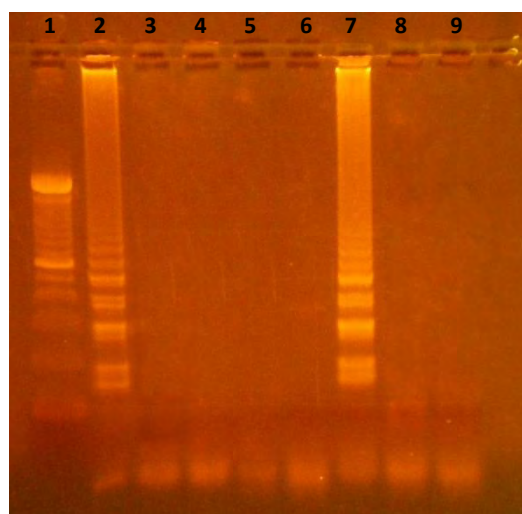
Τα δείγματα Sabin1 [10⁶] σε θερμοκρασίες αδρανοποίησης 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 78°C, 80°C και [10] TCID₅₀ σε θερμοκρασίες αδρανοποίησης 55°C, 58°C, 60°C, 65°C, 70°C για 30min υποβλήθηκαν σε εκχύλιση του RNA, αντίστροφη μεταγραφή με τυχαίο εκκινητή HEPTAN d(N7) και LAMP με τα εκκινητικά ζεύγη FIP/BIB και F3/B3. Τα προϊόντα της LAMP ηλεκτροφορήθηκαν με σκοπό την ανίχνευση ζωνώσεων στα θετικά δείγματα που προσομοιάζουν την εικόνα ζωνώσεων του θετικού μάρτυρα της αντίδρασης.

Sabin1 [10⁶]



- 1: Ladder
- 2: [10⁶] 55 °C
- 3: [10⁶] 60 °C
- 4: [10⁶] 65 °C
- 5: [10⁶] 70 °C
- 6: [10⁶] 75 °C
- 7: [10⁶] 78 °C
- 8: [10⁶] 80 °C
- 9: [10⁶] (+)
- 10: Rd (-)
- 11: dd H₂O

Sabin1 [10]



- 1: Ladder
- 2: [10] 55 °C
- 3: [10] 58 °C
- 4: [10] 60 °C
- 5: [10] 65 °C
- 6: [10] 70 °C
- 7: [10] (+)
- 8: Rd (-)
- 9: dd H₂O

Από τις δύο ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων της LAMP επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της Real Time PCR. Για τα δείγματα του Sabin1 [10⁶] TCID₅₀ παρατηρούμε έντονη εμφάνιση ζωνώσεων στο δείγμα (2) που είναι αδρανοποιημένο στους 55°C αντίστοιχη με αυτή του θετικού μάρτυρα (9) που είναι μη αδρανοποιημένος ιός Sabin1 [10⁶] TCID₅₀, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η θερμοκρασία αυτή δεν είναι κατάλληλη για την πλήρη αδρανοποίηση του ιού. Στους 60°C και 65°C (δείγματα (3) και (4)) παρατηρούμε λιγότερο έντονες ζωνώσεις που αποδεικνύουν ότι μέσω της αδρανοποίησης σε αυτές τις θερμοκρασίες ο ιικός τίτλος μειώνεται, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες 70°C, 75°C, 78°C και 80°C δεν παρατηρούμε ζωνώσεις γεγονός που αποδεικνύει είτε ότι ο ιικός τίτλος μειώθηκε πάρα πολύ λόγω της αδρανοποίησης, είτε ότι γίνεται πλήρης αδρανοποίηση του ιού σε αυτές τις θερμοκρασίες. Τόσο ο αρνητικός μάρτυρας, δείγμα (10) όσο και το νερό της αντίδρασης, δείγμα (11) δεν εμφανίζουν ζωνώσεις, συνεπώς δεν υπάρχει επιμόλυνση και η αντίδραση έχει πραγματοποιηθεί σωστά.

Σε ότι αφορά τα δείγματα Sabin1 [10] TCID₅₀ στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης παρατηρούμε έντονες ζωνώσεις στο δείγμα (2) που έχει αδρανοποιηθεί στους 55°C αντίστοιχη με αυτή του θετικού μάρτυρα, μη αδρανοποιημένου Sabin1 [10] TCID₅₀ δείγμα (7), γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η θερμοκρασία αυτή δεν είναι κατάλληλη για την πλήρη αδρανοποίηση του ιού. Συνεχίζοντας σε υψηλότερες θερμοκρασίες αδρανοποίησης δεν εμφανίζονται ζωνώσεις στα δείγματα (3, 4, 5, 6). Συνεπώς από τους 58°C παρατηρείται αδρανοποίηση του ιού. Η αντίδραση έχει πραγματοποιηθεί ορθά χωρίς κάποια επιμόλυνση καθώς δεν παρατηρούνται ζωνώσεις ούτε στον αρνητικό μάρτυρα, δείγμα (8) ούτε και στο νερό της αντίδρασης, δείγμα (9).

Δ) Συζήτηση

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Picornaviridae* και στο γένος *Enterovirus*. Το γονιδίωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+)ssRNA μήκους περίπου 7.500 βάσεων, το οποίο περιβάλλεται αποκλειστικά από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας.

Οι εντεροϊοί, ανήκουν στους πιο κοινούς ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο παγκοσμίως (Khetsuriani N. et al, (2006)). Σχετίζονται με διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο, οι οποίες προκαλούν ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων το οποίο κυμαίνεται από ασυμπτωματικές μολύνσεις έως και σοβαρές ασθένειες. Συγκεκριμένα παραδείγματα αποτελούν: το κοινό κρουαλόγημα, η ασθένεια των χεριών, των ποδιών και του στόματος (HFMD), οξεία χαλαρή παράλυση, άσηπτη μηνιγγίτιδα και μυοκαρδίτιδα (Kargar M. et al, (2009) & Pallansch M. A. et al, (2001)).

Η μετάδοση των εντεροϊών πραγματοποιείται κυρίως μέσω του στόματος και των κοπράνων (Rajtar B. et al, (2008)). Η επαφή με νερό, φαγητό και χώμα με μολυσμένα κόπρανα, μπορεί να οδηγήσει στη μετάδοση μέσω της κοπρανοστοματικής οδού (Lee H. K. et al, (2004) & Rajtar B. et al, (2008)). Ένας μεγάλος αριθμός εντεροϊών έχει ανιχνευθεί τόσο σε περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα καθώς και σε διάφορα τρόφιμα (Nicholson F. et al, (1994) & Kopecka H. et al, (1993) & Iritani N. et al, (2014)).

Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση των δειγμάτων για τυχόν ύπαρξη διαφόρων στελεχών εντεροϊών, αλλά και ο έλεγχος της αντιγραφικής ενεργότητας τους, καθώς η ανίχνευση αποκλειστικά του γονιδιώματός τους δεν είναι αρκετή για να κατανοήσουμε πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις που μπορούν να προκληθούν.

Κατά τον κύκλο ζωής ενός εντεροϊού, αυτό που τον καθιστά αντιγραφικά ενεργό και επομένως ικανό να μολύνει το κύτταρο ξενιστή είναι η ύπαρξη του κλώνου αρνητικής πολικότητας (Li Y. et al, (2002)). Ένας συνήθης τρόπος για τον έλεγχο της αντιγραφικής ενεργότητας στους εντεροϊούς είναι μέσω ανάπτυξης τους σε κυτταροκαλλιέργειες και παρακολούθηση για κυτταροπαθογόνο δράση ή αλλιώς CPE. Παρά το γεγονός όμως ότι μπορεί να δώσει μία καλή ένδειξη για το πώς ένας εντεροϊός μπορεί να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του μέσα στο κύτταρο (μέσω της διαδικασίας λύσης και την εμφάνιση κυτταρικών αλλοιώσεων), δεν παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα αλλά και ευαισθησία. Μειονέκτημα επίσης της παρούσας προσέγγισης, αποτελεί ο χρόνος που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί η διαδικασία. Το σημαντικότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζει όμως, είναι πως ορισμένα στελέχη εντεροϊών δεν προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις σε υπάρχουσες διαθέσιμες κυτταρικές σειρές, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει διάκριση για το αν τελικά

ο ιός είναι ενεργός αντιγραφικά ή όχι. Για αυτό πλέον, η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών τείνει να αντικαταστήσει τον παραδοσιακό τρόπο χρήσης κυτταροκαλλιέργειών και έχει οδηγήσει στην γρήγορη και ειδική ανίχνευση τόσο του θετικής πολικότητας κλώνου όσο και του κλώνου αρνητικής πολικότητας (Bhattacharya S. S. et al, (2004)).

Στην παρούσα εργασία, έγινε παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας θερμικής αδρανοποίησης του εμβολιακού στελέχους Sabin1 [10^6], [10] και [1] TCID₅₀ μέσω κυτταροκαλλιέργειας και μιας σύγχρονης αντίστροφης μεταγραφής (RT)-Loop Mediated Isothermal Amplification. Στο πρώτο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε θερμική αδρανοποίηση του εμβολιακού στελέχους Sabin1 σε διαδοχικές θερμοκρασίες με σκοπό τον εντοπισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας αδρανοποίησης. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε μόλυνση των κυτταροκαλλιέργειών με τα αδρανοποιημένα δείγματα Sabin1 και παρακολούθηση τους για την εμφάνιση CPE. Στο τρίτο μέρος της εργασίας ακολούθησε απομόνωση του γονιδιώματος του ιού από τις κυτταροκαλλιέργειες, μετατροπή του RNA σε DNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής και έλεγχος για την παρουσία αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών μέσω Real Time PCR. Στο τέταρτο και τελευταίο μέρος της εργασίας έγινε επαλήθευση των προηγούμενων αποτελεσμάτων αδρανοποίησης του στελέχους Sabin1 σε κάθε θερμοκρασία, μέσω μιας γρήγορης και ευαίσθητης τεχνικής αντίστροφης μεταγραφής (RT)-Loop Mediated Isothermal Amplification.

Πιο αναλυτικά, αρχικά πραγματοποιήθηκαν αδρανοποιήσεις του εμβολιακού στελέχους Sabin1 σε διάφορες θερμοκρασίες και σε συγκεντρώσεις [1], [10] και [10^6] TCID₅₀, σύμφωνα με την διαδικασία αδρανοποίησης που έχει προαναφερθεί. Τα αδρανοποιημένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση κυτταροκαλλιέργειών και την παρακολούθηση εμφάνισης κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) του ιού μέσω των κυτταρικών αλλοιώσεων που προκαλούσε.

Το στέλεχος Sabin1 [1] TCID₅₀, αδρανοποιήθηκε για 20min στις θερμοκρασίες 50°C, 60°C και 70°C και ενοφθαλμίστηκε σε κυτταροκαλλιέργειες. Ακολούθησε δεύτερη και τρίτη ανακαλλιέργεια των δειγμάτων χωρίς ωστόσο να παρατηρηθούν σε καμία κυτταρικές αλλοιώσεις λόγω της κυτταροπαθογόνου δράσης του ιού. Η δεύτερη και η τρίτη ανακαλλιέργεια ελέχθησαν για την παρουσία του θετικής πολικότητας κλώνου με RT-PCR με τυχαίο εκκινητή για την αντίστροφη μεταγραφή, HEPTAN d(N7), και το εκκινητικό ζεύγος UG52-Flap/UC53-Flap που στοχεύει στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του θετικού κλώνου στην PCR. Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR στην δεύτερη και στην τρίτη ανακαλλιέργεια δεν εμφανίστηκε προϊόν γεγονός που επιβεβαιώνει τις παρατηρήσεις μη εμφάνισης CPE στις κυτταροκαλλιέργειες. Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε Nested PCR με το ζεύγος εκκινητών ENV1/ENV2 τόσο στη δεύτερη όσο και στην τρίτη ανακαλλιέργεια των παραπάνω

δειγμάτων συγκέντρωσης [1] TCID₅₀, με σκοπό την ανίχνευση του θετικού κλώνου, σε περίπτωση που βρίσκεται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση κάτω από τα όρια ανίχνευσης της απλής PCR, ενισχύοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου. Από τις ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων της Nested PCR επαληθεύτηκαν οι παρατηρήσεις μη εμφάνισης CPE στις κυτταροκαλλιέργειες. Τα παραπάνω μας οδηγούν στο συμπέρασμα πως ο Sabin1 [1] TCID₅₀ αδρανοποιείται σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία, ενώ επίσης είναι γνωστό και από προηγούμενες κινητικές μελέτες στο εργαστήριο πως χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να ξεκινήσει τη μεταγραφή του μέσα στο κύτταρο ξενιστή σε σχέση με μεγαλύτερη συγκέντρωση όπως [10⁶] όπου ξεκινά εντός τεσσάρων ωρών από τη μόλυνση του κυττάρου.

Το στέλεχος Sabin1 [10] TCID₅₀ αδρανοποιήθηκε για 30min στις θερμοκρασίες 45°C, 50°C, 55°C, 58°C, 60°C, 65°C και 70°C. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση κυτταροκαλλιεργειών οι οποίες παρατηρήθηκαν και σημειώθηκε εμφάνιση CPE μέχρι και τους 55°C ενώ στις υψηλότερες θερμοκρασίες την πέμπτη ημέρα παρακολούθησης σημειώθηκε εμφάνιση πολύ μικρής κυτταρικής αλλοίωσης. Τα παραπάνω δείγματα στη συνέχεια ελέγχθηκαν με RT-Real Time PCR με τυχαίο εκκινητή για την αντίστροφη μεταγραφή, HEPTAN d(N7) και το εκκινητικό ζεύγος ENV1/ENV2 για την Real Time PCR. Από την Real Time PCR διαπιστώθηκε πως δεν αδρανοποιείται ο ιός στις θερμοκρασίες 45°C, 50°C και 55°C καθώς εμφάνιζαν πολύ μικρό Ct στην αντίδραση και ότι αδρανοποιείται μεταξύ 58°C και 60°C αφού εκεί σταματά να εμφανίζει Ct η αντίδραση. Τέλος τα δείγματα 55°C, 58°C, 60°C, 65°C και 70°C υποβλήθηκαν και σε LAMP με τα εκκινητικά ζεύγη FIP/BIP και F3/B3 τα αποτελέσματα της οποίας επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της Real Time PCR καθώς και των παρατηρήσεων εμφάνισης CPE στις κυτταροκαλλιέργειες σε πολύ λίγο χρόνο (45min).

Σε ότι αφορά το στέλεχος Sabin1 [10⁶] TCID₅₀ υποβλήθηκε σε τρεις διαφορετικούς κύκλους αδρανοποιήσεων. Στον πρώτο κύκλο πραγματοποιήθηκαν αδρανοποιήσεις για 20min στις θερμοκρασίες 50°C, 60°C και 70°C. Ακολούθησε η μόλυνση κυτταροκαλλιεργειών, δεύτερη και τρίτη ανακαλλιέργεια στις θερμοκρασίες 60°C και 70°C. Στην πρώτη καλλιέργεια παρατηρήθηκε εμφάνιση CPE στα δείγματα 55°C και 60°C, ενώ στη δεύτερη και στην τρίτη δεν παρατηρήθηκαν κυτταρικές αλλοιώσεις. Τα δείγματα ελέγχθηκαν με RT-PCR με τυχαίο εκκινητή για την αντίστροφη μεταγραφή, HEPTAN d(N7), και το εκκινητικό ζεύγος UG52-Flap/UC53-Flap που στοχεύει στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του θετικού κλώνου στην PCR. Από τα δείγματα της πρώτης καλλιέργειας στην PCR ανιχνεύτηκε ο θετικής πολικότητας RNA κλώνος στους 55°C που σημαίνει πως σε αυτή τη θερμοκρασία δεν αδρανοποιείται ο ιός. Στις PCR της δεύτερης και της τρίτης ανακαλλιέργειας δεν ανιχνεύτηκε προϊόν. Στον δεύτερο κύκλο πραγματοποιήθηκαν αδρανοποιήσεις για 25min στις θερμοκρασίες 52°C, 54°C, 56°C, 58°C και 60°C. Με τα δείγματα αυτά έγιναν μολύνσεις κυτταροκαλλιεργειών στις οποίες παρατηρήθηκε εμφάνιση CPE σε όλα τα δείγματα. Ακολούθησε RT-PCR με τυχαίο εκκινητή για την αντίστροφη μεταγραφή, HEPTAN d(N7), και το εκκινητικό ζεύγος

UG52-Flap/UC53-Flap που στοχεύει στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του θετικού κλώνου στην PCR. Από τα αποτελέσματα της PCR επαληθεύτηκαν οι παρατηρήσεις των κυτταροκαλλιιεργειών αφού είχαμε εμφάνιση προϊόντος που υποδικνύει την παρουσία ιού σε όλα τα δείγματα. Επιπλέον έγινε έλεγχος και για την ύπαρξη του αρνητικής πολικότητας RNA όπου εμφανίστηκε σε όλες τις θερμοκρασίες υποδεικνύοντας έτσι και την αντιγραφική ενεργότητα του ιού. Η αντίστροφη μεταγραφή για τον αρνητικής πολικότητας κλώνο πραγματοποιείται με τον ειδικό εκκινητή EntNS4-RT και η PCR στη συνέχεια με το εκκινητικό ζεύγος EntNS2-F/UC53-Flap. Στον τρίτο κύκλο πραγματοποιήθηκαν αδρανοποιήσεις για 30min στις θερμοκρασίες 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 78°C και 80°C. Τα δείγματα αυτά ενοφθαλμίστηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες και παρατηρήθηκε εμφάνιση CPE. Ακολούθησε Nested PCR με τα εκκινητικά ζεύγη UG52-Flap/UC53-Flap και ENV1/ENV2 και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Nested PCR όπου είδαμε εμφάνιση του θετικής πολικότητας κλώνου στα δείγματα 55°C, 60°C και 65°C. Τα δείγματα ελέγχθηκαν και με Real Time PCR με το εκκινητικό ζεύγος ENV1/ENV2. Από τα αποτελέσματα της Real Time συμπεραίνουμε πως στις υψηλές θερμοκρασίες αδρανοποίησης 78°C και 80°C υπάρχει αδρανοποίηση του ιού καθώς το Ct σε αυτές τις θερμοκρασίες εμφανίζεται πολύ κοντά στον τριακοστό πέμπτο κύκλο που είναι και το τέλος της αντίδρασης. Αντίθετα στις μικρότερες θερμοκρασίες όπως οι 50°C φαίνεται να μην αδρανοποιούν τον ιό καθώς το Ct τους είναι πολύ κοντά στον θετικό μάρτυρα (ενεργός ιός). Στις ενδιάμεσες θερμοκρασίες 60°C, 65°C, 70°C και 75°C παρατηρείται μερική αδρανοποίηση του ιού ο οποίος όμως σταδιακά ανάλογα με τη θερμοκρασία θέρμανσης καταφέρνει να ανακάμψει και να διεισδύσει στα κύτταρα ώστε να επάγει τον πολλαπλασιασμό του. Στις θερμοκρασίες αυτές το Ct της αντίδρασης αυξάνεται εφόσον ο ιός έχει χαμηλότερο ιικό τίτλο. Τέλος πραγματοποιήθηκε LAMP για τα παραπάνω δείγματα με τα εκκινητικά ζεύγη FIP/BIP και F3/B3. Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα της Real Time PCR. Για τα δείγματα Sabin1 [10⁶] TCID₅₀ παρατηρούμε έντονη εμφάνιση ζωνώσεων στο αδρανοποιημένο στους 55°C δείγμα αντίστοιχη με αυτή του θετικού μάρτυρα που είναι μη αδρανοποιημένος ιός Sabin1 [10⁶] TCID₅₀, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η θερμοκρασία αυτή δεν είναι κατάλληλη για την πλήρη αδρανοποίηση του ιού. Στους 60°C και 65°C παρατηρούμε λιγότερο έντονες ζωνώσεις που αποδεικνύουν ότι μέσω της αδρανοποίησης σε αυτές τις θερμοκρασίες ο ιικός τίτλος μειώνεται, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες 70°C, 75°C, 78°C και 80°C δεν παρατηρούμε ζωνώσεις γεγονός που αποδεικνύει είτε ότι ο ιικός τίτλος μειώθηκε πάρα πολύ λόγω της αδρανοποίησης, είτε ότι γίνεται πλήρης αδρανοποίηση του ιού σε αυτές τις θερμοκρασίες.

Η επιτυχία επαλήθευσης των αποτελεσμάτων με την τεχνική αντίστροφης μεταγραφής (RT)-Loop Mediated Isothermal Amplification την καθιστά προτιμότερη σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους PCR καθώς είναι πολύ πιο γρήγορη, σε μόλις 45min μπορούμε να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα, είναι απλή στη διεξαγωγή της, ειδική ως προς το στόχο μελέτης και οικονομική. Επιπλέον η τεχνική αυτή μπορεί να βρει εφαρμογή σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών, όπως για παράδειγμα σε βιομηχανίες ανάπτυξης εμβολίων όπου το ενδιαφέρον τους επικεντρώνεται στο κατά πόσο οι τεχνικές αδρανοποίησης που έχουν εφαρμοστεί στα διάφορα στελέχη έχουν επιτύχει.

E) Βιβλιογραφία

1. Agol V. I. (1997). Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology*, 8, 77-84.
2. Ambros, V., & Baltimore, D. (1980). Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem*, 255(14), 6739-6744.
3. Bhattacharya, S.S., Kulka, M., Lampel, K.A., Cebula, T.A. and Goswami, B.B. (2004) Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus. *Journal of virological methods* 116, 181-187.
4. Bienz K., Egger D, Pasamontes L., (1987) Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology*. 160:220–226.
5. Blondel B., Autret A., Brisac C., Martin-Latil S., Mousson L., Pelletier I., Estaquier J., Colbere-Garapin F. *Front Biosci* (2009) Apoptotic signaling cascades operating in poliovirus-infected cells. (Landmark Ed). Review Jan 1 , 14, 2181-92.
6. Brooks F. Geo, Carroll C. Karen, Butel S. Janet, Morse A. Stephen, Mietzner A. Timothy (2013). *General Steps in Viral Replication Cycles*. Jawetz Melnick & Adelbergs, Medical Microbiology Twenty-Sixth Edition, Chapter 29. The McGraw-Hill, 407-28.
7. Brown D.M., Cornell C.T., Tran G.P., Nguyen J.H.C, Semler B.L. (2005). An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol*. 79:11962-11973.
8. Caspar, D. L., & Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 27, 1-24.
9. Cho, M. W., Teterina, N., Egger, D., Bienz, K., & Ehrenfeld, E. (1994). Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology*, 202(1), 129-145.
10. Combelas, N., Holmblat, B., Joffret, M.L., Colbere-Garapin, F., Delpyroux, F. (2011). Recombination between poliovirus and coxsackie A viruses of species C: a model of viral genetic plasticity and emergence. *Viruses*, 3(8), 1460-1484.
11. Dedepsidis, E., Pliaka, V., Kyriakopoulou, Z., Brakoulis, C., Levidiotou-Stefanou, S., Pratti, A., et al. (2008). Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52(3), 343-351.
12. Domingo, E., & Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*, 51, 151-178.
13. Echeverri, A. C., & Dasgupta, A. (1995). Amino Terminal Regions of Poliovirus 2C Protein Mediate Membrane Binding. *Virology*, 208(2), 540-553.

14. Egger D., Bienz K. (2002). Recombination of poliovirus RNA proceeds in replication complexes originating from distinct replication starts. *J. Virol.*, 76(21), 10960-10971.
15. Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E., & Bienz, K. (2000). Formation of the Poliovirus Replication Complex Requires Coupled Viral Translation, Vesicle Production, and Viral RNA Synthesis. *J Virol*, 74(14), 6570-6580.
16. Ehrenfeld Ellie, Domingo Esteban, Roos P.Raymond (2010). The Picornaviruses. ASM Press.
17. Figlerowicz, M., Alejska, M., Kurzynska-Kokorniak, A., & Figlerowicz, M. (2003). Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med Res Rev*, 23(4), 488-518.
18. Flanagan, J. B., Petterson, R. F., Ambros, V., Hewlett, N. J., & Baltimore, D. (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(3), 961-965.
19. Fricks, C. E., & Hogle, J. M. (1990). Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol*, 64(5), 1934-1945.
20. Gamarnik, A. V., & Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev*, 12(15), 2293-2304.
21. Guillot, S., Caro, V., Cuervo, N., Korotkova, E., Combiescu, M., Persu, A., et al. (2000). Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J Virol*, 74(18), 8434-8443.
22. Iritani, N., Kaida, A., Abe, N., Kubo, H., Sekiguchi, J., Yamamoto, S.P., Goto, K., Tanaka, T. and Noda, M. (2014) Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. *Journal of medical virology* 86, 2019-2025.
23. Jacobson, S. J., Konings, D. A., & Sarnow, P. (1993). Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J. Virol*, 67(6), 2961-2971.
24. Kargar, M., Sadeghipour, S., Nategh, R. (2009). Environmental surveillance of non-polio enteroviruses in Iran. *J. Virol*, 6(149), doi: 10.1186/1743-422X-6-149.
25. Kew, O., De, L., Yang, C.F., et all. (1993) The role of virological surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. *Appl Virol Res*, 215-246.
26. Kew, O.M., Mulders, M.N., Lipskaya, G.Y., Silva, E., Patlansch, M.A. (1995). Molecular epidemiology of polioviruses. *Seminars in Virology*, Vol 6. New York: Academic Press, 401-414.
27. Khetsuriani N., Lamonte-Fowlkes A., Oberste M.S., Pallansch M.A. (2006) Enterovirus surveillance-United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ*, 55(8), 1-20.

28. Kirkegaard, K., Baltimore, D. (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell Press*, 47(3), 433-443
29. Kitamura, N., Semler, B. L., Rothberg, P. G., Larsen, G. R., Adler, C. J., Dorner, A. J., et al. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291(5816), 547-553.
30. Knipe D. M., and Howley P. M. (2007) *Fields Virology, 5th Edition Vol:1*, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 795-838.
31. Koike, S., Taya, C., Kurata, T., Abe, S., Ise, I., Yonekawa, H., et al. (1991). Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(3), 951-955.
32. Kopecka, H., Dubrou, S., Prevot, J., Marechal, J. and Lopez-Pila, J.M. (1993) Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Applied and environmental microbiology*, 59, 1213-1219.
33. Kottaridi, C., Bolanaki, E., Kyriakopoulou, Z., Dedepsidis, E., Pratti, A., & Markoulatos, P. (2007). Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58(4), 407-412.
34. Lee, H.K., Jeong, Y.S. (2004). Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl Environ Microbiol*, 70, 3632–3636.
35. Lee, Y. F., Nomoto, A., Detjen, B. M., & Wimmer, E. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(1), 59-63.
36. Li, Y., Pan, Z., Ji, Y., Peng, T., Archard, L.C. and Zhang, H. (2002) Enterovirus replication in valvular tissue from patients with chronic rheumatic heart disease. *European heart journal*, 23, 567-573.
37. Lipskaya G., Chervonskaya E.A., Belova G.I., et al. (1995) Geographical genotypes (geotypes) of poliovirus case isolates from the former Soviet Union: relatedness to other known poliovirus genotypes. *J Gen Virol*, 76, 1687-1699.
38. Lukashev, A. N., Lashkevich, V. A., Ivanova, O. E., Koroleva, G. A., Hinkkanen, A. E., & Ilonen, J. (2003). Recombination in Circulating Enteroviruses. *J Virol*, 77(19), 10423-10431.
39. Marjomäki Varpu, Turkki Paula, and Huttunen Moona. (2015). Infectious Entry Pathway of Enterovirus B Species. *Viruses*, 7(12), 6387–6399.
40. Martin Jensen Soe, Mikkel Rohde, Jens Mikkelsen, and Peter Warthoe (2013). IsoPCR: An Analytically Sensitive, Nested, Multiplex Nucleic Acid Amplification Method, *Clinical Chemistry*, 59(2), 436–439.
41. Melnick J. L. (1990). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackie viruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology*, Second Edition (ed. Fields B. N.), 549 – 605.
42. Mendelsohn, C. L., Wimmer, E., & Racaniello, V. R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56(5), 855-865.

43. Mulders M.N., Lipskaya G.Y., van der Avoort H.G., et al. (1995). Molecular epidemiology of wild poliovirus type 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J Infect Dis*, 171, 1399-1405.
44. Murray K. E., and Barton D. J. (2003). Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.*, 77(8), 4739–4750.
45. Nicholson, F., Meetoo, G., Aiyar, S., Banatvala, J.E. and Muir, P. (1994) Detection of enterovirus RNA in clinical samples by nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of enterovirus infection. *Journal of virological methods* 48, 155-166.
46. Nomoto, A., Detjen, B., Pozzatti, R., & Wimmer, E. (1977). The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature*, 268(5617), 208-213.
47. Novak, J. E., & Kirkegaard, K. (1991). Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J. Virol*, 65(6), 3384-3387.
48. Oberste, M. S., Maher, K., Williams, A. J., Dybdahl-Sissoko, N., Brown, B. A., Gookin, M. S., et al. (2006). Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol*, 87(Pt 1), 119-128.
49. Palacios, G., & Oberste, M. S. (2005). Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol*, 11(5), 424-433.
50. Pallansch, M., Oberste, S., & Whitton, L. (2013). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackie viruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (6th ed., pp. 490-530). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
51. Pallansch M.A., Roos R.P. (2001). Enteroviruses: polioviruses, coxsackie viruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields virology*, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Press, 723-775.
52. Paul, A. V., Rieder, E., Kim, D. W., van Boom, J. H., & Wimmer, E. (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J. Virol*, 74(22), 10359-10370.
53. Pettersson, R. F., Ambros, V., & Baltimore, D. (1978). Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol*, 27(2), 357-365.
54. Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer. (1999). Molecular Biology of poliovirus. Academic Press, *Encyclopedia of Virology*.
55. Pilipenko E. V., Gmyl A. P., Agol V. I. (1995). A model for rearrangements in RNA genomes. *Nuc. Ac. Res.*, 23(11), 1870-1875.

56. Racaniello, V.R. (2007). Picornaviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology* eds. Knipe, D.M. and Howley, P.M. pp.795-838. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
57. Racaniello, V. R., & Baltimore, D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*, 214(4523), 916-919.
58. Racaniello, V. R. (2013). Picornaviridae: The viruses and their replication. In B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (6th ed., pp. 452-489). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
59. Rajtar B., Majek M., Polański Ł., Polz-Dacewicz M. (2008). Enteroviruses in water environment-a potential threat to public health. *Ann Agric Environ Med*, 15, 199-203.
60. Rico-Hesse R., Pallansch M.A., Nottay B.K., et all, (1987). Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology*, 160, 311-322.
61. Rieder E., Paul A.V., Kim D.W., et all, (2000). Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J. Virol*, 74, 10371-10380.
62. Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Victorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., Agol V. I. (1986). The primery structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology*, 155, 202-213.
63. Rossmann M. G., He Y., Kuhn R. J. (2002). Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol*, 10(7), 324-331.
64. Rueckert, R. R., Dunker, A. K., & Stoltzfus, C. M. (1969). The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. *Proc Natl AcadSci USA*, 62(3), 912-919.
65. Sharma, R., Raychaudhuri, S. & Dasgupta, A. (2004). Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology*, 320, 195-205.
66. Shaukat Kahn, Xiaozhong Peng, Jiang Yin, Ping Zhang, Eckard Wimmer, (2008) *Journal of Virology*, 7167-7179.
67. Stanway G. (1990). Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol*, 71(11), 2483-2501.
68. Summers, D. F., & Maizel, J. V., Jr. (1968). Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 59(3), 966-971.
69. Todd, S., Towner, J. S., Brown, D. M., & Semler, B. L. (1997). Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol*, 71(11), 8868-8874.
70. Tsugunori Notomi, Yasuyoshi Mori, Norihiro Tomita, and Hidetoshi Kanda, (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects, Biochemical Research Laboratory, Research & Development Division, *Journal of Microbiology*, Vol. 53, No. 1, pp. 1-5.

71. Wimmer, E., Hellen, C. U., & Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet*, 27, 353-436.
72. Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L., Radu S. and Chee H.Y. (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of microorganisms, *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.
73. Xuzhi Zhanga, Stuart B. Loweb, John Justin Goodingb (2014). Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 491-499.
74. Yin, J., Paul, A. V., Wimmer, E., & Rieder, E. (2003). Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J Virol*, 77(9), 5152-5166.
75. Yogo, Y., Teng, M.-h., & Wimmer, E. (1974). Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res Commun*, 61(4), 1101-1109.
76. Zell R., Delwart E., Gorbalenya A.E., Hovi T., King A.M.Q., Knowles N.J., Lindberg A.M., Pallansch M.A., Palmenberg A.C., Reuter G., Simmonds P., Skern T., Stanway G., Yamashita T. and ICTV Report Consortium, (2017). [ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae](#), *Journal of General Virology*, 98: 242-2422.
77. Zheng D.P., Zhang L.B., Fang Z.Y., Yang C.F., Mulders M., Pallansch M.A., Kew O.M. (1993). Distribution of wild type 1 poliovirus genotypes in China. *J. Infect Dis*, 168, 1361-1367.