



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αριθ. Πρωτ. 149
Ημερομηνία 19-2-2010

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΙΛΤΡΩΝ
ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΛΥΜΑΤΑ**

ΚΟΥΡΚΟΥΜΕΛΗ ΧΑΡΙΤΩ

ΛΑΡΙΣΑ, 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

***ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΙΛΤΡΩΝ
ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΛΥΜΑΤΑ***

ΚΟΥΡΚΟΥΜΕΛΗ ΧΑΡΙΤΩ

ΛΑΡΙΣΑ, 2010



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 8175/1
Ημερ. Εισ.: 16-04-2010
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2010
ΚΟΥ

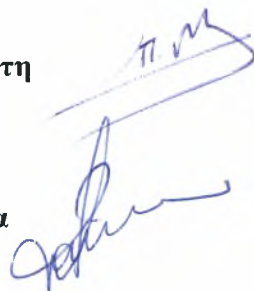
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087108

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- Παναγιώτης Μαρκουλάτος, Καθηγητής Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Δημήτρης Μόσιαλος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου καθώς επίσης και για την συμπαράσταση και την βοήθεια στις δυσκολίες που συνάντησα.

Ακόμη ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια Διδάκτορα κ. Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου για την καθοδήγηση και την βοήθεια της κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Ζήση Μαμούρη, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών και τον κ. Δημήτρη Μόσιαλο, Λέκτορα Βιοτεχνολογίας Μικροβίων.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά όλη την ομάδα του εργαστηρίου για τις πολύτιμες συμβουλές τους καθώς και τους προπτυχιακούς φοιτητές και συναδέλφους για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Ένα ευχαριστώ θα ήταν λίγο στην οικογένειά μου που στηρίζει τις επιλογές μου και πιστεύει σε εμένα όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
1. ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ	
1.1 Ταξινόμηση	6
1.2 Βιολογία των εντεροϊών.....	7
1.2.1 Δομή.....	7
1.2.1.1 Καψίδιο.....	7
1.2.1.2 Γονιδίωμα.....	9
1.2.1.3 5'-UTR.....	9
1.2.1.4 ORF.....	11
1.2.1.5 3'-UTR.....	15
1.2.2. Κύκλος ζωής.....	15
1.2.2.1. Υποδοχείς των εντεροϊών.....	18
1.2.2.2. Μετάφραση.....	19
1.2.2.3. Αντιγραφή.....	21
1.3. Κλινικές εκδηλώσεις.....	22
1.4. Παθογένεια	24
1.5. Επιδημιολογία.....	27
2. ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	
2.1 Εντεροϊοί στο υδάτινο περιβάλλον.....	29
2.1.1 Ιοί εντερικής προέλευσης στα λύματα.....	30
2.1.2 Λοιμώξεις από ιούς εντερικής προέλευσης.....	31
2.2 Η σπουδαιότητα του περιβαλλοντικού ελέγχου.....	33
2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη επιβίωση των εντεροϊών στο περιβάλλον...34	
2.4 Απομόνωση ιών εντερικής προέλευση.....	37
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	
3.1 Σκοπός της μελέτης	41
3.2 Περιβαλλοντικά δείγματα	41
3.3 Συγκέντρωση περιβαλλοντικών δειγμάτων.....	43
3.3.1 Μέθοδος προσρόφησης-έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα.....	43
3.3.2 Μέθοδος καθίζησης με PEG.....	44
3.4 Εκχύλιση RNA.....	44
3.5 Αντίστροφη Μεταγραφή.....	44
3.6 Εκκνητικά Μόρια.....	45
3.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	46
3.7.1 PCR.....	46
3.7.2 semi-nested PCR.....	46
3.8 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR.....	47
3.9 Αποτελέσματα.....	48
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.

Οι εντεροϊοί είναι το σημαντικότερο γένος της οικογένειας των *Picornaviridae* ιών. Η είσοδος τους στον ανθρώπινο οργανισμό γίνεται δια της στοματικής οδού και ο πολλαπλασιασμός τους στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και του εντέρου. Εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων και είναι δυνατόν να ανιχνευθούν σε λύματα καθώς και σε υδάτινες μάζες ποταμών, θαλασσών και λιμνών, με κίνδυνο την επάνοδό τους στην τροφική αλυσίδα (Griffin et al., 2003).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν για τον εντοπισμό εντεροϊών 22 περιβαλλοντικά δείγματα που προέρχονται από κέντρα επεξεργασίας λυμάτων της Λάρισας, των Τρικάλων και των Ιωαννίνων.

Η μελέτη βασίστηκε στη χρήση ηλεκτραρνητικών φίλτρων και στις μεθόδους RT-PCR. Σε επτά από αυτά τα δείγματα εντοπίστηκαν εντεροϊοί.

Η συγκεκριμένη εργασία ενισχύει την αναγκαιότητα ελέγχου των περιβαλλοντικών δειγμάτων για εντεροϊούς.

1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.1 Ταξινόμηση

Οι εντεροϊοί είναι το σημαντικότερο γένος της οικογένειας των *Picornaviridae* ιών ως προς την ανθρώπινη παθογένεια. Η οικογένεια αυτή έχει πάρει το όνομά της από την λέξη Pico (που σημαίνει, μικρό) και από το gna, όπου γίνεται αναφορά για το γενετικό υλικό τους. Οι ιοί αυτής της οικογένειας δεν φέρουν έλυτρο στη δομή τους και το RNA γενετικό τους υλικό είναι θετικής πολικότητας.

Η ταξινόμηση των Picorna ιών σε γένη έχει γίνει με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αυτών, δηλαδή σύμφωνα με τη σταθερότητα του καψιδίου τους, τη βέλτιστη θερμοκρασία πολλαπλασιασμού, του pH του περιβάλλοντος, τον εκάστοτε ξενιστή και όργανο αυτού που προσβάλλουν, καθώς και από την ομοιότητα της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας. Έτσι κατατάσσονται σε εννέα γένη : i)τους εντεροϊούς (enteroviruses), ii)τους ιούς της Ηπατίτιδας Α (hepatoviruses), iii)τους καρδιοϊούς (cardio viruses), iv)τους kobuviruses, v)τους teschoviruses, vi)τους ιούς Β της ρινίτιδας των ιπποειδών (equine rhinitis B viruses – Erboviruses), vii)τους αφθοϊούς (aphthovirus), viii)τους parecho-ιοούς (par echoviruses) και ix)τους ρινοϊούς (rhinoviruses), (Fields Virology, 5th, 2007).

Αρχικά το γένος των Εντεροϊών χωρίστηκε σε τέσσερις κατηγορίες : i)τους πολιοϊούς (PV1-3), ii)τους coxsackie Α ιούς (CAV), iii)τους coxsackie Β ιούς (CBV) και iv)τους echo-ιοούς (Melnick J.L., 1996). Το 2000, ύστερα από σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των εντεροϊών, προέκυψε ένα σύστημα ταξινόμησης, με βάση το οποίο οι εντεροϊοί, που προσβάλλουν τον άνθρωπο, διαχωρίζονται σε πέντε ομάδες: i)τους πολιοϊούς που περιλαμβάνουν τους PV1-3, ii)τους ανθρώπινους εντεροϊούς Α (HEV-A), στους οποίους ανήκουν οι CAV2-8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16, EV71, iii)τους ανθρώπινους εντεροϊούς Β (HEV-B), που ανήκουν οι CAV9, CBV1-6, E1-7, E9, E11-21, E24-27, E29-33, EV69, EV73, iv)τους ανθρώπινους εντεροϊούς C (HEV-C), που ανήκουν οι CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17-22, CAV24 και v)τους ανθρώπινους εντεροϊούς D (HEV-D), όπου ανήκουν οι EV68 και EV70 (King et al., 2000).

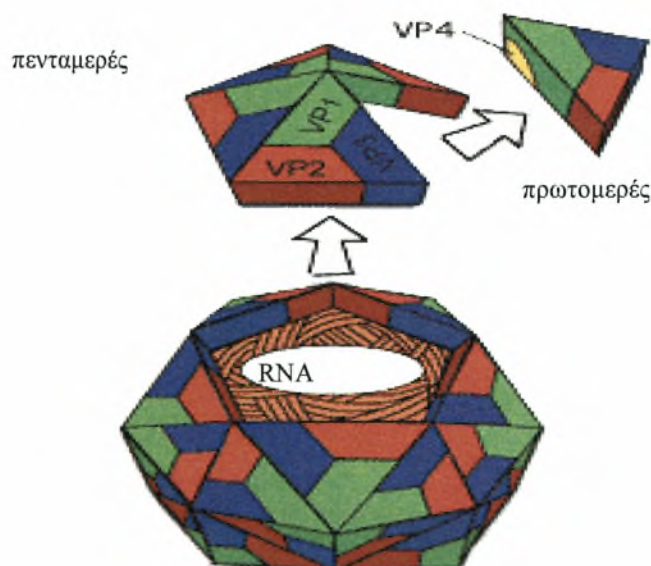
Ωστόσο, το παρόν σύστημα ταξινόμησης θα πρέπει να αναθεωρηθεί, καθώς πολλοί προτείνουν πως η στενή γενετική συγγένεια μεταξύ των πολιοϊών και μελών του είδους HEV-C δείχνει ότι αυτοί θα έπρεπε να αποτελούν ένα μόνο είδος (Brown et al 2003).

1.2 Βιολογία των εντεροϊών

1.2.1 Δομή

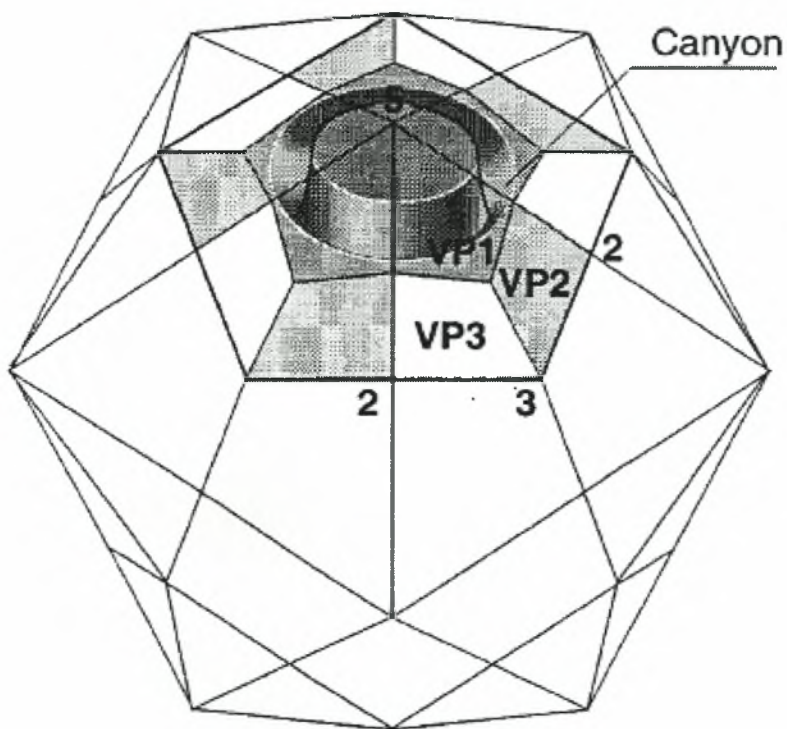
1.2.1.1 Καψίδιο

Τα μέλη του γένους των εντεροϊών χαρακτηρίζονται από ένα μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικό καψίδιο διπλής, τριπλής και πενταπλής συμμετρίας, διαμέτρου περίπου 30nm, το οποίο αποτελείται από 60 αντίγραφα 4 πρωτεϊνών, των VP1, VP2, VP3 και VP4 (Rueckert R.R., 1985). Το ώριμο καψίδιο αποτελείται από τα πρωτομερή, τα οποία απαρτίζονται από αντίγραφα των VP1 και VP3 πρωτεϊνών καθώς και από μια πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 στην οποία οι VP4 και VP2 είναι ομοιοπολικώς συνδεδεμένες και αποτελούν τη βασική δομική μονάδα του καψιδίου. Πέντε πρωτομερή ενώνονται για να σχηματίσουν ένα πενταμερές και 12 πενταμερή ενώνονται για τον σχηματισμό του ώριμου πλέον καψιδίου. Στο τελευταίο στάδιο της σταθεροποίησης του ώριμου ιού, γίνεται η διάσπαση της VP0 στις VP4 και VP2. Οι VP1, VP2 και VP3 σχηματίζουν το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου, ενώ η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου (Stanway G., 1990) (Εικ.1.1).



Εικόνα 1.1 Η δομή του ιϊκού καψιδίου. Παρουσιάζεται η δομή του πρωτομερούς και του πενταμερούς.

Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις του ιού. Αντίθετα, 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. Μία βαθιά επιφανειακή κοιλότητα που είναι γνωστή ως αύλακα (canyon) περιβάλλει μία προεξοχή σχήματος αστεριού στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας. Αυτή η αύλακα αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό του υποδοχέα (Blondel et al. 1998) (Εικόνα 1.2).

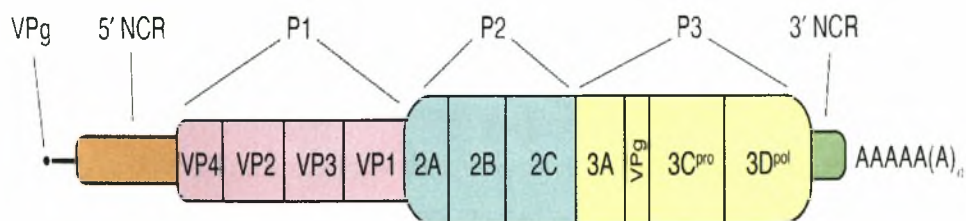


Εικόνα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου των πολιοϊών. Είναι εμφανής οι 2X, 3X και 5X άξονες συμμετρίας και οι θέσεις των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 ενός πρωτομερούς. Επίσης φαίνεται η αύλακα (canyon) η οποία περιβάλλει τον 5X άξονα συμμετρίας (Από Blondel et al. 1998).

1.2.1.2 Γονιδίωμα

Το καψίδιο των *ricorna* ιών εσωκλείει ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας που στους εντεροϊούς έχει μήκος περίπου 7500 νουκλεοτίδια (Melnick J.L., 1990). Το νουκλεοτίδιο στο 5'-άκρο του γενετικού υλικού συνδέεται ομοιοπολικά με μια μικρή κωδικοποιούμενη από τον ιό πρωτεΐνη, την VPg, η οποία πιστεύεται ότι συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και στον εγκλεισμό του γενώματος στο καψίδιο (Nomoto et.al., 1977).

Το τμήμα του γενετικού υλικού προς το 5'-άκρο περιλαμβάνει την 5'-μη μεταφραζόμενη περιοχή (5'-NTR, ή 5'-NCR, ή 5'-UTR, ή 5'-Μη κωδική περιοχή). Ακολουθεί το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) το οποίο περιέχει τις πληροφορίες για τις τέσσερις δομικές (VP1-VP4) και τις επτά λειτουργικές (2A-2C και 3A-3D) πρωτεΐνες του ιού και εκτείνεται σε μήκος περίπου 2100 κωδικονίων. Στο άκρο του γενώματος, υπάρχει μια 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή που καταλήγει σε μια πολυαδενυλιωμένη ουρά.



Εικόνα 1.3 Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γενετικού υλικού των εντεροϊών. Η κωδική περιοχή χωρίζεται σε τρία τμήματα, τα P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού.

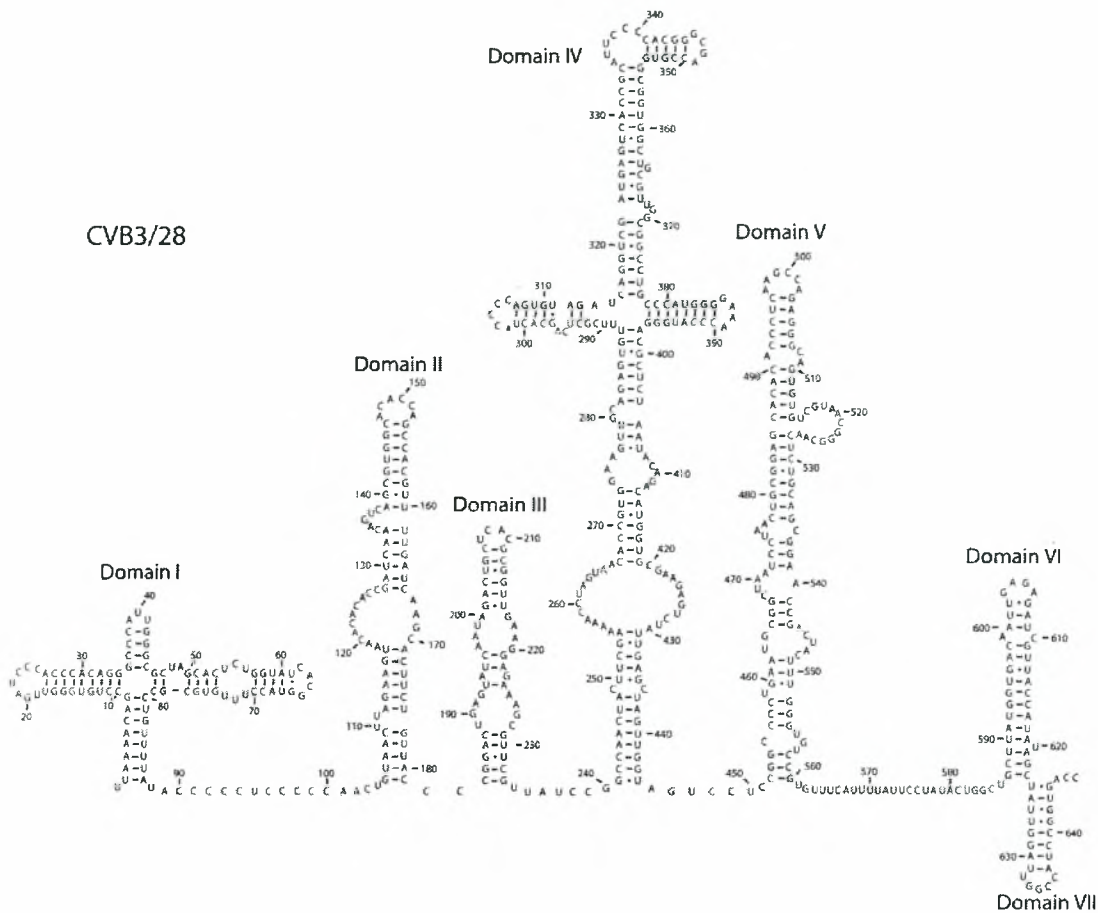
1.2.1.3 5'-UTR

Η 5'-UTR αποτελεί το 8-12% του γενώματος των *ricorna* ιών και παρουσιάζεται μεγάλη ομοιότητα στη νουκλεοτιδική αλληλουχία της 5'-μη κωδικής περιοχής μεταξύ των κοντινών φυλογενετικά ιών (Stanway et al., 1984). Ένα άλλο χαρακτηριστικό των

εντεροϊών και όλων των *picorna* ιών είναι ότι η σύνθεση της 5'-μη μεταφραζόμενης περιοχής περιέχει ένα σημαντικό υψηλότερο ποσοστό σε αζωτούχες βάσεις όπως τη γουανίνη και κυτοσίνη σε σύγκριση με το υπόλοιπο γένωμα. Η μεγάλη αυτή περιεκτικότητα στις συγκεκριμένες αζωτούχες βάσεις αντικατοπτρίζει την πιθανή ύπαρξη δευτεροταγούς δομής, η οποία ίσως διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της 5'-UTR (Palmenberg A.C., 1987, Siafakas et al, 2002).

Η 5'-Μη κωδική περιοχή των εντεροϊών περιέχει σημαντικά στοιχεία τα οποία συμμετέχουν στην αντιγραφή, μετάφραση και μολυσματικότητα των ιών αυτών. Το μέγεθος της είναι περίπου 750 νουκλεοτίδια. Τα πρώτα 88 νουκλεοτίδια σχηματίζουν μια δομή σχήματος τριφυλλιού (cloverleaf), ενώ τα νουκλεοτίδια 127 έως 608 αναδιπλώνονται σχηματίζοντας ένα στοιχείο IRES το οποίο είναι η περιοχή πρόσδεσης των ριβοσωμάτων και είναι υπεύθυνο για την μετάφραση του γενώματος του ιού όπως και για την μολυσματικότητά του (Wimmer et al., 1993).

Ένα συγκεκριμένο μοντέλο αναδίπλωσης της 5' μη κωδικής περιοχής είναι αυτό του CBV3 (Εικ.1.4), όπου παρουσιάζονται επτά δομικές περιοχές (domain I-VI) (Zell et al., 1997). Οι δομικές περιοχές II μέχρι VI αποτελούν το στοιχείο IRES των εντεροϊών. Η δομική περιοχή I αποτελεί μια δομή σχήματος τριφυλλιού η οποία είναι σημαντική για τη σταθερότητα του RNA και για την έναρξη της αντιγραφής του θετικής πολικότητας κλώνου (Melchers et. al, 2006). Αυτή η δομή είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των εντεροϊών και των ρινοϊών ενώ περιέχει τέσσερις περιοχές: τις A, B, C και D. Στην περιοχή B συνδέονται οι κυτταρικές πρωτεΐνες PCBP (poly (rC)-binding proteins), ενώ η περιοχή D, αναγνωρίζεται από την ιϊκή πρωτεΐνη 3C που είναι μια πρωτεάση ή πιο πιθανά από την πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD. Το σύμπλεγμα μεταξύ του 5'-άκρου-PCBP-3CD θεωρείται ότι περιλαμβάνει έναν διακόπτη για το αν το ιικό αυτό RNA θα χρησιμοποιηθεί σαν mRNA κατά την μετάφρασή ή αν θα χρησιμοποιηθεί για την αντιγραφή του ιού.



Εικόνα 1.4 Δευτεροταγής δομή της 5'-UTR του CBV3

1.2.1.4 ORF

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) μεταφράζεται σε μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη, η οποία με τη διαδικασία της πρωτεόλυσης, οδηγείται στην παραγωγή των διαφόρων ιικών πρωτεϊνών (πρωτεΐνες καψιδίου, RNA πολυμεράση, πρωτεάσες, πρωτεΐνες για την σύνθεση του RNA, κ.α.). Η πρωτεόλυση πραγματοποιείται από δύο κύριες ιικές πρωτεΐνες: την 2Argo, που κόβει μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου της VP1 και του δικού της αμινοτελικού άκρου, ξεχωρίζοντας έτσι τις δομικές από τις μη δομικές πρωτεΐνες και την πρωτεάση 3C ή την πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD που πραγματοποιεί την υπόλοιπη επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης (Baxter et al., 2006).

Δομικές πρωτεΐνες αποτελούν οι VP1, VP2, VP3 και VP4 οι οποίες κωδικοποιούνται από το 5' άκρο του ORF. Οι VP1, VP2 και VP3 έχουν παρόμοιο μέγεθος (200-300 αμινοξέα) σε διαφορετικούς picorna ιούς ενώ η VP4 είναι σημαντικά μικρότερη σε

μήκος (68-85 αμινοξέα σε όλα τα γένη των *picorna* ιών εκτός από αυτή των ιών της ηπατίτιδας A) (Stanway G., 1990).

Λειτουργικές πρωτεΐνες αποτελούν οι 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D, ενώ σε πολλές περιπτώσεις απαιτούνται πρόδρομα μόρια αυτών (όπως για παράδειγμα η πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD). Οι πρωτεΐνες αυτές κωδικοποιούνται από το 3' άκρο του ORF. Συγκρίσεις μεταξύ των μη λειτουργικών πρωτεϊνών διαφόρων *picorna* ιών δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές διατηρούνται φυλογενετικά περισσότερο απ' ό,τι οι καψιδικές πρωτεΐνες. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την έλλειψη εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών που προσβάλλονται από τους πολιοϊούς προς αυτές τις πρωτεΐνες καθώς επίσης και από την ανάγκη διατήρησης των ενζυμικών ενεργών κέντρων για την λειτουργική σταθερότητα του ιού.

Μη-δομική πρωτεΐνη	Λειτουργία
2 ^A	Πρωτεάση: Πραγματοποιεί το πρωταρχικό πρωτεολυτικό ρήγμα στην πολυπρωτεΐνη
2B	Όπως και η πρόδρομη 2BC εμποδίζουν την μεταφορά πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το σύστημα Golgi και αυξάνει την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Barco et al., 1995)
2C	Ελικάση
3A	Αναστέλλει την μεταφορά πρωτεϊνών από το ΕΔ στο Golgi, με αποτέλεσμα να μειώνει τις εκκρίσεις (Wessels et al., 2005)
3B	VRg: Συμμετέχει στην έναρξη της αντιγραφής του γενώματος του ιού
3C	Πρωτεάση κυστεΐνης: Διεξάγει την πλειοψηφία των πρωτεολυτικών διασπάσεων
3D	Ιική RNA πολυμεράση: Αντιγράφει το γένωμα του ιού

Πίνακας 1.1 Μη-δομικές πρωτεΐνες των εντεροϊών

Η λειτουργική πρωτεΐνη 2A είναι μια πρωτεάση που πραγματοποιεί το πρωταρχικό ρήγμα στην πολυπρωτεΐνη. Το ρήγμα αυτό πραγματοποιείται στο δικό της αμινικό

άκρο, διαχωρίζοντας έτσι τις πρόδρομες πρωτεΐνες του καψιδίου από αυτές των λειτουργικών πρωτεϊνών (Toyoda et al., 1986).

Η 2B και η πρόδρομος αυτής 2BC εμποδίζουν την μεταφορά πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το σύστημα Golgi και αυξάνει την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Barco A. and Carrasco L., 1995).

Η 2C πρωτεΐνη εμπλέκεται στην σύνθεση του RNA στους πολιοϊούς και είναι σε υψηλό βαθμό διατηρημένη μεταξύ διαφορετικών ειδών. Η συμβολή της στην σύνθεση του RNA έχει αποδειχθεί, καθώς μεταλλάξεις στην γενετική περιοχή που αντιστοιχεί σε αυτήν την πρωτεΐνη οδηγούν σε μη αποτελεσματική σύνθεση του ιϊκού RNA (Li J. P. and Baltimore D., 1988). Φαίνεται να έχει δραστηριότητα ATPάσης που είναι απαραίτητη κατά την διαδικασία του πολλαπλασιασμού του ιϊκού γονιδιώματος (Pfister T. and Wimmer E., 1999). Η 2C^{pro} όπως και αντίστοιχες άλλων RNA ιών πρωτεΐνες, έχει μοτίβα ολιγοπεπτιδίων που ανήκουν σε μια υπερ-οικογένεια πρωτεϊνών με λειτουργίες ελικάσης (Gorbalenya et al., 1989), όμως δεν έχει αποδειχθεί ακόμα τέτοιου είδους ικανότητα.

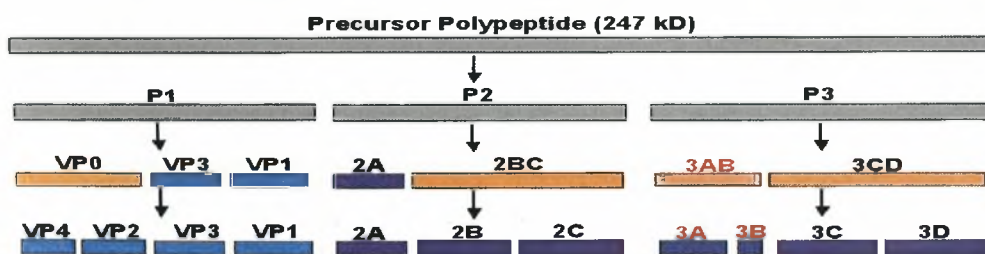
Η 3A σε συνεργασία με τις 2B και 2BC, εμποδίζει την μεταφορά των πρωτεϊνών του κυττάρου ξενιστή από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi, με αποτέλεσμα να μειώνει τις εκκρίσεις (Wessels et al., 2005).

Η 3B κωδικοποιεί μια μικρή πρωτεΐνη αποτελούμενη από 23 αμινοξέα περίπου, την VPg. Η VPg φαίνεται να παίρνει μέρος στην διαδικασία συγκρότησης του ιϊκού καψιδίου καθώς και στην αντιγραφή του RNA, πιθανώς παίζοντας το ρόλο εκκινητικού μορίου (Paul et al., 1998).

Η 3C πρωτεΐνη διεξάγει την πλειοψηφία των πρωτεολυτικών διασπάσεων. Πρόκειται για μια πρωτεάση κυστεΐνης, η οποία φαίνεται να προκαλεί διάσπαση στον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ των αμινοξέων Gln-Gly (Stanway G., 1990). Η 3C πρωτεΐνη φαίνεται να έχει επιπρόσθετες λειτουργίες στην επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης έχοντας μια άμεση σχέση με το RNA του ιού. Μελέτες έχουν δείξει ότι επιδράσεις μεταλλάξεων κοντά στο 5' άκρο του RNA των πολιοϊών, που οδηγούν σε ελαττωματική σύνθεση RNA, μπορούν να αναστραφούν μέσω μεταλλάξεων στην 3C (Andino et al., 1990). Μια άλλη ιδιότητα της 3C είναι η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου ξενιστή,

απενεργοποιώντας τον μεταγραφικό παράγοντα TFIIC, ο οποίος απαιτείται για την σύνθεση tRNA (Clark M.E. and Dasgupta A., 1990) καθώς επίσης κόβει και την πρωτεΐνη που συνδέεται στο TATA box (TATA box binding protein, TBP) στην ειδική θέση Gln-Gly (Das S. and Dasgupta A., 1993).

Η 3D^{pol} είναι η RNA πολυμεράση των picorna ιών. Η 3D^{pol} είναι το κύριο ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός κατά την αντιγραφή του. Σε πειράματα *in vitro* έχει δειχθεί ότι η 3D^{pol} έχει 4 διαφορετικές δράσεις: κατ' αρχήν μπορεί να συνθέτει RNA χρησιμοποιώντας σαν εκκινητικό μόριο την VPg πρωτεΐνη, έχει την ικανότητα να παράγει θετικής και αρνητικής πολικότητας RNA, έχει δραστηριότητα ελικάσης, ξεδιπλώνοντας τα σημεία όπου το RNA έχει δημιουργήσει διπλή έλικα κατά το στάδιο επιμήκυνσης της αντιγραφής και τέλος, είναι ικανή να προσθέτει την αδενυλιωμένη ουρά στο 3' άκρο του RNA και να συμβάλει έτσι στην ολοκλήρωση της σύνθεσης του θετικής πολικότητας ιϊκού RNA (Pfister et al., 1999).



Εικόνα 1.5 Το πρόδρομο πολυπεπτιδίου της μετάφρασης του ιϊκού γενώματος και τα προϊόντα της πρωτεόλυσής του. Α) Πρώτη διάσπαση του πρόδρομου πολυπεπτιδίου σε δύο διακριτές περιοχές, σε αυτή των δομικών (P1) και σε αυτή των λειτουργικών (P2 και P3) πρωτεϊνών. Β) Πρωτεολυτική διάσπαση των πρώιμων πολυπεπτιδίων P1, P2 και P3. Γ) Τα τελικά προϊόντα της διεργασίας της πρωτεόλυσης με 4 δομικές και 7 λειτουργικές πρωτεΐνες.

1.2.1.5 3'-UTR

Η 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή των εντεροϊών είναι το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου και είναι απαραίτητη για την φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA (Oberste et al., 2006). Ενώ η αλληλουχία της 3'-UTR ποικίλει μεταξύ των διαφόρων στελεχών των εντεροϊών, η ύπαρξη πολύ συντηρημένων δευτεροταγών δομών υποδηλώνει ότι αυτές οι δομές είναι λειτουργικές μονάδες που εμπλέκονται στην αντιγραφή. Οι προβλεπόμενες δευτεροταγής δομές περιλαμβάνουν τρεις θηλιές που ονομάζονται X, Y, Z στα στελέχη που ανήκουν στους HEV-A και HEV-B και δύο θηλιές (X και Y) στους HEV-C και HEV-D. Οι X και Y σχηματίζουν μια τεταρτοταγή δομή όπου υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των νουκλεοτιδίων που βρίσκονται στις θηλιές αυτές. Η δομική περιοχή Z είναι προφανώς διαθέσιμη για την αντιγραφή σε καλλιέργειες αλλά μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεια του ιού *in vivo*. Αυτές οι δομές στην 3'-NTR θεωρείται ότι συνδέονται με ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του ιού. Τέλος, η διατήρησή τους φυλογενετικά μεταξύ των ειδών στηρίζει την αξία τους στον κύκλο ζωής των ιών αυτών.

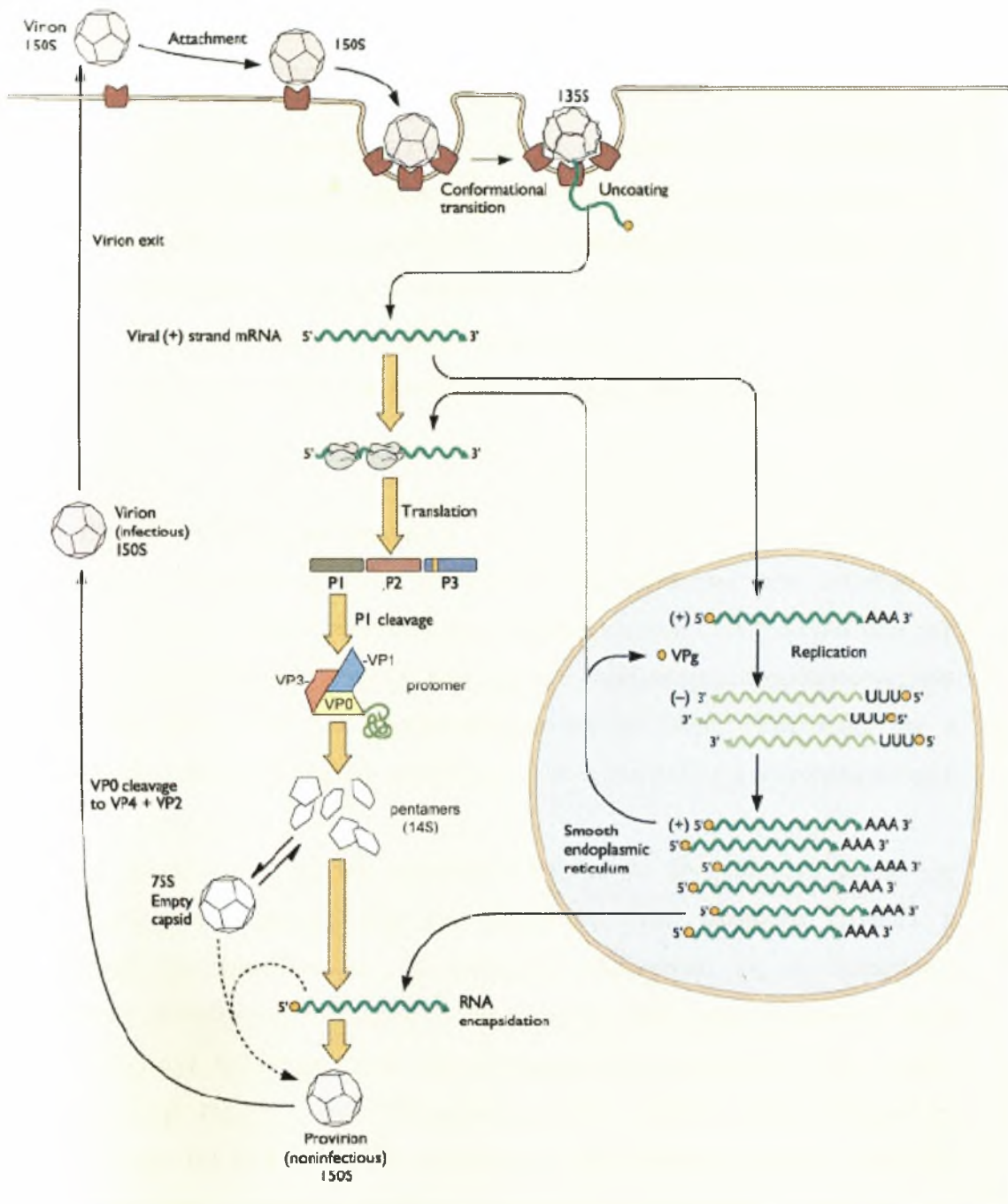
1.2.2 Κύκλος Ζωής

Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών αρχίζει με την προσκόλληση του καψιδίου στους κατάλληλους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή. Η είσοδος του ιικού γενώματος στο κύτταρο ξενιστή συμβαίνει πιθανόν μέσω ενδοκύττωσης.

Το ιικό RNA αμέσως μεταφράζεται σε μία πολυπρωτεΐνη η οποία υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από τις ιικές πρωτεάσες, ώστε να παραχθούν οι δομικές και μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού (Hellen et al., 1991).

Μετά την μετάφραση του ιικού γενώματος ξεκινάει η αντιγραφή του. Το πρώτο στάδιο της αντιγραφής είναι η δημιουργία του αρνητικού κλώνου ο οποίος χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την σύνθεση του θετικού κλώνου. Στη συνέχεια ακολουθεί ο εγκλεισμός του γενετικού υλικού σε πρώιμη μορφή ιϊκού σωματιδίου το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3. Όταν πραγματοποιηθεί ο εγκλεισμός αυτός του γενώματος, η VP0 διασπάται στις VP2 και VP4, δίνοντας πλέον ένα ώριμο ιϊκό σωματίδιο.

Κατά την διάρκεια της μόλυνσης, η πρωτεϊνοσύνθεση του κυττάρου-ξενιστή εμποδίζεται από την πρωτεάση 2A, η οποία προκαλεί ρήγμα σε ένα από τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης του γενετικού υλικού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, μόνο οι ιϊκές πρωτεΐνες να συνθέτονται από το προσβεβλημένο κύτταρο, το οποίο τελικά καταστρέφεται απελευθερώνοντας τους ιούς.



Εικόνα 1.6 Ο κύκλος της ζωής του πολιοϊού (φωτογραφία από το άρθρο {POLIOVIRUS CELL ENTRY: Common Structural Themes in Viral Cell Entry Pathways} του James M. Hogle, 2002).

1.2.2.1 Υποδοχείς εντεροϊών

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα για να μπορέσει ο ιός να ξεκινήσει τον παθογόνο κύκλο του θα πρέπει αρχικά να αναγνωριστεί ως πρόσδεμα (ligand) από κάποιο υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή. Με τη πρόσδεσή του στον υποδοχέα, ο ιός μπορεί να απελευθερώσει τώρα το γενετικό υλικό του στο ενδοκυττάριο περιβάλλον του ξενιστή και έτσι να έχουμε την έναρξη του κύκλου.

Στην περίπτωση των εντεροϊών, οι κυτταρικοί υποδοχείς που στον άνθρωπο είναι οι εξής:

Ο υποδοχέας PVR (Poliovirus Receptor)

Ο υποδοχέας PVR χρησιμοποιείται από όλους τους ορότυπους των πολιοϊών. Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Αποτελείται από ένα εξωκυτταρικό τμήμα που περιέχει τρεις περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μια κυτταροπλασματική απόληξη. Πιστεύεται ότι ο κυτταρικός ρόλος του PVR είναι η αναγνώριση και η συγκόλληση κυττάρων μεταξύ τους.

Οι πολιοϊοί προσδένονται με τον υποδοχέα PVR με τη βοήθεια μιας δομής του καψιδίου τους, της αύλακας. Με την πρόσδεση στον υποδοχέα αλλάζει η στερεοδιάταξη του καψιδίου και τα ισοωμάτια (καλούνται ως A σωματίδια) παρουσιάζουν συντελεστή καθίζησης 135S (έναντι 160S των ανέπαφων ικών σωματιδίων). Κατά τον σχηματισμό των A σωματιδίων η πρωτεΐνη VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 κινούνται εξωτερικά του καψιδίου. Στη συνέχεια το αμινοτελικό άκρο της VP1 και η VP4 δημιουργούν μία ελικοειδής δομή, η οποία θα δώσει τη δυνατότητα διάνοιξης καναλιού διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή έτσι ώστε να ξεκινήσει η είσοδος του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα του (Simon K. Tsang 2001).

Ο υποδοχέας ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule)

Ο υποδοχέας ICAM-1 χρησιμοποιείται από την πλειοψηφία των ρινοϊών καθώς και από τους Coxsackie A (Greve J.M. et al, 1989). Ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών και η θέση σύνδεσής του με τον ιό, βρίσκεται στο αμινοτελικό του

άκρο. Πιστεύεται ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα και της αύλακας του καψιδίου του ιού (Olson N.H. et al, 1993) .

Ο υποδοχέας DAF (Decay Accelerating Factor)

Ο υποδοχέας DAF εμπλέκεται στην προσκόλληση του CAV21 (Shafren D.R., 1997) και των echo 7,13,21,29 και 33 στην επιφάνεια του κυττάρου. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης που αποτελείται από τέσσερις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και από ένα τμήμα πλούσιο σε σερίνη και θρεονίνη. Ο CAV21 συνδέεται στην πρώτη από τις τέσσερις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, ενώ ο echo 7 απαιτεί την δεύτερη, τρίτη και τέταρτη επαναλαμβανόμενη αλληλουχία για την προσκόλλησή του (Ward T. et al., 1994).

Οι ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες $\alpha\beta_3$ χρησιμοποιούνται από τον CAV9 για να συνδεθούν στην κυτταρική επιφάνεια. Ο ιός συνδέεται με τον υποδοχέα μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης VP1.

Οι ιντεγκρίνες $\alpha_2\beta_1$ χρησιμοποιούνται από τον EV1 για την είσοδό του στο κύτταρο. Συγκεκριμένα, προσκολλάται εντός του τμήματος α_2 .

Ο υποδοχέας CAR (Coxsackievirus-Adenovirus Receptor)

Ο υποδοχέας CAR χρησιμοποιείται από τους Coxsackie B και τους αδενοϊούς (Marples J.E., 1985). Η ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων έδειξε ότι ανήκει στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών, όμως η κυτταρική του λειτουργία παραμένει ακόμα άγνωστη.

Μετάφραση

Μετά την είσοδο του ιού στο κυτταρόπλασμα, το θετικής πολικότητας RNA του ιού δρα ως mRNA, το οποίο μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη. Ωστόσο, οι εντεροϊοί στερούνται κάποιων βασικών στοιχείων τα οποία συναντώνται σε όλα τα κυτταρικά mRNA. Τα κυτταρικά mRNA περιέχουν στο 5' άκρο τους μια μεθυλιωμένη καλύπτρα,

γνωστή ως cap και στο 3' άκρο τους μια πολυαδενυλιωμένη ουρά. Η έναρξη της μετάφρασης εξαρτάται από την αναγνώριση της καλύπτρας από έναν ειδικό παράγοντα έναρξης, τον eIF4E ο οποίος προσδένεται σε αυτή. Στη συνέχεια προσδένονται οι παράγοντες eIF4A και eIF4G. Ο eIF4A είναι μια ελικάση που αποδιατάσσει την δευτεροταγή δομή που υπάρχει στις πρώτες δεκαπέντε βάσεις του mRNA. Στη συνέχεια προσδένονται στη ριβοσωμική υπομονάδα 40S οι παράγοντες eIF2 και eIF3, σχηματίζοντας το σύμπλοκο 43S. Το σύμπλοκο αυτό σαρώνει το mRNA μέχρι να εντοπίσει το κωδικόνιο έναρξης AUG, όπου και δημιουργείται το σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης. Παρατηρείται ότι είναι απαραίτητη η παρουσία της καλύπτρας στο 5' άκρο σχεδόν όλων των mRNA ώστε να είναι δυνατή η μετάφρασή τους. Η μόνη εξαίρεση σε αυτόν τον κανόνα απαντάται στο mRNA των εντεροϊών που δεν έχει καλύπτρα.

Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν ένα εναλλακτικό τρόπο έναρξης της μετάφρασης, στον οποίο η υπομονάδα 40S συνδέεται άμεσα με μια εσωτερική θέση που ονομάζεται εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος (IRES, Internal Ribosome Entry Site). Με αυτό τον τρόπο παρακάμπτεται τελείως οποιοδήποτε κωδικόνιο AUG μπορεί να βρίσκεται στη μη μεταφραζόμενη περιοχή (Genes VIII, Benjamin Lewin).

Για την έναρξη της μετάφρασης είναι απαραίτητοι όλοι οι παράγοντες έναρξης των ευκαρυωτικών κυττάρων, με εξαίρεση την πρωτεΐνη eIF4E, η οποία προσδένεται στην καλύπτρα (Ochs K. et al., 2002). Εκτός όμως από τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης που προαναφέρθηκαν, στο IRES στοιχείο των εντεροϊών προσδένονται επιπλέον πρωτεΐνες του κυττάρου-ξενιστή, που προάγουν την μετάφραση ή διαμορφώνουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιϊκού RNA, όπως η πρωτεΐνη των 57kDa που προσδένεται στην πολυπυριμιδική περιοχή PTB (Polypyrimidine Tract-Binding protein), η πρωτεΐνη La των 52kDa (La auto antigen), η poly(rC) πρωτεΐνη PCBP (Poly(rC) Binding Protein) των 39 kDa και η Unr (Upstream of N-Ras) (Murray et al, 2001; Costa-Mattioli et al, 2004; Boussadia et al., 2003).

Ο ρόλος του IRES στοιχείου είναι ιδιαίτερα σημαντικός κατά τον κύκλο μόλυνσης του ιού επειδή ο ιός εμποδίζει την πρωτεϊνοσύνθεση του ξενιστή καταστρέφοντας τη δομή της καλύπτρας και αναστέλλοντας την πρόσδεση των παραγόντων έναρξης σε αυτή. Συγκεκριμένα, μετά από τη μόλυνση από εντεροϊό, παρατηρείται αποικοδόμηση του παράγοντα eIF4G, παράγοντας τα eIF4GI και eIF4GII. Από αυτά τα δύο τμήματα, το

ένα αλληλεπιδρά με τον παράγοντα eIF4E και κατά συνέπεια με το 5'-κάλυμμα ενώ το άλλο τμήμα, με την ελικάση (eIF4A), την PABP και τον παράγοντα eIF3 μέσω του οποίου γίνεται η σύνδεση με την μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (Lamphear et al., 1995). Είναι φανερό ότι αυτές οι αλλαγές στο μολυσμένο κύτταρο εμποδίζουν την εξαρτώμενη από την καλύπτρα μετάφραση των mRNA, ευνοώντας την μετάφραση μέσω στοιχείων IRES.

1.2.2.3 Αντιγραφή

Μετά την ολοκλήρωση της μετάφρασης, τα ριβοσώματα απομακρύνονται από το RNA και ξεκινά η διαδικασία της αντιγραφής με την έναρξη της σύνθεσης του κλώνου αρνητικής πολικότητας (-RNA). Η διαδικασία αυτή απαιτεί τη δημιουργία ενός συμπλόκου αντιγραφής που αποτελείται από ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών τόσο του κυττάρου όσο και του ιού καθώς και ρυθμιστικά στοιχεία επάνω στο RNA τα οποία δρουν *in cis* ρυθμίζοντας την αντιγραφή.

Το βασικότερο ρόλο κατά την αντιγραφή έχει η RNA πολυμεράση ($3D^{pol}$). Η $3D^{pol}$ καταλύει τόσο τη σύνθεση των κλώνων RNA(-) όσο και τη σύνθεση των RNA(+) και ευθύνεται για την ουριδιλίωση της VPg. Η πρωτεΐνη VPg λειτουργεί ως εκκινήτης αφού πρώτα ουριδιλιωθεί σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης ώστε να προκύψει η μορφή VrgpUpU, γεγονός το οποίο αποτελεί το πρώτο στάδιο της σύνθεσης τόσο του RNA(+) όσο και του RNA(-).

Από τα *cis*-δραστικά στοιχεία του γενώματος, που ρυθμίζουν την αντιγραφή, απαραίτητη φαίνεται να είναι η δομή τριφυλλιού που βρίσκεται στην 5'-UTR και επηρεάζει την σταθερότητα, την μεταγραφή και την αντιγραφή των εντεροϊών. Στην δομή τριφυλλιού προσδένεται η κυτταρική πρωτεΐνη PCBP που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του ξενιστή PABP1 (poly(A) binding protein) (Wang et al., 1999), η οποία φαίνεται να προσδένεται στην πολυαδενυλιωμένη ουρά του 3'UTR του γενώματος του ιού. Η πολυαδενυλιωμένη ουρά αποτελεί άλλο ένα στοιχείο του ιικού RNA απαραίτητο για την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου RNA, αφού και είναι γνωστό ότι το μέγεθος της πολυαδενυλιωμένης ουράς αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για την αντιγραφή του ιού (Barton et al., 2001)

Εκτός από την δομή τριφυλλίου και την πολυαδενυλιωμένη ουρά, μια άλλη δομή του RNA του ιού συμβάλλει στην έναρξη της αντιγραφής. Η δομή αυτή βρίσκεται στην περιοχή της 2C του γενώματος και έχει μορφή θηλιάς και είναι γνωστή ως CRE στοιχείο (Goodfellow et al.; 2000). Η δομή αυτή είναι απαραίτητη για την σύνθεση της VPgpUpU η οποία χρησιμοποιείται κατά την αντιγραφή του κλώνου θετικής πολικότητας. Με αυτόν τον τρόπο χρησιμοποιείται διαφορετικός μηχανισμός ουριδιλίωσης της πρωτεΐνης VPg, για την έναρξη της αντιγραφής των κλώνων θετικής και αρνητικής πολικότητας. (Goodfellow et al., 2000, Morasco et al., 2003).

Υπάρχουν δύο τρόποι σχηματισμού της ουριδιλιωμένης VPg. Σύμφωνα με το πρώτο, η VPg ουριδιλιώνεται στην πολυαδενυλιωμένη ουρά όπου και δρα σαν εκκινήτης για την έναρξη της αντιγραφής του αρνητικού κλώνου. Σύμφωνα με το δεύτερο μοντέλο, η VPg ουριδιλιώνεται στο CRE στοιχείο, με αποτέλεσμα να παράγονται αρκετά μόρια VPgpUpU τα οποία και χρησιμοποιούνται σαν εκκινήτικα μόρια για την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας, αναγνωρίζοντας τις δύο αδενίνες που βρίσκονται στο 3' άκρο του αρνητικής πολικότητας κλώνου (Sharma et al., 2005).

Στο μολυσμένο κύτταρο υπάρχουν 50 φορές περισσότεροι κλώνοι RNA(+) σε σύγκριση με τους κλώνους RNA(-). Η μοριακή βάση της ασύμμετρης αντιγραφής βρίσκεται στην ύπαρξη δύο διαφορετικών μηχανισμών για την ουριδιλίωση της VPg κατά την σύνθεση του RNA(-) (εξαρτώμενη από την πολύ(A) ουρά) και του RNA(+) (CRE-εξαρτώμενη) (B. Joan Morasco et al. 2003).

1.3 Κλινικές εκδηλώσεις

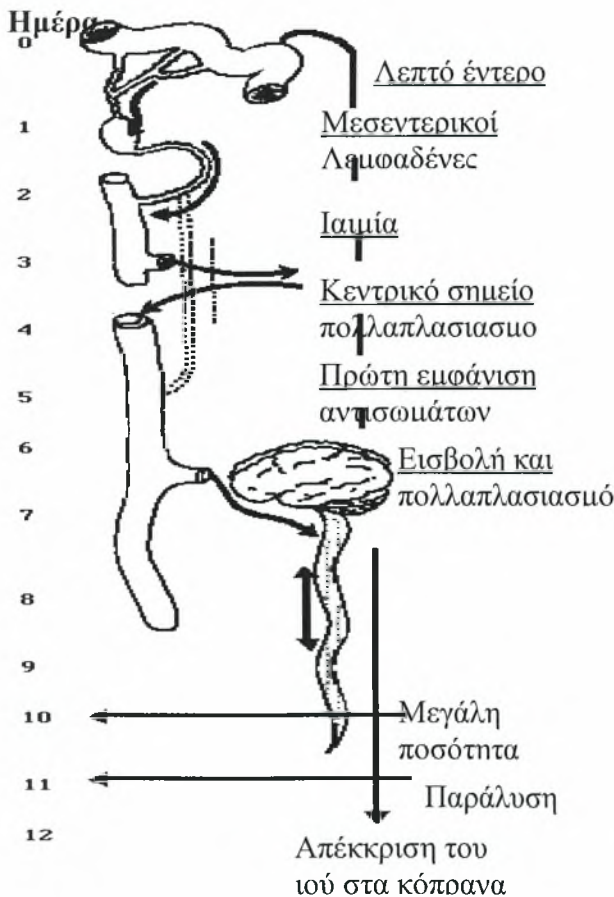
Γενικά, οι κλινικές εκδηλώσεις και οι ασθένειες που προκαλούνται από εντεροϊούς στον άνθρωπο ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό, από ασυμπτωματικές λοιμώξεις και κοινό κρυολόγημα, έως θανατηφόρες περιπτώσεις μηνιγγίτιδας, εγκεφαλίτιδας και πολιομυελίτιδας. Παρατηρείται ότι συγκεκριμένοι ορότυποι εντεροϊών μπορούν να προκαλέσουν εντελώς διαφορετικά συμπτώματα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και τόπους. Επίσης, όπως φαίνεται και στον πίνακα 1.2, διαφορετικοί ορότυποι εντεροϊών μπορούν να είναι υπεύθυνοι για τα ίδια συμπτώματα.

Πολιοϊοί
Παραλυτικές ασθένειες Ασηπτική μηνιγγίτιδα Εμπύρετη ασθένεια, ειδικά κατά την διάρκεια του καλοκαιριού
Coxsackie A
Herpangina Οξεία λεμφατική φαρυγγίτιδα Ασηπτική μηνιγγίτιδα Παράλυση Εξανθήματα Hand foot and mouth disease Βρεφική πνευμονία Κοινό κρυολόγημα Ηπατίτιδα Παιδική διάρροια Οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα
Coxsackie B
Πλευροδυνία Ασηπτική μηνιγγίτιδα Παράλυση (σπάνια) Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και μυοκαρδίτιδα Περικαρδίτιδα και μυοκαρδίτιδα Ασθένεια του ανώτερου αναπνευστικού και πνευμονία Εξανθήματα Ηπατίτιδα Εμπύρετη ασθένεια
Echo ιοί
Ασηπτική μηνιγγίτιδα Παράλυση Εγκεφαλίτιδα Εξανθήματα Ασθένειες του αναπνευστικού Διάρροια Περικαρδίτιδα και μυοκαρδίτιδα Ηπατική διαταραχή
Εντεροϊοί (68-71)
Πνευμονία και βρογχιολίτιδα Οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα (70) Παράλυση (70, 71) Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (70, 71) Hand foot and mouth disease (71)

Πίνακας 1.2 Κλινικά συμπτώματα που σχετίζονται με μόλυνση από εντεροϊούς. (Fields of virology, 5th Edition, David M. Knipe , Peter M. Howley, Copyright B©2007 Lippincott Williams & Wilkins)

1.4 Παθογένεια των εντεροϊών

Η είσοδος των εντεροϊών είναι το πεπτικό σύστημα (Melnick J.L, 1996) και γίνεται μέσω του στόματος (Εικόνα 1.7), αν και υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις. Η περίοδος επώασης, δηλαδή ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας, είναι συνήθως 7-14 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται και μεταξύ 2-32 ημερών. Μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό των εντεροϊών στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και του εντέρου ίσως προκληθεί ιαμία η οποία με τη σειρά της θα προκαλέσει επιπλέον πολλαπλασιασμό του ιού στο όργανο-στόχο (νωτιαίος μυελός, μήνιγγες, μυοκάρδιο και δέρμα). Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί από κόπρανα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, φαρυγγικά επιχρίσματα, τον εγκέφαλο, την καρδιά, τον επιπεφυκότα και πληγές του δέρματος.



Εικόνα 1.7 Παρουσιάζεται η πορεία του ιού από το λεπτό έντερο μέχρι το ξεκίνημα της παράλυσης σε συνάρτηση με το χρόνο, μετά την πρώτη μόλυνση.

Παρατηρείται ότι κάθε εντεροϊός έχει και το δικό του όργανο-στόχο, ωστόσο οι περισσότερες λοιμώξεις που προκαλούν οι εντεροϊοί, ακόμα και τα πιο παθογόνα στελέχη αυτών, είναι ασυμπτωματικές και γι' αυτό το λόγο από πολλούς θεωρούνται ως μη σημαντικοί για να βρεθούν στο επίκεντρο εμπεριστατωμένης έρευνας (Muir et al., 1998). Παρόλα αυτά, όμως, τα μέλη της οικογένειας αυτής μπορούν να προκαλέσουν πολύ σοβαρές ασθένειες.

➤ Παραλυτικές ασθένειες

Όταν μέλη της οικογένειας των εντεροϊών προσβάλουν το νευρικό σύστημα μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες όπως παράλυση που να οφείλετε σε πολιοϊό ή άλλο εντεροϊό διαφορετικό από τους πολιοϊούς, μη παραλυτική πολιομυελίτιδα και μηνιγγίτιδα. Έχουν παρατηρηθεί φαινόμενα παραλυτικής ασθένειας, τα οποία δεν οφείλονται σε πολιοϊούς. Σε αυτές τις περιπτώσεις υπάρχει καταστροφή των κινητικών νευρώνων από διάφορους Cocksackie και Echo ιούς. (Brown et al., 1972, Grimwood et al., 2003). Στην παραλυτική πολιομυελίτιδα εμφανίζονται πρώτα τα συμπτώματα της μηνιγγίτιδας, όπως ακαμψία της πλάτης και του λαιμού, ενώ παρατηρείται μικρή παράλυση μέσα σε 24-48 ώρες. Η πλήρης παράλυση παρατηρείται μέσα σε 48-72 ώρες. Κατά την μη παραλυτική πολιομυελίτιδα (ασηπτική μηνιγγίτιδα) η μόλυνση από τον μη-παραλυτικό πολιοϊό είναι ραγδαία προκαλώντας πονοκέφαλο, τάση προς εμετό, πυρετό και συμπτώματα μηνιγγίτιδας. Τα συμπτώματα συνήθως υποχωρούν σε λιγότερο από μία εβδομάδα και η ανάρρωση γίνεται χωρίς επεισόδια. Η μηνιγγίτιδα εκτός από τους πολιοϊούς μπορεί να οφείλεται και σε ορισμένα στελέχη Cocksackie και Echo ιών, τα οποία προσβάλουν συνήθως άτομα μικρής ηλικίας (Brown et al., 1972). Τέλος, η εγκεφαλίτιδα προέρχεται από την μόλυνση του ίδιου του εγκεφάλου από πολιοϊό και είναι συνήθως θανατηφόρα (Philip D. Minor 1999).

➤ Hand Foot and Mouth Disease

Μια άλλη ασθένεια που οφείλεται σε εντεροϊούς είναι η HFMD (Hand Foot and Mouth Disease) (Chan et al., 2003). Αυτή είναι συνήθως μια ήπια παιδική ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από απότομο σχηματισμό πληγών στο στόμα (ulcerating vesicles) και βλάβες, συνήθως αγγειακές, στα χέρια και στα πόδια. Η ασθένεια οφείλεται σε κάποιους ορότυπους των εντεροϊών, πιο συχνά στους Cocksackie A16 και EV71. Άλλα

στελέχη τα οποία σχετίζονται με την ασθένεια είναι οι Coxsackie A4, 5, 9, 10, Coxsackie B2 και 5. Το πρώτο κρούσμα της ασθένειας αναφέρθηκε στην Σιγκαπούρη το 1970.

➤ Ασθένειες του αναπνευστικού

Ασθένειες του αναπνευστικού έχουν, επίσης, συσχετισθεί με διάφορα στελέχη των εντεροϊών, όπως για παράδειγμα το EV68 (Oberste et al., 2004b), ενώ ιοί της οικογένειας των ρινοϊών και των εντεροϊών έχουν ανιχνευθεί σε μολύνσεις του αναπνευστικού σε παιδιά και θεωρούνται σαν ο βασικότερος αιτιολογικός παράγοντας της βρογχολίτιδας σε άτομα νεαρής ηλικίας (Jacques et al., 2006). Μολύνσεις του αναπνευστικού συστήματος από ιούς έχουν παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ιδιαίτερα κατά την μεταμόσχευση εμβρυικών αιμοποιητικών κυττάρων (HSCT, Hematopoietic Stem Cell Transplantation) (Chakrabarti et al., 2004). Παρά το γεγονός ότι ο συνήθης τρόπος μετάδοσης των εντεροϊών είναι μέσω του πεπτικού συστήματος, η μετάδοση μέσω του αναπνευστικού συστήματος είναι αρκετά συνήθης (Khetsuriani et al., 2006). Υπάρχουν δε περιπτώσεις όπου εντεροϊοί οδήγησαν στο θάνατο ασθενών μετά από μεταμόσχευση εμβρυικών αιμοποιητικών κυττάρων (Parody, 2007).

➤ Καρδιομυοπάθεια

Η μόλυνση των μυϊκών κυττάρων της καρδιάς από τους Coxsackie B ιούς είναι ένας σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας της ανθρώπινης καρδιομυοπάθειας, όπου έχουν ανιχνευθεί στο 30% των περιπτώσεων (Baboonian et al., 1997). Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από διόγκωση της καρδιάς και καρδιακή ανεπάρκεια, ενώ ο μηχανισμός στον οποίον οφείλεται περιλαμβάνει πρωτεολυτική πέψη της δυστροφίνης, από την ιική πρωτεάση 2A (2A^{PI0}), οδηγώντας σε καταστροφή του κυτταροσκελετού και απώλεια της ικανότητας μετάδοσης της μηχανικής δύναμης κατά τη συστολή. Παρόμοια συμπτώματα παρουσιάζουν και τα άτομα τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της δυστροφίνης (Baxter et al., 2006).

➤ Φλεγμονώδης μυοπάθεια

Τα T-λεμφοκύτταρα, οι κυτοκίνες και αντισώματα εμπλέκονται στη δημιουργία της φλεγμονώδους μυοπάθειας, η οποία εκδηλώνεται μετά από μόλυνση από Coxsackie B ιούς. Παρατηρείται ότι η ασθένεια συνεχίζει να εξελίσσεται ακόμα και μετά την

υποχώρηση της μυϊκής λοίμωξης, 2 έως 4 εβδομάδες μετά την μόλυνση. Τα συμπτώματα είναι πυρετός, μυαλγία, αυξημένα μυϊκά ένζυμα και σε κάποιες περιπτώσεις μυοσφαιρινουρία.

➤ Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I

Οι Coxsackie B ιοί, έχει βρεθεί ότι εκτός των άλλων μπορούν να προσβάλλουν τα β κύτταρα του παγκρέατος και να προκαλέσουν σακχαρώδη διαβήτη τύπου I.

➤ Λοιμώξεις των οφθαλμών

Η οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα καταγράφηκε για πρώτη φορά στην Αφρική το 1969. Προκαλείται από Coxsackie A ιούς και Echo ιούς. Τα συμπτώματα της ασθένειας είναι δακρύρροια, πόνος, περικογχικό οίδημα, κοκκίνισμα του επιπεφυκώτος έως και αιμορραγία. Η ασθένεια σχετίζεται και με μη οφθαλμολογικά συμπτώματα όπως νευρολογική δυσλειτουργία καθώς και αναπνευστικές και γαστρεντερικές διαταραχές. Η ασθένεια συνήθως υποχωρεί μετά από μια έως δυο εβδομάδες.

1.5 Επιδημιολογία των εντεροϊών

Οι μολύνσεις από τους εντεροϊούς είναι αρκετά συχνές. Στις Η.Π.Α. υπολογίζεται ότι 10-15 εκατομμύρια άτομα μολύνονται το χρόνο (CDC, Oct 2000). Πιο επιρρεπείς στις μολύνσεις από εντεροϊούς είναι τα μικρά παιδιά και γενικά τα άτομα μικρής ηλικίας τα οποία είναι λιγότερο πιθανό να έχουν αντισώματα από προηγούμενες μολύνσεις. Ενήλικες μπορούν και αυτοί να μολυνθούν και να νοσήσουν, αν δεν παρουσιάζουν ανοσία για κάποιο συγκεκριμένο ορότυπο.

Επειδή οι εντεροϊοί ανιχνεύονται σε εκκρίσεις του αναπνευστικού (σάλιο, πτύελα ή ρινική βλέννα) είναι πολύ εύκολο να μολυνθούν τα άτομα που θα έρθουν σε επαφή με αυτά. Οι εντεροϊοί επίσης εντοπίζονται και στα κόπρανα ενός μολυσμένου ατόμου (CDC, June 1998). Γι' αυτό το λόγο σε περιοχές που δεν επικρατούν καλές συνθήκες υγιεινής παρατηρείται αύξηση της μετάδοσης των ιών αυτών. Γενικά, η εποχή που μεταδίδονται συνήθως οι εντεροϊοί είναι το καλοκαίρι και το φθινόπωρο.

2. ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

2.1 Εντεροϊοί στο υδάτινο περιβάλλον

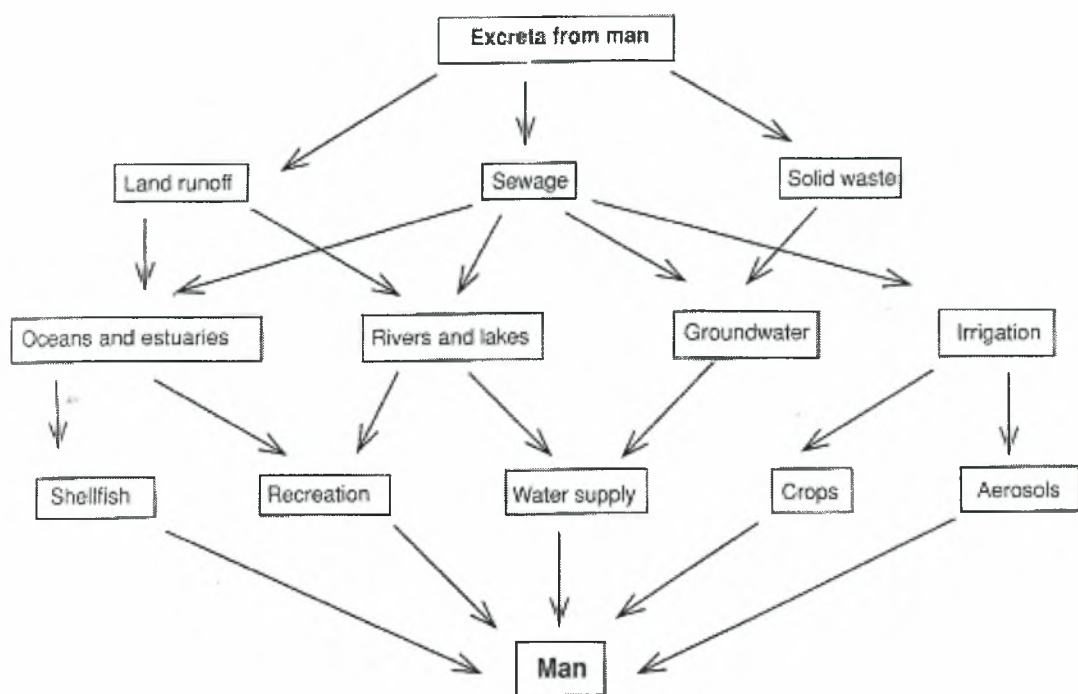
Η υδατογενής μετάδοση των ιών είναι ένας πολύ αποτελεσματικός τρόπος για την ευρεία εξάπλωση ασθενειών σε ένα μεγάλο τμήμα πληθυσμού. Μεγάλος αριθμός εντερικών ιών μπορούν να εισέλθουν στο υδάτινο περιβάλλον μέσω των κοπράνων μολυσμένων ατόμων.

Οι ιοί εντερικής προέλευσης εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της στοματικής οδού και αποβάλλονται στα ούρα και τα κόπρανα σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Πολλοί από αυτούς τους ιούς μπορούν να επιβιώσουν στο νερό ή τα λύματα ακόμα και μετά την επεξεργασία των λυμάτων. Από όλους τους ιούς ιδιαίτερη σημασία για τη δημόσια υγεία έχουν οι ιοί εντερικής προέλευσης.

Η πιο μελετημένη ομάδα ιών εντερικής προέλευσης είναι οι Εντεροϊοί, οι οποίοι υπάρχουν στα κόπρανα, έχουν ανιχνευθεί στα λύματα και ευθύνονται για πληθώρα ασθενειών στον άνθρωπο. Κάθε χρόνο 5-8 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο πεθαίνουν από γαστρεντερίτιδα, ενώ εκτιμάται πως 1 εκατομμύριο παιδιά πεθαίνουν από διάρροια. Η γαστρεντερίτιδα φαίνεται πως προκαλείται μετά από κατανάλωση μολυσμένου νερού ή τροφίμων (ιδιαίτερα οστρακοειδών).

Οι εντεροϊοί που περιέχονται στις ανθρώπινες εκκρίσεις ακολουθούν διάφορες πορείες στο περιβάλλον (Εικ.2.1). Όταν μεγάλη ποσότητα μολυσμένων λυμάτων με εντεροϊούς καταλήγει στη θάλασσα ή είναι ανεπαρκώς επεξεργασμένο και χρησιμοποιείται για πόση, τότε είναι πιθανό να προκληθεί υδατογενής επιδημία.

Ο άνθρωπος είναι δυνατό να έρθει σε επαφή με εντεροϊούς με την κατανάλωση πόσιμου νερού που προέρχεται από ανεπαρκώς επεξεργασμένα λύματα, με την κατανάλωση οστρακοειδών που καλλιεργούνται σε μολυσμένα νερά, με την κατανάλωση δημητριακών που καλλιεργήθηκαν με ακατάλληλο νερό άρδευσης ή με την κολύμβηση σε παραλίες που διοχετεύονται μη επεξεργασμένα λύματα.



Εικόνα 2.1 Παρουσιάζεται η πορεία των ιών στο υδάτινο περιβάλλον με τελικό αποδέκτη των άνθρωπο.

2.1.1 Ιοί εντερικής προέλευσης στα λύματα

Στα κόπρανα περιέχονται πάνω από 140 διαφορετικά είδη ιών εντερικής προέλευσης. Σε κόπρανα ασθενών μπορεί να ανιχνευθούν πάνω από 10^{10} ιικά σωματίδια, ενώ και στα λύματα έχουν μετρηθεί συγκεντρώσεις της τάξης των 500.000 μολυσματικών μονάδων/λίτρο (Parker et al. 2002). Πιο συγκεκριμένα, οι εντεροϊοί περιέχονται στα κόπρανα ασθενών σε συγκέντρωση 10^8 - 10^{10} ιικών σωματιδίων / γραμμάριο κοπράνων και αποβάλλονται από τον ασθενή για 7 περίπου εβδομάδες. Επιπλέον, στα κόπρανα φορέων αποβάλλονται ιοί ο αριθμός των οποίων στα μη επεξεργασμένα αστικά λύματα κυμαίνεται από 10^3 - 10^6 μολυσματικές μονάδες / λίτρο.

Η συχνότητα και ο αριθμός των ιικών σωματιδίων που μπορούν να ανιχνευθούν στα λύματα εξαρτάται από τη συχνότητα των μολύνσεων, τον αριθμό των φορέων στην κοινότητα, τη συχνότητα χρησιμοποίησης του εμβολίου της πολιομυελίτιδας (OPV) καθώς επίσης και την ευαισθησία της μεθόδου απομόνωσης και ανίχνευσής τους.

Η παρουσία των ιών ποικίλει ανάλογα με την εποχή του έτους. Οι εντεροϊοί απομονώνονται συχνότερα το καλοκαίρι. Αντίθετα, οι αδενοϊοί, οι αστρο-ιοί και οι ρότα ιοί απομονώνονται συχνότερα κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου, του χειμώνα και στην αρχή της άνοιξης.

Τα στοιχεία αναφορικά με τη γεωγραφική κατανομή που εμφανίζουν τα διάφορα είδη ιών εντερικής προέλευσης δείχνουν πως δεν υπάρχει περιορισμός ως προς την παρουσία των ιών εντερικής προέλευσης ακόμα και στις πιο ανεπτυγμένες χώρες λόγω της μετακίνησης των πληθυσμών που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια από τις υπό ανάπτυξη χώρες στις αναπτυγμένες.

Στις αναπτυσσόμενες χώρες η συχνότητα απομόνωσης εντεροϊών αυξάνεται δραματικά εξαιτίας της ανεπάρκειας συστημάτων ύδρευσης και αποχέτευσης, τις ακατάλληλες συνθήκες υγιεινής και τον υπερπληθυσμό.

Εξαιτίας της παρουσίας ιών στα μη επεξεργασμένα λύματα, απαιτείται η εφαρμογή κατάλληλης επεξεργασίας προκειμένου να εξουδετερωθούν για να αποφευχθούν υδατογενείς επιδημίες.

2.1.2 Λοιμώξεις από ιούς εντερικής προέλευσης

➤ Λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων, μη επεξεργασμένων επιφανειακών υδάτων

Τα επιφανειακά νερά (ποτάμια, λίμνες) που δέχονται εκροές λυμάτων που πιθανόν να περιέχουν ιούς εντερικής προέλευσης, ο αριθμός των οποίων εξαρτάται από την εποχή, τον όγκο των διοχετευόμενων λυμάτων και τις κλιματολογικές συνθήκες. Η χρησιμοποίηση μη επεξεργασμένων επιφανειακών υδάτων ήταν υπεύθυνη για μια επιδημία γαστρεντερίτιδας που οφειλόταν σε ιούς Noro, λόγω της κολύμβησης σε νερά που είχαν μολυνθεί με λύματα (Koorman, 1982). Η παρουσία ιών εντερικής προέλευσης επιβεβαιώνεται και σε πιο πρόσφατες μελέτες. Το 2005 απομονώθηκαν ρολίο-ιοί σε ύδατα ποταμού στη Νότια Αφρική (Pavlov et al. 2005) με άμεσο κίνδυνο την πρόκληση υδατογενούς επιδημίας λόγω της κατανάλωσης του νερού από μεγάλο αριθμό ατόμων.

➤ Λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων, μη επεξεργασμένων υπόγειων υδάτων

Λοιμώξεις μπορούν να προκληθούν και από τη χρήση μολυσμένων, μη επεξεργασμένων υπόγειων υδάτων, στα οποία οι ιοί προέρχονται από την επίγεια διάθεση της λάσπης των λυμάτων ή από την εις βάθος εναποθήκευσή της. Πιο συγκεκριμένα, κατά την περίοδο 1971-1994 στις ΗΠΑ αναφέρθηκαν 569.754 περιστατικά υδατογενών λοιμώξεων τα οποία σε ποσοστό 58% σχετιζόνταν με μόλυνση υπόγειων υδάτων από ιούς εντερικής προέλευσης (Craun & Calderon, 1996).

➤ Λοιμώξεις από την κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού

Τα επιφανειακά ή υπόγεια νερά που είναι μολυσμένα και πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για πόσιμο νερό πρέπει να υποστούν αποτελεσματική επεξεργασία ώστε να αδρανοποιηθούν οι ιοί εντερικής προέλευσης. Αν η επεξεργασία δεν είναι αποτελεσματική υπάρχει ο κίνδυνος της πρόκλησης υδατογενούς επιδημίας, όπως αυτή που συνέβη τον Αύγουστο του 1998 στην Ελβετία όπου αναφέρθηκε επιδημία γαστρεντερίτιδας οφειλόμενη στην κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού (Hafliger et al, 2000).

➤ Λοιμώξεις από θαλάσσια νερά

Σε πολλές πόλεις τα λύματα καταλήγουν καθημερινά στη θάλασσα χωρίς να έχει προηγηθεί επεξεργασία τους. Τα παράκτια νερά έχουν ενοχοποιηθεί για τη μετάδοση ασθενειών στους ανθρώπους μέσω επαφής με το θαλασσινό νερό ή κατάποσής του (Wetz et al, 2004). Εντεροϊοί απομονώνονται συχνά από το θαλασσινό νερό και τα ιζήματα του πυθμένα παράκτιων περιοχών (Smith et al, 1978).

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μικρός αλλά υπαρκτός κίνδυνος πρόκλησης γαστρεντερίτιδας που οφείλεται σε εντεροϊούς, από την κολύμβηση σε περιοχές που έχουν μολυνθεί με λύματα (Holmes, 1989).

➤ Λοιμώξεις από την κατανάλωση μολυσμένων οστρακοειδών

Μεγάλο ποσοστό ιών εντερικής προέλευσης συγκεντρώνεται στους ιστούς διάφορων υδρόβιων οργανισμών (μύδια, στρείδια, κ.α.). Αυτοί οι οργανισμοί καταναλώνονται συνήθως ωμοί ή ελάχιστα μαγειρεμένοι με αποτέλεσμα να προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο (Sair A.I. et al, 2002).

Στις ΗΠΑ η πρώτη επιδημία ηπατίτιδας Α από την κατανάλωση οστρακοειδών πραγματοποιήθηκε στις αρχές το '60. Το 1988 στην Κίνα σημειώθηκε μεγάλη επιδημία ηπατίτιδας Α (300.000 περιστατικά) από την κατανάλωση οστρακοειδών που είχαν καλλιεργηθεί σε νερά μολυσμένα από λύματα. Στη Μεγάλη Βρετανία το 1976 και στις ΗΠΑ το 1980 σημειώθηκαν για πρώτη φορά επιδημίες γαστρεντερίτιδας από την κατανάλωση μυδιών (Apleton & Pereira 1977, Gunn et al. 1982).

2.2 Η σπουδαιότητα του περιβαλλοντικού ελέγχου

Τα περιστατικά λοιμώξεων από εντερικούς ιούς που αναφέρθηκαν πιο πάνω δείχνουν πως είναι απαραίτητη η αποτελεσματική επεξεργασία των λυμάτων ώστε να αδρανοποιούνται οι ιοί. Επιπλέον είναι απαραίτητος ο έλεγχος περιβαλλοντικών δειγμάτων (πόσιμο νερού, λυμάτων, επιφανειακών και υπόγειων υδάτων) ώστε να διασφαλίζεται η δημόσια υγεία.

Επίσης παρακολούθηση του περιβάλλοντος έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην αποτίμηση του μεγέθους και της διάρκειας της κυκλοφορίας εντεροϊών σε συγκεκριμένους πληθυσμούς (Sedmak et al., 2002, Pallin et al., 1997, Shieh et al., 1997). Μπορεί επίσης να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της δραστηριότητας των εμβολιασμών κατά τη διάρκεια επιδημιών πολιομυελίτιδας (Rougy et al., 1988) και την ανίχνευση αγρίων τύπων πολιοϊών σε κοινωνίες απαλλαγμένες των πολιοϊών (Cochi et al., 1995).

Τα παραπάνω συνηγορούν στην σπουδαιότητα του ελέγχου περιβαλλοντικών δειγμάτων ακόμα και για την πρόληψη μιας πιθανής επιδημίας από εντεροϊό, μιας και έχουν απομονωθεί από το περιβάλλον πολιοϊοί οι οποίοι απομονώθηκαν αργότερα και σε ασθενείς (Deshpande et al., 2003).

Ποικίλοι συνδυασμοί κλασσικών και μοριακών μεθόδων έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση εντεροϊών από περιβαλλοντικά δείγματα. Από τις πιο σημαντικές είναι η μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων (two phase separation method) (Hovi et al., 1986), η οποία προτείνεται και από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας.

2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη επιβίωση των εντεροϊών στο περιβάλλον

Η μελέτη των συνθηκών επιβίωσης των ιών που περιέχονται στα λύματα είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων απομόνωσής τους αλλά και τη δημιουργία κατάλληλων μονάδων επεξεργασίας λυμάτων με σκοπό την προάσπιση της δημόσιας υγείας.

Η επιβίωση των εντεροϊών στο περιβάλλον επηρεάζεται από διάφορους φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς παράγοντες πολλοί από τους οποίους εξαρτώνται από τη δομή και τη σύσταση του ιού. Γενικά, οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση του ιού στο περιβάλλον είναι η θερμοκρασία, το pH, το φως, η προσρόφησή τους στο έδαφος και η παρουσία άλλων μικροοργανισμών (Guardabassi et al, 2003).

Οι εντεροϊοί διαθέτουν ένα καψίδιο πρωτεϊνικής σύστασης. Η επιβίωσή τους στο περιβάλλον εξαρτάται από την επίδραση που έχουν οι παράγοντες που προαναφέρθηκαν στο γενετικό υλικό αλλά και στις πρωτεΐνες του καψιδίου των ιών (Sobsey et al, 2003).

➤ Θερμοκρασία

Αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα επιβίωσης των ιών στο νερό και το έδαφος. Οι μεταβολές της θερμοκρασίας επηρεάζουν αρνητικά τη διάρκεια ζωής των ιών. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι σε υψηλές θερμοκρασίες καταστρέφεται το καψίδιο των ιών λόγω μετουσίωσης των πρωτεϊνών που το αποτελούν, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες αδρανοποιείται το γενετικό υλικό των ιών.

Γενικά, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, τόσο μειώνεται ο χρόνος ζωής των ιών. Εργαστηριακές μελέτες αναφέρουν πως οι ιοί είναι περισσότερο ανθεκτικοί στις χαμηλές θερμοκρασίες (-20⁰C-1⁰C) παρά στις υψηλές (πάνω από 22⁰C) (Hurst et all, 1988).

➤ Φως-Ακτινοβολία

Το φως επιδρά άμεσα ή έμμεσα στην επιβίωση των ιών στο νερό. Η άμεση επίδραση του φωτός εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Η υπεριώδης ακτινοβολία απενεργοποιεί τους ιούς ως αποτέλεσμα του σχηματισμού διμερών θυμίνης και της αποδιάταξης των πρωτεϊνών του καψιδίου. Γι' αυτό προτείνεται η

χρήση υπερϊόδους ακτινοβολίας για την απολύμανση λυμάτων και θαλασσινού νερού από ιούς (Wilhelm et al, 2002).

Η έμμεση επίδραση του φωτός αφορά την ενεργοποίηση χημικών ουσιών που είναι τοξικές για τους ιούς καθώς και την πιθανή αύξηση μικροοργανισμών που ανταγωνίζονται τους ιούς ως προς την επιβίωσή τους (Jocksch et al, 1996).

➤ pH

Το pH επηρεάζει την επιβίωση των ιών προκαλώντας την αποδιάταξη των πρωτεϊνών του καψιδίου ή εμποδίζοντας την προσρόφησή τους σε διάφορες επιφάνειες που ευνοεί την επιβίωσή τους (Fujioaka et al 1975, Mandel et al 1971, Bitton et al 1980). Οι περισσότεροι ιοί εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα σε τιμές pH από 5 έως 9. Οι polio-ιοί για παράδειγμα παραμένουν ενεργοί για πολλές εβδομάδες σε pH από 3.8 ως 8.5 (Pollard et al, 1949).

➤ Προσρόφηση ιών σε επιφάνειες

Οι ιοί στα λύματα βρίσκονται συνήθως συγκεντρωμένοι με άλλους ιούς δημιουργώντας συσσωματώματα ή προσροφημένοι σε στερεά απόβλητα. Έχει διαπιστωθεί ότι η απορρόφηση των ιών από το έδαφος και η προσκόλληση τους σε ιζήματα ενισχύει την επιβίωσή τους δρώντας προστατευτικά έναντι αντίξοων περιβαλλοντικών συνθηκών (Gerba et al, 1975, Liew et al, 1980). Ο Nagajima και οι συνεργάτες του το 2003 μελετώντας λύματα επιβεβαίωσαν ότι η προσρόφηση polio-ιών σε σωματίδια ενεργού λάσπης συνεπάγεται ενίσχυση της ενεργότητας τους για διάστημα μεγαλύτερο των 28 ημερών προστατεύοντας τους παράλληλα από τις μεταβολές της θερμοκρασίας.

Η προσρόφηση των ιών στο έδαφος και κατά συνέπεια η επιβίωση και η μετακίνηση τους εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες όπως η υγρασία, το ποσό της οργανικής ύλης, η σύσταση του εδάφους, το pH και η παρουσία κατιόντων. Οι ιοί εμφανίζουν σταθερότητα σε ουδέτερες τιμές pH (6.5-7.5), ενώ η απορρόφηση τους ενισχύεται σε χαμηλότερες τιμές pH (Gerba et al. 1975, England et al. 1982). Επιπλέον, η παρουσία κατιόντων και διαλυμένων αλάτων ενισχύουν την απορρόφηση των ιών από το έδαφος (Sobsey et al.1975, Gerba et al. 1984).

Σημαντικό ρόλο στην απενεργοποίηση των ιών διαδραματίζει η υγρασία του εδάφους. Έχει παρατηρηθεί ότι σε υγρασία χαμηλότερη από 10% οδηγεί σε ραγδαία αδρανοποίηση των ιών και σε αναστολή της μετακίνησής τους στην επιφάνεια του εδάφους. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αποδιάταξη του περιβλήματος και του

γενετικού υλικού των ιών. Συνεπώς, η βροχόπτωση σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία ευνοούν σημαντικά την επιβίωση των ιών στο έδαφος λόγω αύξησης της υγρασίας (Beavers and Gardner 1993).

➤ Παρουσία άλλων μικροοργανισμών

Η επίδραση που έχει η παρουσία άλλων μικροοργανισμών στα λύματα έχει μελετηθεί διεξοδικά. Τα βακτήρια και οι άλλοι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση των ιών καθώς παράγουν πρωτεολυτικά και άλλα ένζυμα που τους καταστρέφουν (Girones et al, 1989). Στο θαλασσινό νερό πολλές μελέτες αναφέρουν αδρανοποίηση των εντεροϊών που σχετίζεται με τον ανταγωνισμό που αναπτύσσεται με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Επίσης, η επιβίωση των polio-ιών στην άμμο αναστέλλεται από την παρουσία αερόβιων μικροοργανισμών του εδάφους (Hurst et al, 1988).

2.4 Απομόνωση ιών εντερικής προέλευσης

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση ιών εντερικής προέλευσης κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες:

- Καλλιεργητικές μέθοδοι, όπου γίνεται χρήση κυτταρικών σειρών ανάλογα με το είδος του ιού
- Μοριακές μέθοδοι, όπως η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης που απαιτεί την απομόνωση του DNA ή του RNA του υπό εξέταση ιού

Οι μοριακές τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί στα λύματα για την ανίχνευση εντεροϊών, αποδεικνύονται να είναι ταχύτερες, πιο ευαίσθητες και πιο ακριβείς σε σχέση με τις καλλιεργητικές μεθόδους. Επίσης, με τη χρήση μοριακών τεχνικών είναι δυνατόν να ανιχνευθούν ιοί που εξαιτίας της αργής τους ανάπτυξης είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν (Arens Max, 1999).

Ο Yu-Li Tsai και οι συνεργάτες του το 1993 με τη χρήση Αντίστροφης Μεταγραφής και Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (RT-PCR) ανίχνευσαν εντεροϊούς σε λύματα που συλλέχθηκαν από μονάδα βιολογικού καθαρισμού στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α. Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε σύγκριση της μοριακής τεχνικής με την καλλιεργητική μέθοδο και αποδείχτηκε ότι η RT-PCR εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία και συνιστάται για την ανίχνευση ιών από περιβαλλοντικά δείγματα. Ο Dubois και οι συνεργάτες του το 1994 και το 1997 απομόνωσαν από λύματα περιοχών της Γαλλίας εντεροϊούς με την εφαρμογή της RT-PCR.

Από τις παραπάνω μελέτες παρατηρείται ότι μόνο μικρό ποσοστό των ιών που υπάρχουν στα λύματα μπορούν να ανιχνευθούν με καλλιεργητικές μεθόδους. Οι μοριακές τεχνικές αν και πιο ευαίσθητες, σε κάποιες περιπτώσεις είναι δύσκολο να εφαρμοστούν με επιτυχία εξαιτίας πληθώρας αναστολέων που υπάρχουν στα λύματα. Παρόλα αυτά με την καθιέρωση των μοριακών τεχνικών για την απομόνωση ιών από λύματα δίνεται η δυνατότητα της μοριακής ταυτοποίησης των ιών.

Πριν την καθιέρωση των μοριακών τεχνικών η ταυτοποίηση των ιών βασιζόταν στη χρήση αντισωμάτων με τα οποία διακρίνονταν οι αντιγονικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων τύπων ιών. Το πρόβλημα ήταν ότι κάποια είδη ιών δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη χρήση αντισωμάτων γιατί δεν εμφανίζουν αντιγονικές διαφορές. Ωστόσο, οι ανοσολογικές τεχνικές έδιναν ικανοποιητικά αποτελέσματα για την

ταξινόμηση των ιών σε μεγάλες ομάδες που διέφεραν σημαντικά ως προς τις αντιγονικές τους ιδιότητες.

Η ανάγκη για τη διάκριση μεταξύ των ιών που εμφανίζουν κοινά αντιγονικά χαρακτηριστικά, οδήγησε στην ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών (Caro et al, 2001). Το γονιδίωμα ενός ιού μπορεί να εμφανίζει μεγάλες διαφορές σε επίπεδο νουκλεοτιδίων χωρίς όμως αυτό να επηρεάζει την έκφραση των πρωτεϊνών και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ιού. Οι μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης στηρίζονται στις διαφοροποιήσεις του γονιδιώματος των ιών που προκύπτουν λόγω μεταλλάξεων.

Η ταυτοποίηση των ιών έχει μεγάλη σημασία για επιδημιολογικούς λόγους. Οι μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης συμβάλλουν στην ταυτοποίηση παθογόνων ιών που προκαλούν επιδημίες καθώς και στην εξακρίβωση του τρόπου μετάδοσής τους. Επιπλέον, με την ταυτοποίηση προκύπτουν στοιχεία που αφορούν την γεωγραφική και εποχιακή κατανομή των ιών ώστε να ληφθούν μέτρα αντιμετώπισης επιδημιών.

Η μοριακή ταυτοποίηση των ιών πραγματοποιείται με τη χρήση διάφορων μοριακών τεχνικών όπως :

- α) Nucleotide Sequencing
- β) Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (RFLP)
- γ) Southern Blot Analysis
- δ) Oligonucleotide Fingerprint Analysis
- ε) Reverse Hybridization
- στ) DNA Enzyme Immunoassay
- ζ) RNase Protection Assay
- η) Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis
- θ) Heteroduplex Mobility Assay and Heteroduplex Tracking Assay
- ι) Genome Segment Length Polymorphism Analysis (Electrophenotyping)

Οι παραπάνω τεχνικές έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία 20 χρόνια και έχουν αποδειχτεί χρήσιμες στην ταυτοποίηση ιών που απομονώνονται με καλλιεργητικές ή μοριακές μεθόδους. Πολλές από τις παραπάνω μεθόδους μπορούν να εφαρμοστούν με τη χρήση απλών αντιδραστηρίων και οργάνων, χωρίς ιδιαίτερα υψηλό κόστος. Άλλες μέθοδοι και ιδιαίτερα η Nucleotide Sequencing Analysis, βρίσκουν όλο και περισσότερο ευρεία εφαρμογή, εξαιτίας της αποτελεσματικότητάς τους στην ταυτοποίηση των ιών.

Είναι πιθανό μια μέθοδος ταυτοποίησης να εμφανίζει υψηλή ικανότητα διάκρισης μεταξύ συγγενών ιικών στελεχών και μεγάλη επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων, αλλά

να είναι πολύπλοκη και οικονομικά ασύμφορη. Γι' αυτό πρέπει στο μέλλον να δοθεί έμφαση στην απλοποίηση της μεθοδολογίας και τη μείωση του κόστους προκειμένου οι τεχνικές να γίνουν πιο προσιτές.

3. Πειραματική διαδικασία

3.1 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας με τη χρήση ηλεκτραρνητικών φίλτρων για τον εντοπισμό εντεροϊών σε λύματα. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε σε πρώτο στάδιο η μέθοδος προσρόφησης-έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα, ώστε να επιτευχθεί η συγκέντρωση των δειγμάτων. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση του ιικού RNA, αντίστροφη μεταγραφή και τέλος ενίσχυση του παραγόμενου cDNA με PCR και snPCR. Τέλος, η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της snPCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.2 Περιβαλλοντικά δείγματα

Εξετάστηκαν 22 περιβαλλοντικά δείγματα για τη παρουσία εντεροϊών. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από τον Σεπτέμβριο του 2005 έως τον Αύγουστο του 2007. Τα δείγματα προέρχονται από το Βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας (15 δείγματα), των Τρικάλων (5 δείγματα) και του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (2 δείγματα). Στο πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα περιβαλλοντικά δείγματα, ο τόπος προέλευσης και η ημερομηνία λήψης τους.

Δείγμα	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Προέλευση	Βιολογικό υλικό
LR2	8/09/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR3	6/10/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR5	25/05/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR6	16/06/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR8	13/07/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR9	19/07/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR10	2/08/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
TR1	15/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
LR11	18/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
GN2	14/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	Λύματα
GN1	21/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	Λύματα
TR2	28/11/2006	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
TR3	18/01/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
LR12	5/02/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR13	14/02/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
TR4	18/04/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
TR5	3/06/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
LR14	24/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR15	26/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LRB1	26/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Βοθρολύματα
LR16	1/08/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LRB2	1/08/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Βοθρολύματα

Πίνακας 3.1 Περιβαλλοντικά δείγματα

3.3 Συγκέντρωση περιβαλλοντικών δειγμάτων

Λόγω του μεγάλου όγκου των περιβαλλοντικών δειγμάτων και της χαμηλής συγκέντρωσης ιόν σε αυτά, προηγούνται μέθοδοι συγκέντρωσής τους πριν την απομόνωση των ιόν. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία είναι η μέθοδος έκλουσης-προσρόφησης σε ηλεκτραρνητικά φίλτρα και η μέθοδος καθίζησης με PEG. Η επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων πραγματοποιείται σε θάλαμο βιολογικής προστασίας (Biological Safety Cabinet, BSC) επιπέδου 2 (Biological Safety Level, BSL 2).

3.3.1 Μέθοδος προσρόφησης-έκλυσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα

Δείγμα όγκου 100 ml φυγοκεντρείται σε 1000rpm για 2min. Το υπερκείμενο συλλέγεται και ρυθμίζεται το pH στο 3.8 με τη προσθήκη 3N HCl. Στη συνέχεια, τα ιικά σωματίδια φορτίζονται θετικά παρουσία Mg^{2+} , με τη προσθήκη $MgCl_2$ (Merck, Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,05M. Ακολουθεί αργή ανάδευση και φιλτράρισμα σε ηλεκτραρνητικά φορτισμένο φίλτρο (MF-Millipore), διαμέτρου 47 mm και μέγεθος πόρου 3 μm , στην επιφάνεια του οποίου προσροφούνται τα ιικά σωματίδια. Το φίλτρο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο δοχείο ζέσεως 250 ml, όπου προστίθενται 10 ml διαλύματος 0.05M Tris με pH 9, εμπλουτισμένου με 3% BSA. Η έκλυση πραγματοποιείται με αργή ανάδευση για 10 min. Αφού απομακρυνθεί το διάλυμα, η διαδικασία της έκλυσης επαναλαμβάνεται. Το φίλτρο φυλάσσεται στους 4°C, ενώ ρυθμίζεται το pH του συγκεντρωμένου δείγματος στο 7 με τη χρήση διαλύματος 3N HCl. Ακολουθεί περαιτέρω συγκέντρωση του δείγματος με τη μέθοδο καθίζησης με PEG.

3.3.2 Μέθοδος καθίζησης με PEG

Στο συγκεντρωμένο δείγμα προστίθεται 10% W/V PEG6000 και NaCl (Sigma, USA) σε τελική συγκέντρωση 0,5M. Το μίγμα αναδεύεται για 18 h στους 4°C και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 11.000 rpm για 1h. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται σε 2 ml θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιιεργειών (MM).

3.4 Εκχύλιση RNA

Για την εκχύλιση του ιικού RNA από τα επεξεργασμένα περιβαλλοντικά δείγματα, εφαρμόστηκε η μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (Casas et al, 1995). Σε πλαστικό σωλήνα των 2 ml αναμιγνύονται 100μl δείγματος, 10μl γλυκογόνου (100mg/ml) και 300μl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση (vortex) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 20 min, ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών και ιικών μεμβρανών για την απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων. Στη συνέχεια, προστίθενται 400μl ισοπροπανόλης (διατηρημένης στους -20 °C). Μετά από ισχυρή ανάδευση (vortex), τα

δείγματα διατηρούνται στους -20°C για 20 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις $13.000 \times g$ (σε θερμοκρασία 4°C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αναδιαλύεται με ισχυρή ανάδευση σε 500μl αιθανόλης 70% (διατηρημένης στους -20°C). Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στις $14.000 \times g$ για 10 λεπτά. Η αιθανόλη απομακρύνεται πλήρως και το ίζημα αναδιαλύεται σε 100 μl διπλά απιονισμένου νερού (ddH₂O) (Sigma, USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών. Τα RNA των δειγμάτων φυλάχθηκαν στους -80°C , για μακροπρόθεσμη χρήση.

Διαλύματα:

Διάλυμα Θειοκυανούχου Γουανιδίνης: 4M GuSCN, 0.5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol, 25 mM sodium citrate (Merck, Germany).

3.5 Αντίστροφη Μεταγραφή

Η διαδικασία ξεκινά με την επώαση 5μl απομονωμένου RNA με 2μl τυχαίων εκκινητών (random primers) d(N)₉ (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) στους 70°C , για 5 min. Μετά την διακοπή της αντίδρασης (με άμεση μεταφορά σε πάγο) προστίθεται σε κάθε ένα από τα δείγματα, μείγμα αποτελούμενο από: 5μl διαλύματος 5x M-MLV reaction buffer, 5μl dNTPs 10mM, 20units αναστολέα ριβονουκλεασών (Ribonuclease Inhibitor) και 200 units αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA). Τέλος, προστίθεται διπλά απιονισμένο νερό (ddH₂O) (Sigma, USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών, μέχρι τελικού όγκου 20 μl. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 h για τη σύνθεση του cDNA και στους 95°C για 5 min για την απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

3.6 Εκκινητικά Μόρια

Τα εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση των εντεροϊών σχεδιάστηκαν σε συντηρημένα τμήματα της 5'UTR του γονιδιώματός τους. Για την αύξηση της ευαισθησίας σχεδιάστηκε και ένας εσωτερικός αντικωδικός εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε στη semi-nested PCR. Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση των εντεροϊών, η αλληλουχία τους, η θέση που αναγνωρίζουν πάνω στο γονιδίωμα και η πολικότητά τους.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία 5'-3'
TS1	66-85	Sense	TACC(CT)TTGTACGCCTGTTTT
TS3	582-599	Antisense	TTCTCACCATAAGCAGCC
HEV-C-9	537-558	Antisense	GGACACCCAAAGTAGTCGGTTC

Πίνακας 3.2 Εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση των εντεροϊών

Για τον έλεγχο της παρουσίας αναστολέων της PCR στα περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν εκκινητικά μόρια που στοχεύουν στο 16S RNA της *Escherichia Coli*. Η αλληλουχία τους, η θέση που αναγνωρίζουν πάνω στο γονιδίωμα και η πολικότητά τους παρουσιάζονται στο πίνακα 3.3.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία 5'-3'
P11P	1173-1192	Sense	GAGGAAGGTGGGGATGACGT
P13P	1370-1389	Antisense	AGGCCCGGGAACGTATTAC

Πίνακας 3.3 Εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση της *Escherichia Coli*

3.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Τμήματα του παραγόμενου cDNA ενισχύθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Στο πίνακα 3.4. παρουσιάζονται οι συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης που πραγματοποιήθηκαν για κάθε ζευγάρι εκκινητών.

3.7.1 PCR

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl cDNA του κάθε δείγματος, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα με συγκέντρωση 25pmol), 5 μl

10x ρυθμιστικού διαλύματος (Paq reaction buffer-Stratagene), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 0,5 μl (2,5 units) Paq DNA πολυμεράσης (Stratagene) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μl. Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του cDNA μορίου στόχου στους 95°C για 2 min και ακολουθεί η εφαρμογή των διαφορετικών, για κάθε ζεύγος εκκινητών, συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης (πίνακας 3.4). Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 5 min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

3.7.2 semi-nested PCR

Το προϊόν της PCR με τα εκκινητικά μόρια TS1-TS3 υποβλήθηκε σε semi-nested PCR χρησιμοποιώντας ως κωδικό εκκινητή τον TS1 και εσωτερικό αντικωδικό τον HEV-C-9 (πίνακας 3.3). Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl προϊόντος της PCR με τα εκκινητικά μόρια TS1-TS3, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα με συγκέντρωση 25pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Paq reaction buffer-Stratagene), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 0,5 μl (2,5 units) Paq DNA πολυμεράσης (Stratagene) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2 min και ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης (πίνακας 3.4). Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει επώαση για 5 min στους 72°C.

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
TS1-TS3	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 54 °C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec 25 κύκλοι
TS1-HEV-C-9	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 40 °C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 30sec 40 κύκλοι

Πίνακας 3.4 Συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για κάθε ζεύγος εκκινητών.

3.8 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της snPCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 1,2 gr αγαρόζης (Invitrogen, UK) και 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) προστίθενται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη και αφήνεται να κρυώσει (περίπου 40°C). Προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂), 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 290 nm. Ύστερα από καλή ανάδευση το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει και να πολυμεριστεί η αγαρόζη.

Από το προϊόν της PCR 10 μl αναμιγνύονται με 2 μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης) και μεταφέρονται στο πήκτωμα αγαρόζης. Για τον προσδιορισμό του μήκους των RT-PCR προϊόντων χρησιμοποιείται μάρτυρας μοριακού βάρους, στη συγκεκριμένη περίπτωση ο ΦX174 HaeIII (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένταση 120 Volts, 50 mA για περίπου 1 ώρα. Στη συνέχεια το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται κάτω από τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne, Hartland WI), όπου ελέγχεται και φωτογραφίζεται με Olympus digital camera.

Διαλύματα :

5x TBE: 5,4% Tris Base, 2,75% H₃BO₃ (Merck, Germany) και 10μM EDTA διαλύονται σε 1L απιονισμένο νερό.

Κυανό της βρωμοφαινόλης: 1mM EDTA, 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης (Sigma, USA), 40% σουκρόζη.

3.9 Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία εντοπισμού εντεροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα με τη χρήση ηλεκτραρνητικών φίλτρων και μοριακών τεχνικών. Αρχικά υπολογίστηκε η ευαισθησία της μεθόδου και στη συνέχεια ελέγχθηκαν 22 δείγματα λυμάτων για την παρουσία εντεροϊών. Τα δείγματα προέρχονται από την περιοχή της Λάρισας, των Τρικάλων και των Ιωαννίνων.

Στον πίνακα 3.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Δείγμα	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Προέλευση	Βιολογικό υλικό	Αποτελέσματα με snPCR
LR2	8/09/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	+
LR3	6/10/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	+
LR5	25/05/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	+
LR6	16/06/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	+
LR8	13/07/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR9	19/07/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR10	2/08/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
TR1	15/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα	+
LR11	18/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
GN2	14/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	Λύματα	-
GN1	21/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	Λύματα	+
TR2	28/11/2006	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα	-
TR3	18/01/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα	-
LR12	5/02/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR13	14/02/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
TR4	18/04/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα	-
TR5	3/06/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα	-
LR14	24/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR15	26/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LRB1	26/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Βοθρολύματα	-
LR16	1/08/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LRB2	1/08/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Βοθρολύματα	+

Πίνακας 3.5 Αποτελέσματα της μεθοδολογίας στα περιβαλλοντικά δείγματα

Στον πίνακα 3.5 φαίνονται με συν (+) τα δείγματα των λυμάτων τα οποία βρέθηκαν θετικά στην παρουσία εντεροϊών. Από τα 22 δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος, τα 7 βρέθηκαν θετικά σε εντεροϊούς.

4. Συζήτηση

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανίχνευση εντεροϊών σε λύματα με τη μέθοδος έκλουσης-προσρόφησης σε ηλεκτραρνητικά φίλτρα και τη μέθοδο της semiNested PCR. Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 3.6, παρατηρήθηκε ότι ένα ποσοστό 31.8% ήταν θετικό στην παρουσία εντεροϊών.

Η ανάπτυξης της μεθόδου έκλουσης-προσρόφησης βασίζεται σε μελέτες του Melnick και των συνεργατών του (Wallis and Melnick, 1967, Wallis et al. 1970). Η γενική αρχή είναι ότι αν ένα δείγμα που περιέχει ιό έρθει σε επαφή με ένα στερεό μέσο, τότε ο ιός μπορεί να προσροφηθεί στην επιφάνεια του μέσου αυτού, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες pH. Στη συνέχεια ο ιός μπορεί να αποδεσμευτεί από το μέσο με έκλουση σε υγρό μικρότερου όγκου.

Στην παρούσα εργασία το μέσο ήταν ηλεκτραρνητικά φορτισμένο φίλτρο (MF-Millipore), κατασκευασμένο από μείγμα οξικής και νιτρικής κυτταρίνης, διαμέτρου 47 mm και μέγεθος πόρου 3 μm . Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι ιοί και τα φίλτρα είναι αρνητικά φορτισμένα είναι απαραίτητο να μειωθεί το pH του δείγματος ώστε να επιτραπεί η ηλεκτροστατική πρόσδεση των ικών σωματίων στην επιφάνεια του φίλτρου.

Τα ηλεκτραρνητικά φίλτρα έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως για ανίχνευση ιών σε νερό βρύσης (Jakubowski et al., 1974) και δείγματα από ποτάμια (Morris and Waite, 1980). Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι παρατηρείται φράξιμο των πόρων του φίλτρου ιδιαίτερα κατά την επεξεργασία δειγμάτων θαλάσσιου νερού (Block and Schwartzbrod, 1989).

Ο Παπαβέντσης και οι συνεργάτες του (2005) ανέφεραν μια παραλλαγή της χρήσης ηλεκτραρνητικών φίλτρων με την οποία καλλιεργήθηκαν εντεροϊοί προερχόμενοι από λύματα απευθείας από το φίλτρο, χωρίς να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της έκλουσης. Η παραλλαγή αυτή είναι πολύ σημαντική, καθώς μειώνει τον ολικό χρόνο που απαιτείται για την ανάλυση του δείγματος.

Η ανίχνευση εντεροϊών σε λύματα έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες. Ο Ρανβλον και οι συνεργάτες του (2005) στη Νότια Αφρική ανίχνευσαν εντεροϊούς σε ποσοστό 42,5%. Η δειγματοληψία έγινε από τον Ιούλιο του 2000 ως τον Ιούνιο του 2002 και για την ανίχνευση εφαρμόστηκε RT-nested PCR. Επίσης στη Γερμανία ο Pusch και οι

συνεργάτες του (2005) εξέτασαν 123 δείγματα λυμάτων από βιολογικούς καθαρισμούς, στα οποία ανίχνευσαν εντεροϊούς. Τα παραπάνω αποτελέσματα πιστοποιούν την αναγκαιότητα της επεξεργασίας των λυμάτων, προκειμένου να μειωθεί το ιικό τους φορτίο.

Στην παρούσα εργασία η εποχιακή κατανομή των εντεροϊών φαίνεται να ακολουθεί το γενικό κανόνα, κατά τον οποίο η απομόνωση τους παρατηρείται συχνότερα το καλοκαίρι και στην αρχή του φθινοπώρου. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με τον Pusch και τους συνεργάτες του (2005), στη μελέτη των οποίων σε περιοχή της Γερμανίας, η παρουσία των εντεροϊών παρατηρήθηκε κυρίως τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες. Αντίθετα, στη μελέτη του τον Ehler (2005) δεν διαπιστώθηκε εποχιακή κατανομή των εντεροϊών σε δείγματα νερού που ελέγχθηκαν σε περιοχές της Νότιας Αφρικής.

Η παρούσα εργασία αφορά μια αρχική μελέτη για την ανάπτυξη και εφαρμογή μεθοδολογίας με τη χρήση ηλεκτραρνητικών φίλτρων για τον εντοπισμό εντεροϊών σε λύματα. Με την συγκεκριμένη μέθοδο επιβεβαιώθηκε η παρουσία εντεροϊών σε λύματα και έγινε εμφανής η ανάγκη ενός συστηματικότερου περιβαλλοντικού ελέγχου, με απώτερο στόχο την πραγματοποίηση ολοκληρωμένων επιδημιολογικών μελετών για την πρόληψη της δημόσιας υγείας.

Τέλος, η παρουσία εντεροϊών σε λύματα καθιστά αναγκαία την εφαρμογή όλων των σταδίων επεξεργασίας τους στις μονάδες βιολογικού καθαρισμού, ώστε να είναι δυνατή η ασφαλής επαναχρησιμοποίησή τους όπου αυτό κρίνεται απαραίτητο και να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος λοιμώξεων από την υδατογενή διασπορά των εντεροϊών.

4. Βιβλιογραφία

Andino R., Rieckhof G.E., Trono D. and Baltimore D. (1990). Substitutions in the protease (3Cpro) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 5' noncoding region. *J. Virol.* 64: 607-12.

Appleton H. and Pereira MS. 1977. A possible virus aetiology in outbreaks of food poisoning from cockles. *Lancet* 1(801 5):780-781.

Arens M. 1999. Methods for subtyping and molecular comparison of human viral genomes. *Clin Microbiol Rev* 12, 612-626.

Barco A., Carrasco L. (1995). A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 3349-64.

Barton J. David, Brian J. O'Donnell and James B. Flanagan, 2001, 5' cloveleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis, *The EMBO Journal*, Vol 20(6), p.1439-1448

Baxter J. Nicola, Andreas Roetzer, Hans-Dieter Liebig, Svetlana E. Sedenikova, Andrea M. Hounslow, Tim Skern, and Jonathan P. Waltho, 2006, Structure and Dynamics of Coxsackie B4 2A Proteinase, an Enzyme Involved in the Etiology of Heart Disease, *J Virol*, Vol.80(3), p.1451-1462

Beavers P.D. and Gardner E.A. 1993. Prediction of virus transport through soils. *Proc. 15th Fed. Conv. AWWA*, 530-535.

Block JC, Schwartzbrod L. *Viruses in Water Systems. Detection and Identification*. New York: VCH Publishers, Inc.; 1989

Blomqvist S, Savolainen C, Laine P, Hirttio P, Lamminsalo E, Penttila E, Joks S, Roivainen M, Hovi T. (2004). Characterization of a highly evolved vaccine-derived poliovirus type 3 isolated from sewage in Estonia. *J. Virol.* 78(9):4876-83.

Bolanaki E., Kottaridi C., Dedepsidis E., Kyriakopoulou Z., Pliaka V., Pratti A., Levidiotou-Stefanou S., Markoulatos P. (2008). Direct extraction and molecular characterization of enteroviruses genomes from human faecal samples. *Mol. Cell. Probes*, 22 (3) :156-161.

Boussadia O., Niepmann M., Creancier L., Prats A.C., Dautry F., Jacquemin-Sablon H. (2003). Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *J. Virol.* 77(6): 3353-3359.

Brown B., S. Oberste, K. Maher, and M. Pallansch. 2003. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* 77(16):8973-8984.

Caro V., Guillot S., Delpeyroux and Crainic R. 2001. Molecular strategy for "serotyping" of human enteroviruses. *J Gen Virol* 82, 79-91.

CDC, Enterovirus outbreak in Taiwan, June 8, 1998

CDC Weekly Report, Enterovirus Surveillance --- United States, 1997—1999, October 13, 2000 / 49(40):913-6

Clark M.E. and Dasgupta A. (1990). A transcriptionally active form of TFIIC is modified in poliovirus-infected HeLa cells. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5106-5113.

Cochi SL, Hull HF, Ward NA. (1995). To conquer poliomyelitis forever. *Lancet.* 345(8965):1589-90.

Costa-Mattioli M., Svitkin Y., Sonenberg N. (2004). La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol. Cell Biol.* 24(15): 6861-70.

Craun G.F. & Calderon R. 1996. Microbial Risks in Groundwater Systems: Epidemiology of Waterborne Outbreaks. Under the Microscope, Examining Microbes in Groundwater. AWWA Res.Fdn.,Denver.

Cuervo NS, Guillot S, Romanenkova N, Combiescu M, Aubert-Combiescu A, Seghier M, Caro V, Crainic R, Delpeyroux F. (2001). Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J. Virol.* 75(13):5740-51.

Das S. and Dasgupta A. (1993). Identification of the cleavage site and determinants required for poliovirus 3CPro-catalyzed cleavage of human TATA-binding transcription factor TBP. *J. Virol.* 67: 3326-31.

Dedepsidis E., Kyriakopoulou Z., Plaika V., Kottaridi C., Bolanaki E., Stefanou – Levidiotou S., Komiotis D., Markoulatos P. (2007) .Retrospective characterization of a vaccine – derived Poliovirus Type 1 isolate from sewage in Greece. *Applied Environmental Microbiology* , 73: 6697-6704.

Dedepsidis E., Plaika V., Kyriakopoulou Z., Bracoulias C., Stefanou – Levidiotou S., Pratti A., Markoulatos P. (2008). Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/ Sabin 2 capsid recombinant . *FEMS Immunol Med Microbiol* ,52 : 343-351.

Deshpande JM, Shetty SJ, Siddiqui ZA (2003). Environmental surveillance system to track wild poliovirus transmission. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5):2919-27.

Dotta Francesco, Stefano Censini, Astrid G. S. van Halteren, Lorella Marselli, Matilde Masini, Sabrina Dionisi, Franco Mosca, Ugo Boggi, Andrea Onetti Muda, Stefano Del

Prato, John F. Elliott, Antonello Covacci, 2007, Caxsackie B4 virus infection of β cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients, PNAS, Vol.104(12), p.2115-5120

Ehlers M.M., Grabow W.O.K. and Pavlov D.N. 2005. Detection of enteroviruses in untreated and treated drinking water supplies in South Africa. *Water Res* 39, 2253-2258.

England B.L. 1982. Detection of viruses on fomites. In: *Methods in Environmental Virology*. New York: Marcel Dekker, Inc. 179-220.

Fujioka R.S. & Ackermann W.W. 1975. The inhibitory effects of MgCl₂ on the inactivation kinetics of poliovirus by urea. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148:1063.

Georgescu MM, Delpeyroux F, Crainic R. (1995). Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J. Gen. Virol.* 76:2343-8.

Georgopoulou A, Markoulatos P. (2001). Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(11):792-9.

Gerba C.P 1975. Fate of wastewater bacteria and viruses in soil. *Journal of the Irrigation and Drainage Division. Proceedings of the American Society of Civil Engineers.* 101(IR3):157-174.

Gerba C.P. 1984. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Advances in Applied Microbiology* 30:133-168.

Girones R. 1989. Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Can J Microbiol.* 35:1015-1021.

Goodfellow I., Chaudhry Y., Richardson A., Meredith J., Almond J.W., Barclay W., Evans D.J. (2000). Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.* 74(10): 4590-600.

Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Donchenko A.P., Blinov V.M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17: 4713-30.

Greve J.M., Davis G., A.M. et al. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 1989, 63:36-42

Griffin DW, Donaldson KA, Paul JH, Rose JB. (2003). Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(1):129-43. Review.

Guardabassi L., Dalsgaard A. and Sobsey M. 2003. Occurrence and survival of

viruses in composted human faeces. Sustainable urban renewal and wastewater treatment No. 32 2003.

Guillot S, Caro V, Cuervo N, Korotkova E, Combiescu M, Persu A, Aubert-Combiescu A, Delpyroux F, Crainic R. (2000). Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 74(18):8434-43.

Gunn RA, Janowski HT, Lieb S, Prather EC, Greenberg HB. 1982. Norwalk virus gastroenteritis following raw oyster consumption. *Am J Epidemiol* 115:348-351.

Haefliger D., Hubner P. and Luthy J. 2000. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int J Food Microbiol* 54, 123-126.
Hellen CU, Fäcke M, Kräusslich HG, Lee CK, Wimmer E, Characterisation of poliovirus 2A proteinase by mutational analysis: residues required for autocatalytic activity are essential for induction of cleavage of eukaryotic initiation factor 4F polypeptide p220, 1991, *J. Virol.*, 65:4226-4231.

Holmes P.R. 1989. Research into health risks at bathing beaches in Hong Kong. *Journal of the Institution of Water and Environmental Management* 3, 488-495.

Hurst C.J. 1988. Influence of aerobic microorganisms upon virus survival in soil. *Can. J. Microbiol.* 34: 696-699.

Jakubowski W, Hoff JC, Anthony NC, Hill WF. Epoxy-fiberglass adsorbent for concentrating viruses from large volumes of potable water. *Appl Microbiol* 1974; 28: 501.

Jockusch S. 1996. Photo-induced inactivation of viruses: Adsorption of methylene blue, thionine and thiopyronine on QB bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7446-7451

Karakasiliotis I, Markoulatos P, Katsorchis T. (2004). Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol. Cell Probes.* 18(2):103-9.

King A.M.Q., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypia T., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Palmenberg A.C., Skern T. and Stanway G. (2000). Picornaviridae. In "Virus Taxonomy, Seventh Report of International Committee for the Taxonomy of Viruses" (M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, C.H. Calisher, E.B. Carsten, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Malinoff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and P.B. Wickner, Eds), pp 657-673 Academic Press, New York, San Diego.

Knipe, David M.; Howley, Peter M., *Fields Virology*, 5th Edition, Copyright B©2007 Lippincott Williams & Wilkins

Koopmans J.S., Eckert E.A., Greenberg H.B., Strohm B.C., Isaccson R.E. & Monto A.S. 1982. Norwalk virus enteric illness acquired by swimming exposure.

American Journal of Epidemiology. 155. 173-177.

Lamphear B.J., Kirchweger R., Skern T., Rhoads R.E. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol Chem.* 270(37): 21975-83.

Li J. P. and Baltimore D., (1988). Isolation of poliovirus 2C mutants defective in viral synthesis. *J. Virol.* 62: 4016-4021.

Liu HM, Zheng DP, Zhang LB, Oberste MS, Kew OM, Pallansch MA. (2003). Serial recombination during circulation of type 1 wild-vaccine recombinant polioviruses in China. *J. Virol.* 77(20):10994-1005.

Mapoles J.E., Krahl D.L., Crowell R.L. Purification of a HeLa cell receptor protein for group B coxsackievirus. *J. Virol.* 1985, 55: 560-566).

Melchers J.G. Willem, Jan Loll, Marco Tessari, Denis V. Bakhmutov, Anatoly P. Gmyl, Vadim I. Agol, Hans A. Heus, 2006, A GCUA tetranucleotide loop found in the poliovirus *oriL* by in vivo SELEX (un)expectedly forms a YNMG-like structure: Extending the YNMG family with GYYA, RNA, Vol.12, p.1671-1682

Melnick J.L. (1996). Current status of poliovirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 293-300. Review.

Melnick J.L. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology*, Second Edition (ed. Fields B.N.) 1990:549-605

Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. (1995). Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.*;49:461-87. Review.

Morasco B.J., Sharma N., Parilla J., Flanagan J.B. (2003). Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(9): 5136-44.

Morris R, Waite WM. Evaluation of procedures for the recovery of viruses from water—I Concentration systems. *Water Res* 1980; 14: 791–793.

Muir Peter, Ulrike Kämmerer, Klaus Korn, Mick N. Mulders, Tuija Pöyry, Benedikt Weissbrich, Reinhard Kandolf, Graham M. Cleator, and Anton M. van Loon for The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis, Molecular Typing of Enteroviruses: Current Status and Future Requirements, *Clin Microbiol Rev.* 1998 January; 11(1): 202–227

Murray K.E., Roberts A.W. and Barton D.J. (2001). Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. *RNA* 7: 1126-1141.

Nakajima M. 2003. Adhesion and releasing of Poliovirus to activated sludge of

wastewater purifying plants. *Water Sci. Technol.* 47(9):117-121.

Oberste M. Steven, Kaija Maher, Alford J. Williams, Naomi Dybdahl-Sissoko, Betty A. Brown, Michelle S. Gookin, Silvia Panaranda, Nada Mishrik, Moyez Uddin and Mark A. Pallansch, 2006, Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses, *Journal of General Virology*, Vol.87, p.119-128

Ochs K., Saleh L., Bassili, G., Sonntag V., Zeller A., Niepmann M., (2002). Interaction of translation factor eIF4B with poliovirus internal ribosome entry site. *J. Virol.* 76(5) : 2113 – 2122.

Olson N.H., Kolatkar P.R., Oliveira M.A. et al, Structure of a human rhinovirus complexed with its receptor molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993, 90: 507-511

Oprisan G, Combiescu M, Guillot S, Caro V, Combiescu A, Delpeyroux F, Crainic R. (2002). Natural genetic recombination between co-circulating heterotypic enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 83(Pt 9):2193-200.

Pallin R, Wyn-Jones AP, Place BM, Lightfoot NF. (1997). The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 67(1):57-67.

Palmenberg A.C. Comparative organisation and genome structure in Picorna viruses. In *Positive Strand RNA Viruses*, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series (eds. M.A. Brinton & R. Rueckert) 1987, 54:25-34

Papaventsis D, Siafakas N, Markoulatos P, Papageorgiou GT, Kourtis C, Chatzichristou E, Economou C, Levidiotou S. Membrane adsorption with direct cell culture combined with reverse transcription-PCR as a fast method for identifying enteroviruses from sewage. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 72–79

Parker V. Louise and Martel C. James 2002. Long term survival of enteric microorganisms in frozen wastewaters. Technical Report ERDC/CRREL TR-02-16. US Army Corps of Engineers.

Paul A.V., van Boom J.H., Filipov D. and Wimmer E. (1998). Protein primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* 393: 280-284.

Pavlov D.N., van Zyl W.B., van Heerden and Ehlers M.M. 2005. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in sewage and river water in South Africa. *Water Res* (in press).

Paximadi E., Karakasiliotis I., Papaventsis D., Papageorgiou G., Markoulatos P. (2008). Recombinant Sabin environmental isolates in Greece and Cyprus. *Journal of Applied Microbiology* , 104 (4): 1153-1162.

Pfister T., and Wimmer E., (1999). Characterization of nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* 274: 6992-7001.

Pollard M. & Connolly J. 1949. pH stability of MME poliomyelitis. Texas Rept. Biol. Med. 7:92-95.

Poyry T, Stenvik M, Hovi T. (1988). Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(2):371-4.

Pusch D., Oh D.Y., Wolf S., Dumke R., Schroter-Bobsin U., Hohne M., Roske L. and Schreier E. 2005. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch Virol* 150, 929-947.

Sair A.I., D'Souza D.H. and Jaykus L.A. 2002. Human enteric viruses as causes of foodborne disease. *Compr Rev Food Sci Food Safety* 1, 73-89.

Sedmak G, Bina D, MacDonald J. (2003). Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from Milwaukee, Wisconsin, collected August 1994 to December 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(12):7181-7.

Shafren D.R., Dorahy D.J., Ingham R.A. et al. Coxsackievirus A21 binds to DAF but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J. Virol.* 1997, 71: 4736-4743.

Sharma Nidhi, Brian J. O'Donnell, and James B. Flanagan, 2005, 3'-Terminal Sequence in Poliovirus negative-strand templates is the primary *cis*-acting element required for VPgpUpU-primed positive-strand initiation, *J. Virol.*, Vol 79(6), p.3565-3577

Shieh YS, Baric RS, Sobsey MD. (1997). Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11):4401-7

Siafakas Nikolaos, Panayotis Markoulatos, Glyn Stanway, 2002, Molecular Classification of Coxsackie A Viruses on the Basis of the 5'-UTR: Structural and Evolutionary Aspects, *J Mol Evol*, Vol.55, p.638-652

Smith E.M., Gerba C.P. and Melnick J.L. 1978. Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:685-689.

Sobsey M.D. 1975. Studies on the survival and fate of enteroviruses in an experimental model of a municipal solid waste landfill and leachate. *Appl. Microbiol.* 30(4):565-574.

Sobsey M.D. and Meschke J.S. 2003. Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of faecal or respiratory origin. Draft – August 21, 2003.

- Stanway G., Hughes P.J., Mountford R.C., Minor P.D. and Almond J.W. (1984). The complete nucleotide sequence of a common cold virus; human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res.* 12:7859-7875.
- Stanway G. (1990). Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* 71: 2483-2501. Review.
- Toyoda H., Nicklin M.J., Murray M.G., Anderson C.W., Dunn J.J., Studier F.W. and Wimmer E. (1986). A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell.* 45: 761-70.
- Tsang S.K., McDermott B.M. , Racaniello V.R., Hogle J.M.(2001). Kinetic Analysis of the Effect of Poliovirus Receptor on Viral Uncoating: the Receptor as a Catalyst. *J. Virol.* 75(11): 4984-4989.
- Ward T., Pipkin P.A., Clarkson N.A. et al. Decay-accelerating factor CD55 is identified as the receptor of echovirus 7. *EMBO J.* 1994, 13: 5070-5074
- Wimmer, E., C. U. T. Hellen, and X. M. Cao. 1993. Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* 27:353-436
- Wallis C, Melnick JL. Concentration of viruses from sewage by adsorption on to Millipore membranes. *Bull World Health Organ* 1967a; 36: 219–225.
- Wallis C, Melnick JL. Concentration of viruses on aluminium and calcium salts. *Am J Epidemiol* 1967b; 85: 459–468.
- Wallis C, Melnick JL. Concentration of viruses on membrane filters. *J Virol* 1967c; 1: 472–477.
- Wang J., Bakkens J., Galama J., Bruins Slot H., Pilipenko E.V., Agol V.I., Melchers W. (1999). Structural requirements of the higher order RNA kissing element in the enteroviral 3'UTR. *Nucleic Acids Res.* 27: 353-436.
- Wessels Els, Daniel Duijsing, Richard A. Notebaart, Willem J. G. Melchers and Frank J. M. van Kuppeveld, 2005, A Proline-Rich Region in the Coxsackievirus 3A Protein Is Required for the Protein To Inhibit Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Transport, *J of Virol*, Vol 79(8), p.5163-5173
- Wilhem SW, Jeffrey WH, Suttle CA, and Mitchell DL. 2002. Estimation of biologically damaging UV levels in marine surface waters with DNA and viral dosimeters. *Photochem Photobiol.* 76(3):268-273.
- Zell, R., and A. Stelzner. 1997. Application of genome sequence information to the classification of bovine enteroviruses: the importance of 5'- and 3'-nontranslated regions. *Virus Res.* 51:213-229

