

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**PCR Arrays για την ανίχνευση και  
τον μοριακό χαρακτηρισμό των  
Coxsackie B ιών**

Τσαχουρίδου Ουρανία  
Λάρισα 2013

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ**

**Z. ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ (επιβλέπουσα):**  
**ΕΙΔΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ (ΕΕΔΠ)**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ:**  
**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ**  
**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ:**  
**ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σεπτέμβρης 2012...Η πρώτη μέρα στο εργαστήριο ιολογίας θα μου μείνει αξέχαστη.Είχα τόσο ενθουσιασμό αλλά ταυτόχρονα και πολύ άγχος. Όλα γύρω μου φάνταζαν τόσο άγνωστα αλλά σινάμα και τόσο οικεία. Ένιωθα ότι πραγματικά βρισκόμουν στο μέρος όπου έπρεπε να είμαι. Είχα κάνει τη σωστή επιλογή και απευθύνθηκα στον κ.Μαρκουλάτο για την εκπόνηση της Πτυχιακής μου εργασίας. Δεν θα ξεχάσω την ημέρα εκείνη που μου είπε η κα.Κυριακοπούλου να κάνω από μόνη μου ένα ολόκληρο πείραμα...Τα χέρια μου έτρεμαν, τα γάντια δεν έλεγαν να ξεκολλήσουν και η καρδιά μου με τα βίαια κρατιόταν στη θέση της. Ήταν πολύ σημαντικό για μένα και αμέσως τηλεφώνησα στους γονείς μου να τους διηγηθώ με ένταση και πάθος το κατόρθωμά μου. Μπορώ να πω ότι στεναχωρήθηκα που τελείωσε...Είχα αποκτήσει μια καθημερινή επαφή με το εργαστήριο και μου άρεζε πολύ. Όμως με το πέρας αυτής της εργασίας ήρθε και το πτυχίο οπότε ήταν διπλή η ικανοποίησή μου. Απέκτησα πολλά, γνώσεις, εμπειρίες, φιλίες, και προσδοκώ νέες προκλήσεις. Για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που συνέβαλαν στη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον κ.Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την καθοδήγησή του, αλλά και για την καθημερινή παρουσία του στο εργαστήριο και το ενδιαφέρον του για την πρόοδο μου. Ένας άνθρωπος καλοσυνάτος, γεμάτος ήθος και ευγένεια.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ αξίζει η κα.Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα για την πολύτιμη βοήθειά της, την στήριξή της, την ενεργή παρουσία της όλους αυτούς τους μήνες και την άριστη συνεργασία της.

Θα ήταν λάθος μου να μην αναφερθώ στον Τηλέμαχο Δημητρίου που όλους αυτούς τους μήνες ήταν καθημερινά παρών στο εργαστήριο και έτοιμος να μου λύσει κάθε απορία, να με διδάξει και να καθοδηγήσει τα βήματα μου.Ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους αξιόλογους συναδέλφους μου Ειρήνη Ρούτερ και Δημήτρη Τσακογιάννη για την επιστημονική τους συνεισφορά αλλά και για τη δημιουργία ενός πολύ οικείου περιβάλλοντος εργασίας. Σας ευχαριστώ λοιπόν όλους!

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Coxsackie B ιοί αποτελούν μέλη του γένους των εντεροϊών. Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια των Picornaviridae, η οποία περιλαμβάνει μικρούς RNA ιούς θετικής πολικότητας μήκους ~7500 νουκλεοτιδίων. Προκαλούν μια ευρεία ποικιλία συμπτωμάτων ως αποτέλεσμα της προσβολής του κεντρικού νευρικού συστήματος, του μυοκαρδίου, των σκελετικών μυών, του παγκρέατος, του δέρματος και των βλεννοδών μεμβρανών. Παρά την ευρέως διαδεδομένη φύση των λοιμώξεων από εντεροϊούς και τη μεγάλη ποικιλία των κλινικών τους συμπτωμάτων, υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοσή τους. Οι εντεροϊοί μεταδίδονται σε συνθήκες φτώχης υγιεινής και μπορούν να επιζήσουν ακόμα και σε συνθήκες εξαιρετικά χαμηλών θερμοκρασιών. Η διάγνωση της μόλυνσης με εντεροϊούς και ο χαρακτηρισμός τους μπορεί να είναι πολύπλοκη διαδικασία, είτε λόγω περιορισμών των διαγνωστικών μεθόδων είτε λόγω των βιολογικών και επιδημιολογικών χαρακτηριστικών των εντεροϊών. Λόγω του υψηλού ρυθμού μεταλλάξεων και της ύπαρξης γεγονότων ανασυνδυασμού απαιτείται πλέον ο ταυτόχρονος μοριακός χαρακτηρισμός διαφόρων περιοχών του γενόματός τους. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση εκκινητικών μορίων που στοχεύουν σε διάσπαρτες περιοχές του γονιδιώματός των Coxsackie B ιών και ο έλεγχός τους στα έξι πρότυπα και σε δώδεκα κλινικά στελέχη τα οποία ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο. Η γρήγορη ανίχνευση και ταυτοποίησή τους, επιτυγχάνεται πλέον με την εφαρμογή των σύγχρονων μοριακών μεθόδων RT-PCR, στοχεύοντας και ενισχύοντας τμήματα σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματός τους. Για τις διαδικασίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν 6 ζεύγη κατάλληλων εκκινητών στοχεύοντας σε έξι διαφορετικές περιοχές του ιικού γενόματος. Τα αποτελέσματα για τα πρότυπα στελέχη ήταν απολύτως ικανοποιητικά και για τα έξι ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και για την ευαισθησία που παρουσίασαν. Όσον αφορά στα κλινικά στελέχη τρία ζεύγη ήταν εξίσου αποδοτικά όσο και στα πρότυπα, ενώ τα υπόλοιπα τρία δεν κατάφεραν να ενισχύσουν όλα τα δείγματα που δοκιμάστηκαν. Η ενίσχυση διαφόρων γονιδιακών τόπων διευκολύνει τον σχεδιασμό νέων εκκινητών στο γονιδίωμα δίνοντας την δυνατότητα για τον μοριακό χαρακτηρισμό και την συγκέντρωση πληροφοριών από όλο το γονιδίωμα οποιουδήποτε στελέχους Coxsackie B.

## ABSTRACT

Coxsackie B viruses are members of the Enteroviruses genus belonging to the Picornaviridae family, which includes small nonenveloped RNA positive-stranded (ssRNA) viruses, with a genome length of 7500 nucleotides. Picornaviridae are responsible for a wide variety of symptoms as a result of the infection of the central nervous system, myocardium, skeletal muscle, pancreas, skin and mucous membranes. Despite the widespread nature of enteroviruses infections and the wide variety of their clinical symptoms, there are certain factors like age, gender and socio-economic status, which play an important role in their transmission. Enteroviruses are transmitted under poor hygiene conditions and can survive even under conditions of cold temperatures. The detection and identification of enteroviruses is a complex process, either because of limitations in diagnostic tools or because of biological and epidemiological features of enteroviruses. Furthermore, enteroviral genome evolves rapidly due to the accumulation of mutations and recombination events. Thus, in order to characterize an enteroviral strain information in several parts of the genome is required. In the present study the detection and molecular characterization of all six prototype Coxsackie B viruses and in twelve clinical strains is reported. The rapid detection and identification of Coxsackie B viruses, as well as all enteroviruse serotypes, is now achieved with the application of molecular methods such as RT-PCR, targeting and amplifying several parts of the viral genome. In the present study, six primer pairs were selected for the amplification of six genomic regions of all six prototype and twelve clinical strains of Coxsackie B viruses. Out of the six pairs of primers that were tested, all of them worked equally well in all prototype strains. In clinical strains, three of the primer pairs were incapable to amplify the targeted genomic region. The amplification of various genetic parts of enteroviruses will facilitate the design of new primers, making possible the molecular characterization and the collection of information from the whole genome of any Coxsackie B strain .

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ταξινόμηση

#### 1.2 Δομή και οργάνωση του γονιδιώματος Εντεροϊών

1.2.1 Δομή καψιδίου

1.2.2 Δομή γονιδιώματος

1.2.3 5'-Αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR)

1.2.4 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)

1.2.4.1 Ιδιότητες λειτουργικών και μη λειτουργικών πρωτεϊνών

1.2.5 3'-Αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR)

#### 1.3 Υποδοχείς Εντεροϊών

#### 1.4 Κύκλος ζωής Εντεροϊών

1.4.1 Προσκόλληση στους κυτταρικούς υποδοχείς

1.4.2 Είσοδος του ιού στο κύτταρο-απελευθέρωση του γενώματός του στο εσωτερικό

1.4.3 Μετάφραση ιικού RNA- Πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης

1.4.4 Αντιγραφή ιικού γενώματος

1.4.5 Συναρμολόγηση και ωρίμανση των νέων ιικών σωματίων

1.4.6 Απελευθέρωση ώριμων ιικών σωματίων.

#### 1.5 Παθογένεια

1.5.1 Έκθεση και Μηχανισμοί Λοίμωξης

1.5.2 Πρωτοβάθμια συμπτώματα της νόσου και επιπτώσεις

#### 1.6 Εξέλιξη των Εντεροϊών

1.6.1 Μεταλλάξεις

1.6.2 Ανασυνδυασμός

#### 1.7 Επιδημιολογία

1.7.1 Ηλικία

1.7.2 Φύλο

1.7.3 Συχνότητα εμφάνισης της νόσου

#### 1.8 Εργαστηριακή Διάγνωση

#### Στόχος της Εργασίας

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

**2.1 Πρότυπα και κλινικά στελέχη**

**2.2 Υπολογισμός ιικού τίτλου και σειριακές αραιώσεις**

**2.3 Εκχύλιση ιικού RNA**

**2.4 Εκκινητικά Μόρια**

**2.5 Αντίστροφη Μεταγραφή (RT)**

**2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)**

**2.6.1 Auto-nested PCR**

**2.7 Ηλεκτροφόρηση Προϊόντων της PCR**

## **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

**3.1 Αποτελέσματα PCR –Πρότυπα στελέχη**

**3.2 Αποτελέσματα PCR –Κλινικά στελέχη**

**3.3 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας**

## **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## **5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ταξινόμηση

Το γένος των εντεροϊών της οικογένειας Picornaviridae αποτελείται από πάνω από 300 ορότυπους ( **Πίνακας 1**), οι περισσότεροι των οποίων είναι γνωστά ανθρώπινα παθογόνα και κυκλοφορούν ευρέως σε όλο τον κόσμο. Η οικογένεια των Picornaviridae απαρτίζεται από μία μεγάλη ομάδα μικρών, μη-ελυτροφόρων, μονόκλωνων RNA – ιών θετικής πολικότητας. Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη αναφορά της Διεθνούς Επιτροπής Ταξινόμησης των Ιών ( International Committee of Taxonomy of Viruses-ICTV) οι Εντεροϊοί (Enteroviruses) αποτελούν ένα από τα δώδεκα γένη της οικογένειας αυτής. Οι Picorna ιοί ταξινομούνται στα εξής δώδεκα γένη: τους *Aphthoviruses*, τους *Avihepatoviruses*, τους *Cardioviruses*, τους *Enteroviruses*, τους *Erboviruses*, τους *Hepatoviruses*, τους *Kobuviruses*, τους *Parechoviruses*, τους *Sapeloviruses*, τους *Senecaviruses*, τους *Tescoviruses* και τους *Tremoviruses* (Knowles et al., 2012).

Κάθε γένος αποτελείται από αντιγονικά διακριτά στελέχη τα οποία διακρίνονται με βάση τις ομοιότητες στις φυσικοχημικές ιδιότητες του ισοματίου, της γενωμικής αλληλουχίας, της οργάνωσης του γονιδιώματος αλλά και λοιπές φυσικοχημικές ιδιότητές τους όπως η ιδανική θερμοκρασία πολλαπλασιασμού και η επιτρεπτή οξύτητα του περιβάλλοντός τους. Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί αποτελούνται από 80 αντιγονικά διακριτούς ορότυπους, οι οποίοι με βάση τις ασθένειες που προκαλούν στους ανθρώπους αλλά και την παθογένειά τους στα πειραματόζωα κατηγοριοποιούνται σε 8 είδη, 4 από τα οποία παρουσιάζουν παθογένεια στον άνθρωπο: οι Πολιοϊοί (PV, ορότυποι 1-3), οι Coxsackie A (CAV, ορότυποι 1-24), οι Coxsackie B (CBV, ορότυποι 1-6) και οι Echo ιοί (E, ορότυποι 1-33) (Knipe and Howley, et al., 2007). Παρά τη σημαντικότητα των αντιγονικών ιδιοτήτων, με την ανάπτυξη μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης το ταξινομικό σύστημα εξελίχθηκε, με αποτέλεσμα το γένος των εντεροϊών να χωρίζεται σε 12 είδη εκ των οποίων τα επτά προσβάλλουν τον άνθρωπο ( **Εικόνα 2**). Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί πλέον ταξινομούνται σε τέσσερα είδη HEVA-HEVD.

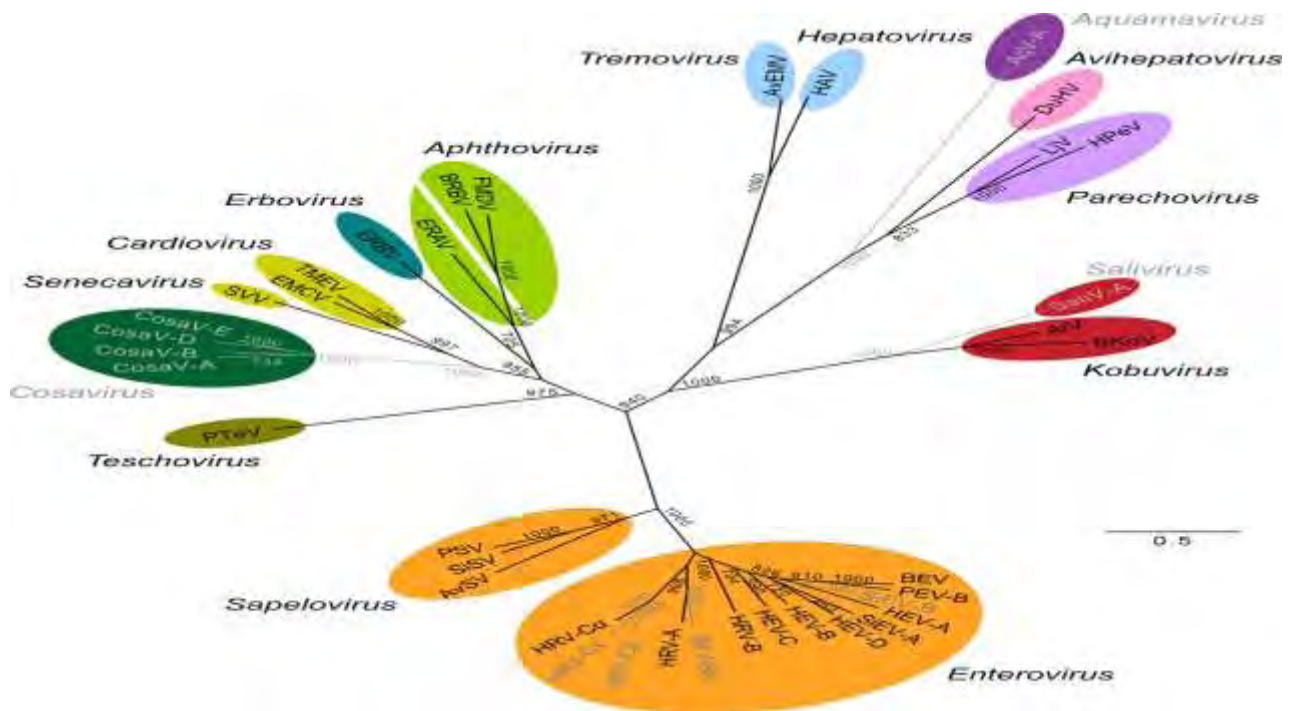


**Εικόνα 1:** Coxsackie B4 virus.

Οι Coxsackie B ιοί (CVB) αποτελούν μία από τις υποοικογένειες των εντεροϊών και έχουν συσχετιστεί με μια ποικιλία ασθενειών του ανθρώπου που κυμαίνονται από



συμπτώματα κοινού κρυολογήματος, ήπια γαστρεντερική δυσφορία έως και περικαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, παγκρεατίτιδα και μηνιγγίτιδα. Οι Coxsackie B ιοί κατατάσσονται στην ομάδα Β των ανθρώπινων εντεροϊών και έχουν αναγνωριστεί έξι ανοσολογικά διακριτοί ορότυποι (CV-B1,CV-B2,CV-B3,CV-B4,CV-B5,CV-B6), ( Knipe et al., 1985, King et al., 2000).



**Εικόνα 2:** Απεικόνιση φυλογενετικών σχέσεων και αποστάσεων μεταξύ των μελών της οικογένειας των Picornaviridae (Lauber Chris et al., 2012).

Είδη	Ορότυποι
<b>Enterovirus A</b>	23 : coxsackievirus A2:CV-A2-CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16 enterovirus (EV):A71, EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A92, EV-114, EV-A119, SV19, SV43, SV46 & BA13
<b>Enterovirus B</b>	60 : coxsackievirus B1:CV-B1-CV-B6, CV-A9, echovirus 1 (E-1; incl. E-8), E-2-E-7, E-9 (incl. CV-A23), E-11-E-21, E-24-E-27, E-29-E-33 enterovirus B69 (EV-B69), EV-B73-EV-B75, EV-B77-EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110 & SA5
<b>Enterovirus C</b>	23 : poliovirus (PV) 1, PV-2, PV-3, coxsackievirus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20-CV-A22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117 & EV-118
<b>Enterovirus D</b>	5 : enterovirus D68 (EV-D68), EV-D70, EV-D94, EV-D111 & EV-D120
<b>Enterovirus E</b>	4 (proposed): enterovirus E1 (EV-E1), EV-E2, EV-E3 & EV-E4
<b>Enterovirus F</b>	6 (proposed): enterovirus F1 (EV-F1), EV-F2, EV-F3, EV-F4, EV-F5 & EV-E6
<b>Enterovirus G</b>	6 : enterovirus (EV) G1 to G6 (formerly porcine enterovirus 9-10, 14-16 & ovine enterovirus 1)
<b>Enterovirus H</b>	1 : enterovirus H1 (EV-H1)
<b>Enterovirus J</b>	6 : simian virus 6 (SV6), enterovirus J103 (EV-J103), EV-J108, EV-J112, EV-J115 and EV-J121
<b>Rhinovirus A</b>	77 : human rhinovirus (HRV) A1, A2, A7-A16, A18-A25, A28-A34, A36, A38-A41, A43-A47, A49-A551, A53-A68, A71, A73-A78, A80-A82, A85, A88-A90, A94-A96, A98, A100-A103
<b>Rhinovirus B</b>	25 : human rhinovirus (HRV) B3-B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91-B93, B97 and B99
<b>Rhinovirus C</b>	51 : human rhinovirus (HRV) C1-C51

**Πίνακας 1:** Ταξινόμηση όλων των οροτύπων των Εντεροϊών.

## 1.2 Δομή και οργάνωση γονιδιώματος Εντεροϊών

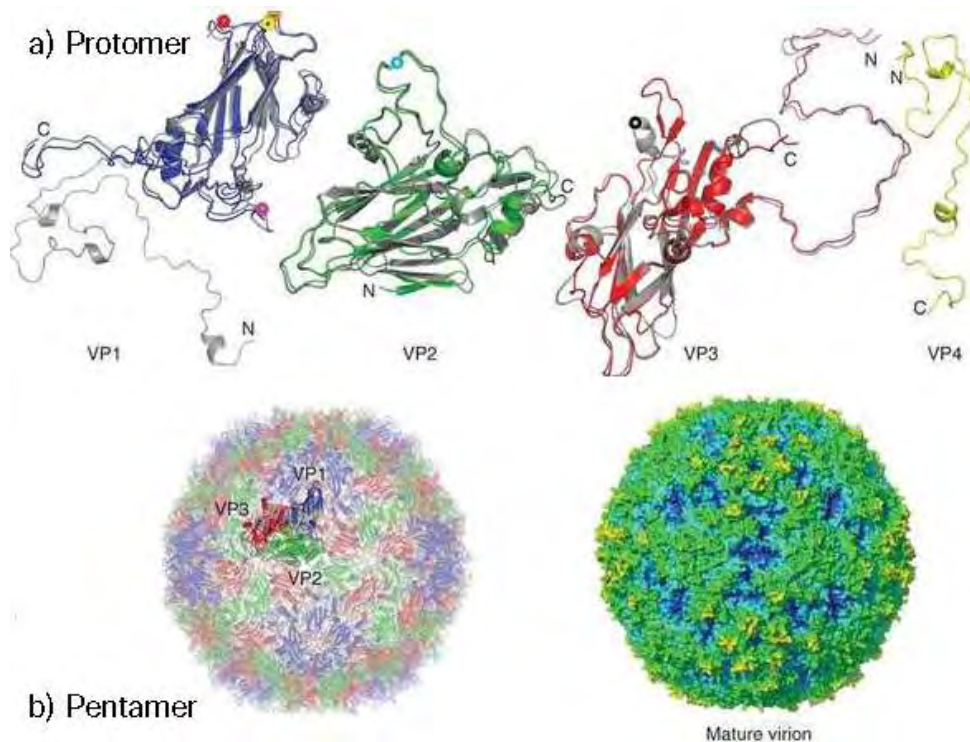
### 1.2.1 Δομή καψιδίου

Το γονιδίωμα των εντεροϊών περιβάλλεται από ένα σχετικά μικρό (30nm), μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικής συμμετρίας πρωτεϊνικό καψίδιο, το οποίο αποτελείται από 60 αντίγραφα τεσσάρων πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες προκύπτουν από πρωτεόλυση της ιϊκής πολυπρωτεΐνης (Rueckert R.R., 1985). Η συγκρότηση του ώριμου καψιδίου γίνεται μέσω των ονομαζόμενων πρωτομερών, τα οποία απαρτίζονται από αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης, της VP0 στην οποία οι VP4 και VP2 είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες και αποτελούν τη βασική μονάδα του καψιδίου (Rossman et al., 1989). Τα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3 και VP1 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και από την συσσωμάτωση των πρωτομερών τους σχηματίζονται τα πενταμερή (VP0, VP3,VP1)<sub>5</sub>]. Δώδεκα από αυτά τα πενταμερή συναρμολογούνται για να σχηματίσουν το «προκαψίδιο» [(VP0,VP3,VP1)<sub>5</sub>]<sub>12</sub>. Κατά το στάδιο της καψιδίωσης όπου το RNA «πακετάρεται» στα ιικά σωματίδια, πραγματοποιείται η «αντίδραση ωρίμανσης». Η διάσπαση της VP0 στις VP4 και VP2 αποτελεί το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του γενετικού υλικού στο καψίδιο και της σταθεροποίησης του ώριμου πλέον ιού. Οι VP1, VP2 και VP3 σχηματίζουν το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου, ενώ η VP4, που είναι η μικρότερη από τις καψιδιακές πρωτεΐνες, βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου, κάτω από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες (Stanway G, 1990, Racaniello 2007). ( **Εικόνα 3.**) Το ώριμο ιικό σωματίδιο χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα και ανθεκτικότητα σε ισχυρά απορρυπαντικά όπως το SDS, σε πρωτεολυτικά ένζυμα και σε όξινο pH (~3) (Pfister et al. 1999).

Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Τα *πρωτομερή* συνδυάζονται μεταξύ τους γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας και δημιουργούν τα *πενταμερή* ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής και ο διμερής άξονας συμμετρίας. Συγκεκριμένα, πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας (Pfister et al. 1999).

Η εξωτερική επιφάνεια του ιού χαρακτηρίζεται από προεξοχές και αυλακώσεις. Σημαντικότερη είναι μια βαθιά «αυλάκωση» (canyon) που βρίσκεται σε σταθερή ακτίνα γύρω από τον άξονα πενταπλούς συμμετρίας και στα πλάγια της βρίσκονται τμήματα των VP1 και VP3 που εμπλέκεται στην προσκόλληση του ιού σε υποδοχείς των κυττάρων – ξενιστών. Συγκεκριμένα στο εσωτερικό της «αυλάκωσης» υπάρχουν κατάλληλες περιοχές

που μπορούν να ενωθούν με μικρά, συγκεκριμένα τμήματα που προεξέχουν από τους κυτταρικούς υποδοχείς, επιτρέποντας την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο – ξενιστή (Colston & Racaniello 1994). Επιπλέον, οι περιοχές αυτές λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασής τους με τους κυτταρικούς υποδοχείς, διατηρούνται φυλογενετικά μεταξύ διαφορετικών στελεχών, από την άλλη όμως καθίστανται ευπαθείς στα αντισώματα. Ωστόσο, προστατεύονται από την άμυνα του ξενιστή, λόγω της θέσης τους στο εσωτερικό της αύλακας (Stanway G., 1990). Αντίθετα, περιοχές του ιικού καψιδίου που έχουν μικρή λειτουργική σημασία για τον ιό, παραμένουν στερεοδομικά απροστάτευτες στην περιφέρεια της αύλακας και λειτουργούν ως επίτοποι. Αν και οι επίτοποι αυτοί βρίσκονται σε σημεία ευπρόσιτα για τα αντισώματα, η ανοσολογική αντίδραση μπορεί να αποφευχθεί εξαιτίας της ευμεταβλητότητας των περιοχών αυτών, με αποτέλεσμα την εξέλιξη νέων οροτύπων.

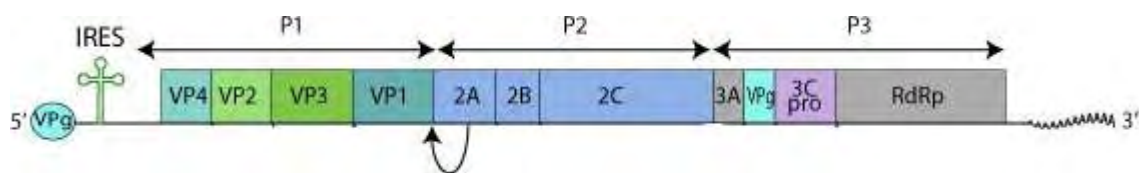


**Εικόνα 3:** Ατομικό μοντέλο της δομής του ώριμου καψιδίου των εντεροϊών. α) Κάθε πρωτομερές σχηματίζεται από τα προϊόντα πρωτεολυτικής διάσπασης της πολυπρωτεΐνης P1. Φαίνονται οι πρωτεΐνες VP1 (μπλε), VP2 (πράσινο), VP3 (κόκκινο), και VP4 (κίτρινο) που σχηματίζουν το εικοσάεδρο. β) Πέντε πρωτομερή συγκεντρώνονται σε ένα πενταμερές (Xiangxi Wang et al., 2012)

### 1.2.2 Δομή του γονιδιώματος

Το καψίδιο των Picorna ιών εσωκλείει ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας που στους εντεροϊούς έχει μήκος περίπου 7500 νουκλεοτίδια (Melnick J.L., 1990), το οποίο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο του με μια μικρή πρωτεΐνη 22 αμινοξέων, κωδικοποιούμενη από τον ιό, την VPg, η οποία φαίνεται να συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό του γενώματος, στον εγκλεισμό του στο καψίδιο και στη συγκρότηση των ιϊκών σωματιδίων (Nomoto et al., 1977). Τα επιμέρους τμήματα του γενετικού υλικού των εντεροϊών περιλαμβάνουν: την 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR), με υψηλά διατηρημένες δομές σημαντικές για την έναρξη της αντιγραφής και της μετάφρασης, το μεγάλο ενιαίο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), που κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη περίπου 250 kDa, η οποία υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία από ικές πρωτεάσες για την παραγωγή δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών, την 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR) και την πολυαδενυλιωμένη περιοχή (poly(A)-tract) 60 νουκλεοτιδίων η οποία διαδραματίζει έναν ρόλο στη σταθερότητα του RNA και την μολυσματικότητα του ιού (**Εικόνα 4**).

Σήμερα, η αλληλουχία του γονιδιώματος όλων των Εντεροϊών είναι γνωστή και διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο από τις διεθνείς τράπεζες δεδομένων.

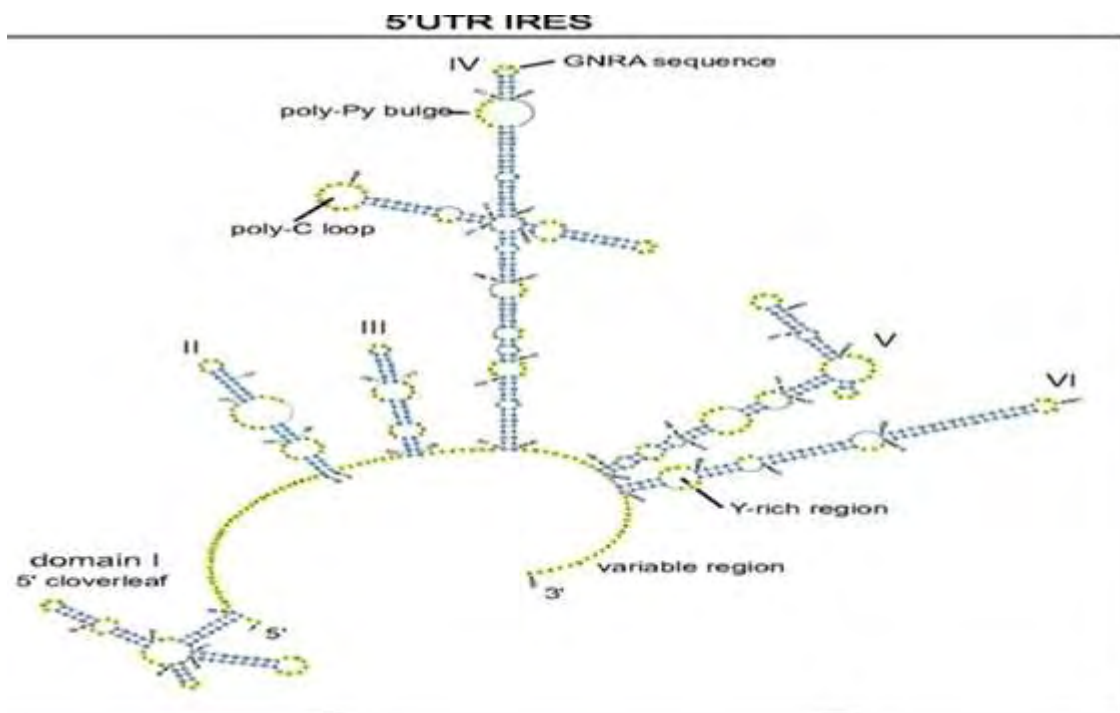


**Εικόνα 4:** Οργάνωση του γονιδιώματος των εντεροϊών. Στο 5' άκρο της 5' UTR είναι προσδεδεμένη η VPg πρωτεΐνη, κωδικοποιημένη από τον ίδιο τον ιό και στο 3' άκρο της 3' UTR βρίσκεται η πολυ A ουρά. Η κωδική περιοχή χωρίζεται σε τρία τμήματα, τα P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν για τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού.

### 1.2.3 5'-Αμετάφραση περιοχή (5'UTR)

Η 5'UTR είναι μια περιοχή περίπου 750 νουκλεοτιδίων (8-12% του γενώματος) η οποία διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο, γεγονός που φαίνεται από την υψηλά διατηρημένη δομή της μεταξύ των διαφόρων οροτύπων των Εντεροϊών. Μεταξύ κοντινών φυλογενετικά ιών η 5'UTR παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία των βάσεων, καθώς περιέχει μεγάλα τμήματα νουκλεοτιδίων που διατηρούνται πλήρως ή μερικώς από είδος σε

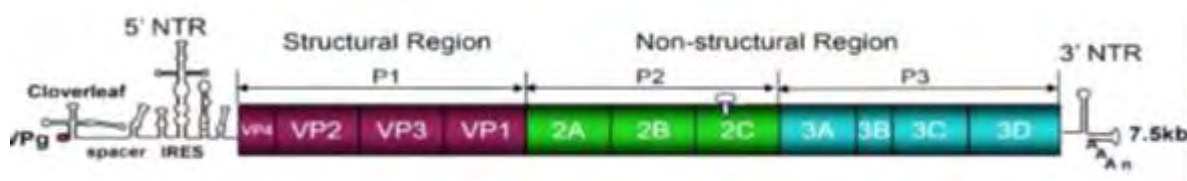
είδος (Stanway et al., 1984). Το συγκεκριμένο γεγονός υποδηλώνει ότι η 5'UTR επηρεάζει την παθογένεια του ιού, η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων αυτής της περιοχής. Οι συντηρημένες αυτές αλληλουχίες της 5'UTR εμπλέκονται στον εγκλεισμό του RNA στο ιικό καψίδιο και στον πολλαπλασιασμό του ιού. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της 5'UTR των εντεροϊών είναι ότι έχει, σε κάποιο βαθμό, διαφορετική σύσταση νουκλεοτιδίων από το υπόλοιπο γένωμα. Η μεγάλη περιεκτικότητα σε νουκλεοτίδια G-C, συγκριτικά με το υπόλοιπο γονιδίωμα, υποδηλώνει την ύπαρξη δευτεροταγούς δομής (Stanway et al., 1984). Περιλαμβάνει 7 ξεχωριστά δομικά στοιχεία RNA (I-VII) και χωρίζεται σε 3 περιοχές: στο cloverleaf (I) και στο IRES (Internal ribosome entry site) που περιλαμβάνει τα δομικά στοιχεία II-VI και σε μια λιγότερο διατηρημένη αλληλουχία 154 νουκλεοτιδίων η οποία βρίσκεται μεταξύ της δομής IRES και του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (Wimmer et al., 1993) (**Εικόνα 5.**). Η περιοχή cloverleaf 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). Το στοιχείο IRES είναι υπεύθυνο για τη μετάφραση και τη μολυσματικότητα του ιού (Kauder and Racaniello, 2004). Πιο συγκεκριμένα, τα ριβοσώματα και οι κυτταρικοί παράγοντες της μετάφρασης, αρχικά προσδένονται στο εσωτερικό του IRES και στη συνέχεια μετακινούνται μέχρι το κωδικόνιο έναρξης ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης.



**Εικόνα 5. :** Δευτεροταγής δομή της 5'UTR περιοχής του γενώματος των εντεροϊών. Η δομή I αντιστοιχεί στο cloverleaf ενώ οι δομές II-VI αποτελούν το IRES (Yozwiak, Nathan L. et al., 2010).

#### 1.2.4 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)

Το γονιδίωμα των Εντεροϊών, όπως και όλων των ιών RNA θετικής πολικότητας, είναι από μόνο του μολυσματικό μόλις μπει στο κύτταρο ξενιστή, καθώς μεταφράζεται απευθείας για την παραγωγή των ικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του. Το μονοκιστρονικό ιικό RNA, κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη περίπου 250 kDa, η οποία αποτελείται από 2 περιοχές, τη δομική και τη λειτουργική. Μετά από πρωτεολυτική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης προκύπτουν οι δομικές (VP1, VP2, VP3, VP4) και λειτουργικές (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) πρωτεΐνες του ιού καθώς και ενδιάμεσες ικές πρωτεΐνες όπως οι VP0, 2BC, 3AB και 3CD (Racaniello 2007) (**Εικόνα 6**). Οι γενετικές πληροφορίες για την παραγωγή των λειτουργικών πρωτεϊνών κωδικοποιούνται από τις P2 και P3 μη δομικές περιοχές του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (Stanway G., 1990). Συγκριτικές μελέτες μεταξύ μη δομικών πρωτεϊνών από διάφορους *Picornia* ιούς έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές διατηρούνται φυλογενετικά περισσότερο από ότι οι καψιδικές πρωτεΐνες, αντικατοπτρίζοντας την έλλειψη εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών που προσβάλλονται από εντεροϊούς, προς τις πρωτεΐνες αυτές.



**Εικόνα 6:** Χάρτης του γονιδιώματος των εντεροϊών. Παρουσιάζεται η VPg πρωτεΐνη στο 5' άκρο, η 5'UTR, οι θέσεις των γονιδίων των δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών καθώς και η 3'UTR και η πολύ(A) ουρά στο 3' άκρο (Yanping Chen et al., 2006).

##### 1.2.4.1 Ιδιότητες λειτουργικών και μη λειτουργικών πρωτεϊνών

**Πρωτεΐνη 2A:** Είναι μια πρωτεάση κυστεΐνης η οποία υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ τυροσίνης (Tyr) και γλυκίνης (Gly). Καταλύει το πρωτεολυτικό κόψιμο μεταξύ των περιοχών P1 και P2 της ιικής πολυπρωτεΐνης, διαχωρίζοντας έτσι τις δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου από τις λειτουργικές (Toyoda et al., 1986). Επίσης, ευθύνεται για την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου ξενιστή, και για τη σταθεροποίηση του ιικού RNA.

**Η Πρωτεΐνη 2B:** Εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύμπλεγμα Golgi και δρα σαν πολυμεράση. Συμμετέχει στην ιική αντιγραφή (Cucconati et al., 1998) και αυξάνει την διαπερατότητα των μεμβρανών (Barco et al., 1995).

Η Πρόδρομη Πρωτεΐνη 2BC: Είναι πρόδρομο μόριο των 2B και 2C και παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα αύξησης της διαπερατότητας των μεμβρανών σε σχέση με την πρωτεΐνη 2B. Εντοπίζεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και η σημαντικότερη ιδιότητά της είναι ότι προκαλεί την αναδιάταξη των μεμβρανών και τη δημιουργία κυστιδίων τα οποία συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα και αποτελούν θέσεις ικής αντιγραφής (Paul et al., 1998).

Η Πρωτεΐνη 2C: Είναι μία ελικάση και παρουσιάζει δραστικότητα ATPάσης που είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του ιικού γενόματος (Pfister et al., 1999, Wimmer et al., 1999). Είναι προσδεμένη σε μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και συμβάλλει στη δημιουργία του συμπλόκου αντιγραφής (Bienz et al., 1990). Παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου ενώ η πρόσδεσή της στο 3' cloverleaf του αρνητικής πολικότητας κλώνου προάγει την εκκίνηση της σύνθεσης του θετικής πολικότητας κλώνου (Banerjee et al., 2001).

Η Πρωτεΐνη 3A: Αποτελεί μέρος του συμπλόκου αντιγραφής. Εμποδίζει τη μεταφορά πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi και μειώνει τις εκκρίσεις του κυττάρου (Belon et al., 2007). Δρα κατά της απόπτωσης του κυττάρου και η αμινοτελική περιοχή της παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του θετικής πολικότητας κλώνου και στη σωστή λειτουργία της πρωτεΐνης (Towner et al., 2003).

Η Πρόδρομη Πρωτεΐνη 3AB : Αποτελεί μέρος του συμπλόκου αντιγραφής και συμβάλλει στη σταθεροποίηση της VPg στις μεμβράνες για την έναρξη της σύνθεσης του RNA. Προσδένει την ική DNA πολυμεράση και ευνοεί την επιμήκυνση της αλυσίδας του RNA (Fujita et al., 2007). Διεγείρει την αυτοκατάλυση του πρόδρομου 3CD και διαθέτει δράση μορίου συνοδού (chaperonin).

Η Πρωτεΐνη 3B (VPg): Χρησιμεύει σαν εκκινητικό μόριο κατά την ική αντιγραφή (Paul et al., 1998) και λαμβάνει μέρος στο σχηματισμό του ιικού καψιδίου.

Η Πρωτεΐνη 3C: Είναι μία πρωτεάση κυστεΐνης και υδρολύει δεσμούς μεταξύ γλουταμίνης και γλυκίνης. Είναι υπεύθυνη για την πρωτεολυτική επεξεργασία της ικής πολυπρωτεΐνης (Marcotte et al., 2007). Διεγείρει την ική μετάφραση αλλά μπορεί και να την μπλοκάρει προσδεδεμένη στο IRES και να αναστείλει την κυτταρική μεταγραφή και μετάφραση (Kuyumcu-Martinez et al., 2004).

Η Πρωτεΐνη 3CD: Διαθέτει δραστικότητα πρωτεάσης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και συγκεκριμένα στη δημιουργία κυστιδίων αντιγραφής (Marcotte et al., 2007). Μπορεί να προκαλέσει τερματισμό της ικής μετάφρασης και έναρξη της ικής αντιγραφής (Perera et al., 2007). Διαθέτει ικανότητες πρόσδεσης στο RNA, με συνέπεια την



πρόσδεσή της στο cloverleaf και στο Cis Response Element (CRE) διεγείροντας την αντιγραφή και την ουριδιλίωση της VPg αντίστοιχα (Paul et al., 2000). Επιπλέον μέσω μιας αλληλουχίας πυρηνικής τοποθέτησης (Nuclear Localisation Signal) που διαθέτει μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα και να διασπαστεί σε 3C και 3D.

Η Πρωτεΐνη 3D: Αποτελεί την RNA πολυμεράση των *picorna* ιών. Έχει 4 διαφορετικές δράσεις: μπορεί να συνθέσει RNA, έχει την ικανότητα παραγωγής θετικής και αρνητικής πολικότητας RNA, έχει δραστηριότητα ελικάσης και είναι ικανή να προσθέτει την αδενυλιωμένη ουρά στο 3' άκρο του RNA και να συμβάλει στην ολοκλήρωση της σύνθεσης του θετικής πολικότητας RNA (Pfister et al., 1999).

### 1.2.5 3' Αμετάφραστη Περιοχή (3'UTR)

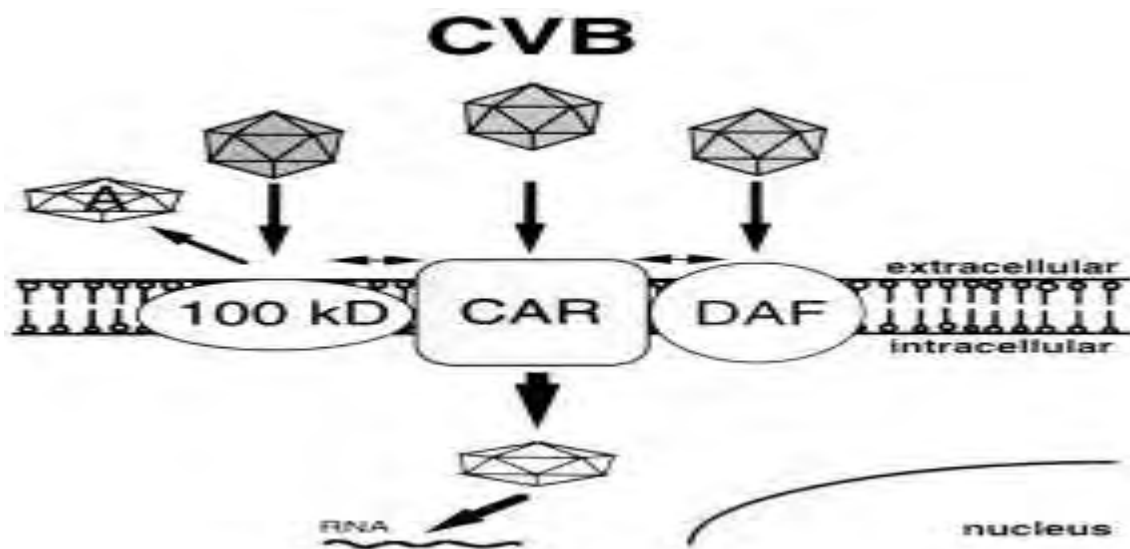
Η 3'UTR, που βρίσκεται στο 3' άκρο του γενόματος των *Picornia* ιών, διαφέρει σε μήκος (~ 70 νουκλεοτίδια) μεταξύ των διαφορετικών εκπροσώπων της οικογένειας αυτής. Η νουκλεοτιδική αυτή περιοχή αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι απαραίτητη για την φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA (Oberste et al., 2006). Στο τέλος της η 3'-UTR φέρει μια πολυ(A) ουρά, η οποία κωδικοποιείται γενετικά από τον ίδιο τον ιό. Η περιοχή αυτή φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του ιικού RNA, στην αντιγραφή του ιού και τη μολυσματικότητά του (Rohll et al., 1995). Η αλληλεπίδραση της 3' UTR με το IRES διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ιικής μετάφρασης (Todd et al. 1995).

### **1.3 Υποδοχείς Εντεροϊών**

Οι σημαντικότεροι καθοριστικοί παράγοντες της έναρξης της μόλυνσης από κάποιον ιό, είναι διάφορα μόρια-υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων-ξενιστών. Η είσοδος ενός ιού σε έναν οργανισμό αρχίζει με την προσκόλληση του ιού σε έναν ή περισσότερους εξειδικευμένους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου – ξενιστή. Οι υποδοχείς είναι μακριά μόρια που προεξέχουν από την εξωκυτταρική επιφάνεια και συμμετέχουν στις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και γλυκολιπίδια. Στους περισσότερους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη «αυλάκωση» και προκαλούν την αναδιάταξη του ιικού καψιδίου (Rossman et al., 2002). Ωστόσο, υπάρχουν και υποδοχείς οι οποίοι

συνδέονται εξωτερικά της «αυλάκωσης» και δεν αποσταθεροποιούν το ιικό καψίδιο. Η αλληλεπίδραση ενός εντεροϊού με τον υποδοχέα δεν είναι πάντα επαρκής για τη είσοδό του στο κύτταρο και απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου μορίου ή υποδοχέα (συνυποδοχέα).

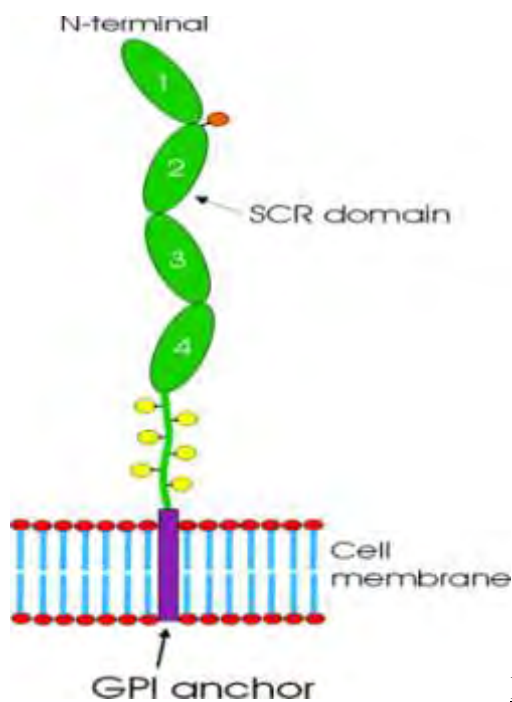
Οι υποδοχείς για τους Coxsackie B ιούς (CVB) είναι ο CAR (Selinka Hans-Christoph,1998) και ο DAF/CD55 και μία πρωτεΐνη 100kDa (Selinka Hans-Christoph,et al.,1998). Συνεργαζόμενοι τα CAR και DAF μόρια μπορούν να σχηματίσουν ένα λειτουργικό DAF / CAR σύμπλοκο υποδοχέα όπως φαίνεται παρακάτω (**Εικόνα 7**). Η DAF και η 100kDa πρωτεΐνη φαίνονται να συμμετέχουν στην προσκόλληση του CVB και στη διαμορφωτική μεταβολή του σε Α-σωματίδια. Η CAR, που ίσως είναι η πιο σημαντική πρωτεΐνη του συμπλόκου υποδοχέα, φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την εσωτερικοποίηση του ιού. Το μοντέλο δείχνει, ότι η σύνδεση και η πρόσληψη των λοιμογόνων παραγόντων σε δεκτικά κύτταρα-ξενιστές μπορεί να απαιτεί την συντονισμένη αλληλεπίδραση των διαφόρων πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας.



**Εικόνα 7:** Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών που λειτουργούν ως υποδοχείς των Coxsackie B ιών, όπου CAR( ο υποδοχέας των Coxsackie B και Adenovirus) και DAF(ο παράγοντας επιτάχυνσης αποσύνθεσης), ( Selinka Hans-Christoph et al., 1998)

Η DAF είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω γλυκοσυλιωμένης φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης και βρίσκεται στην επιφάνεια των περισσότερων κυττάρων, προστατεύοντας τα από επίθεση από το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Η DAF είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος με την πρόσδεση και την επιτάχυνση της αποικοδόμησης των κονβερτασών, των κεντρικών ενζύμων ενίσχυσης του καταρράκτη του συμπληρώματος.

Η λειτουργική, εξωκυτταρική περιοχή της DAF αποτελείται από τέσσερις μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (short consensus repeats, SCR1, -2, -3, και -4), 60aa η κάθε μια, ακολουθούμενες από μια περιοχή 97aa O-γλυκοσυλιωμένη, πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη, είναι συνδεδεμένη στην πλασματική μεμβράνη μέσω μιας άγκυρας γλυκοσυλιωμένης φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης (Kuttner-Kondo, et al., 1996), (**Εικόνα 8.**) Ολόκληρο το μόριο DAF είναι σχετικά άκαμπτο, και έχει τη διαμόρφωση μιας εκτεταμένης ράβδου (Lukacik et al., 2004).



**Εικόνα 8:** Απεικόνιση της δομής της DAF.

## 1.4 Κύκλος ζωής των Εντεροϊών

### 1.4.1 Προσκόλληση στους κυτταρικούς υποδοχείς.

Ο κύκλος ζωής των Coxsackie B ιών είναι όμοιος με τον κύκλο ζωής όλων των Εντεροϊών και μπορεί να διακριθεί σε 6 στάδια (**Εικόνα 12**). Ο κύκλος αρχίζει με την προσκόλληση του ιού στον υποδοχέα που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Συνήθως, στους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη «αυλάκωση» (Rossmann et al., 2002). Οι ιοί που μόλις έχουν προσκολληθεί αρχικά είναι κατανεμημένοι σχετικά ομοιόμορφα στην κυτταρική επιφάνεια. Στη συνέχεια, οι υποδοχείς συγκεντρώνονται σε περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες είναι επενδυμένες στην εσωτερική τους περιοχή με κλαθρίνη. Η συγκέντρωση αυτή των υποδοχέων στις συγκεκριμένες περιοχές, οδηγεί στην πτύχωση της κυτταρικής μεμβράνης γύρω από τον προσκολλημένο ιό και στην είσοδό του μέσω ενδοκυττάρωσης στο εσωτερικό του ξενιστή, εντός κυστιδίων επενδυμένων με κλαθρίνη.

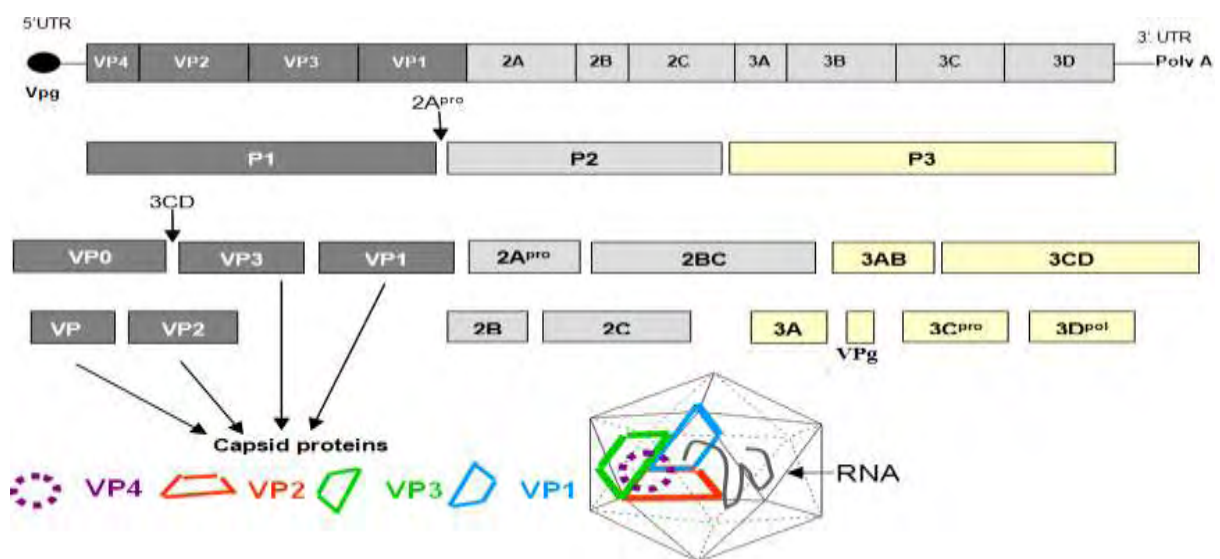
### 1.4.2.Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απελευθέρωση του γενώματός του στο εσωτερικό.

Η είσοδος του ιικού γενώματος στο εσωτερικό του κυττάρου πραγματοποιείται με ενδοκύττωση. Στο κυτταρόπλασμα, η VPg πρωτεΐνη που είναι συνδεδεμένη στην 5'-UTR περιοχή του ιικού γενώματος αποκόπτεται από μια φωσφοδιεστεράση του κυττάρου ξενιστή. Η απελευθέρωση του γενώματος του ιού στο εσωτερικό του κυττάρου είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συνυποδοχέα. Πιο συγκεκριμένα, μια αντλία πρωτονίων (H<sup>+</sup>) που απαιτεί ενέργεια (ATP) οδηγεί στη δημιουργία όξινου περιβάλλοντος εντός των κυστιδίων. Το όξινο αυτό περιβάλλον παρέχει τα ερεθίσματα για την απελευθέρωση της καψιδικής πρωτεΐνης VP4 και την αποδιάταξη των υδροφοβικών καψιδιακών περιοχών που βρίσκονται εντός του καψιδίου. Η σύντηξη της λιπιδικής διπλοστιβάδας του κυστιδίου, που περιέχει τον ιό που εισήλθε στο κύτταρο, με αυτές τις υδρόφοβες περιοχές προκαλεί τη μεταφορά του RNA από το ιικό σωματίδιο στο κυτταρόπλασμα.

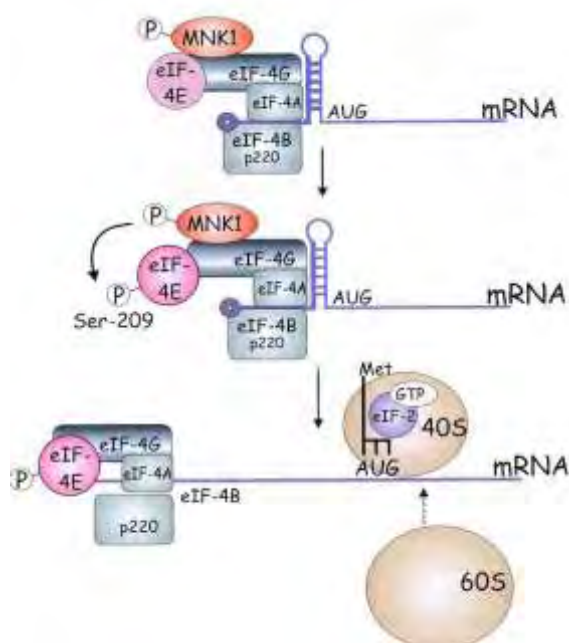
### 1.4.3 Μετάφραση του ιικού RNA-πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης.

Το γενετικό υλικό των εντεροϊών δρα ως mRNA και η μετάφρασή του από τα ριβοσώματα του κυττάρου οδηγεί σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από τις τρεις ιικές πρωτεάσες (2A<sup>pro</sup>, 3C<sup>pro</sup> και 3CD<sup>pro</sup>), ώστε να παραχθούν οι δομικές και λειτουργικές ιικές πρωτεΐνες (**Εικόνα 9**). Το 5'- άκρο των εντεροϊών δε φέρει καλύπτρα και επομένως δεν αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα κατά τον ίδιο τρόπο, αλλά τροποποιείται με

την προσθήκη της VPg πρωτεΐνης. Τα ριβοσώματα χρησιμοποιούν μια εσωτερική θέση δέσμησης στο 5'- άκρο (Internal Ribosome Entry Site – IRES), όπου προσδένεται η 40S υπομονάδα του ριβοσώματος και ξεκινάει η μετάφραση. Η έναρξη της μετάφρασης ελέγχεται από το IRES ενώ η διαδικασία της πρωτεόλυσης από εξειδικευμένες αμινοξικές αλληλουχίες που είναι δίπλα στα σημεία διάσπασης. Στην έναρξη της μετάφρασης των εντεροϊών εμπλέκονται οι ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης (eIFs) (Ochs et al., 2002 ), (**Εικόνα 10.**) Εκτός από τους παράγοντες eIFs, στο στοιχείο IRES των εντεροϊών προσδένονται και κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες ενισχύουν τη μετάφραση ή ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιικού RNA.



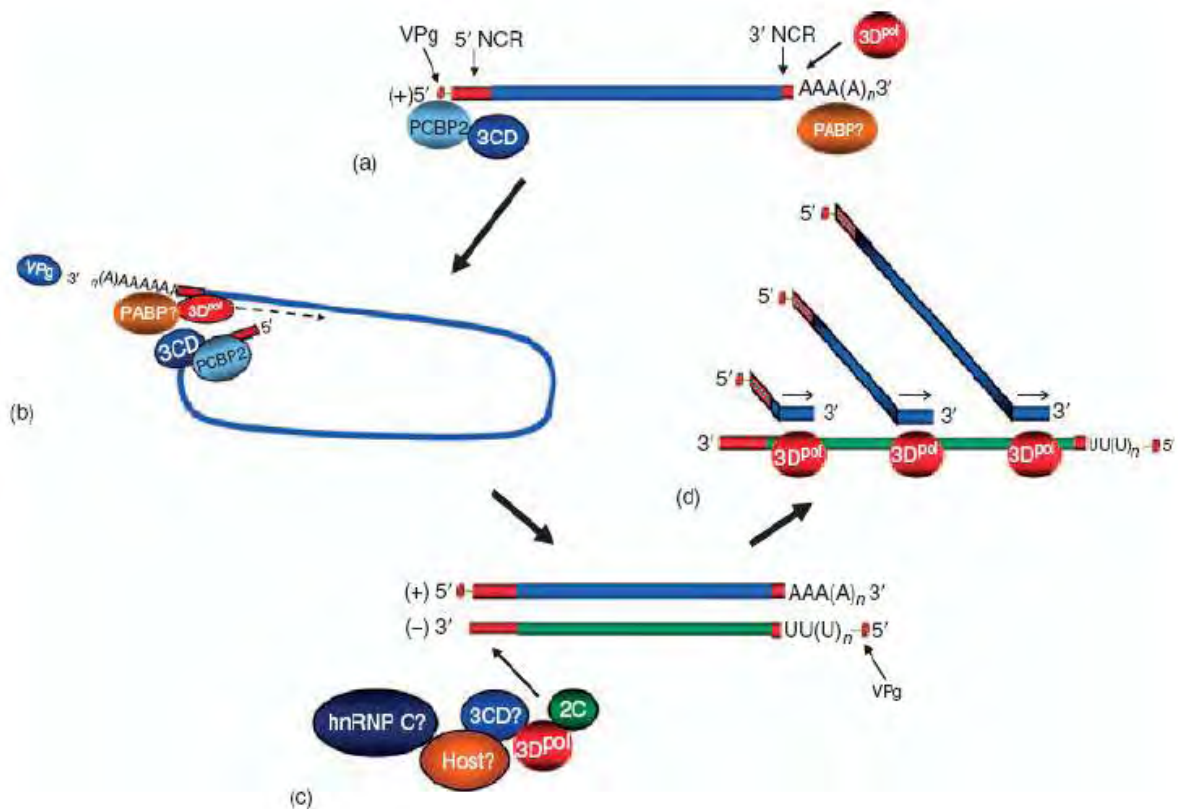
**Εικόνα 9:** Πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης (Hober Didier et al., 2013).



**Εικόνα 10:** Παράγοντες έναρξης της μετάφρασης.

#### 1.4.4 Αντιγραφή ιικού γενώματος.

Το ικό γένωμα αντιγράφεται σε μεμβρανικά κυστίδια ο σχηματισμός των οποίων προάγεται από τις 2BC και 3C ικές πρωτεΐνες. Το RNA (+) θετικής πολικότητας χρησιμοποιείται ως μήτρα για την παραγωγή του RNA (-) αρνητικής πολικότητας. Η έναρξη της σύνθεσης του RNA από την 3D<sup>pol</sup> απαιτεί την ουριδυλιωμένη VPg ική πρωτεΐνη ως εκκινήτη. Έτσι παράγεται ένα δίκλωνο μόριο RNA (replicative form, RF). Από τον αρνητικής πολικότητας κλώνο, συντίθενται πολλοί κλώνοι θετικής πολικότητας (Murray K. E and Barton D.J., 2003). Η αντιγραφή λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου – ξενιστή. Η σύνθεση του αρνητικού κλώνου απαιτεί την κυκλοποίηση του γενώματος μέσω της δημιουργίας ενός συμπλόκου αντιγραφής στο οποίο συμμετέχουν οι πρωτεΐνες RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D<sup>pol</sup>, 3CD<sup>pro</sup>, PCBP, PABP (Poly(A) Binding Protein) καθώς και οι δομές 5' cloverleaf και 3' UTR του ιικού γενώματος (**Εικόνα 11.**).



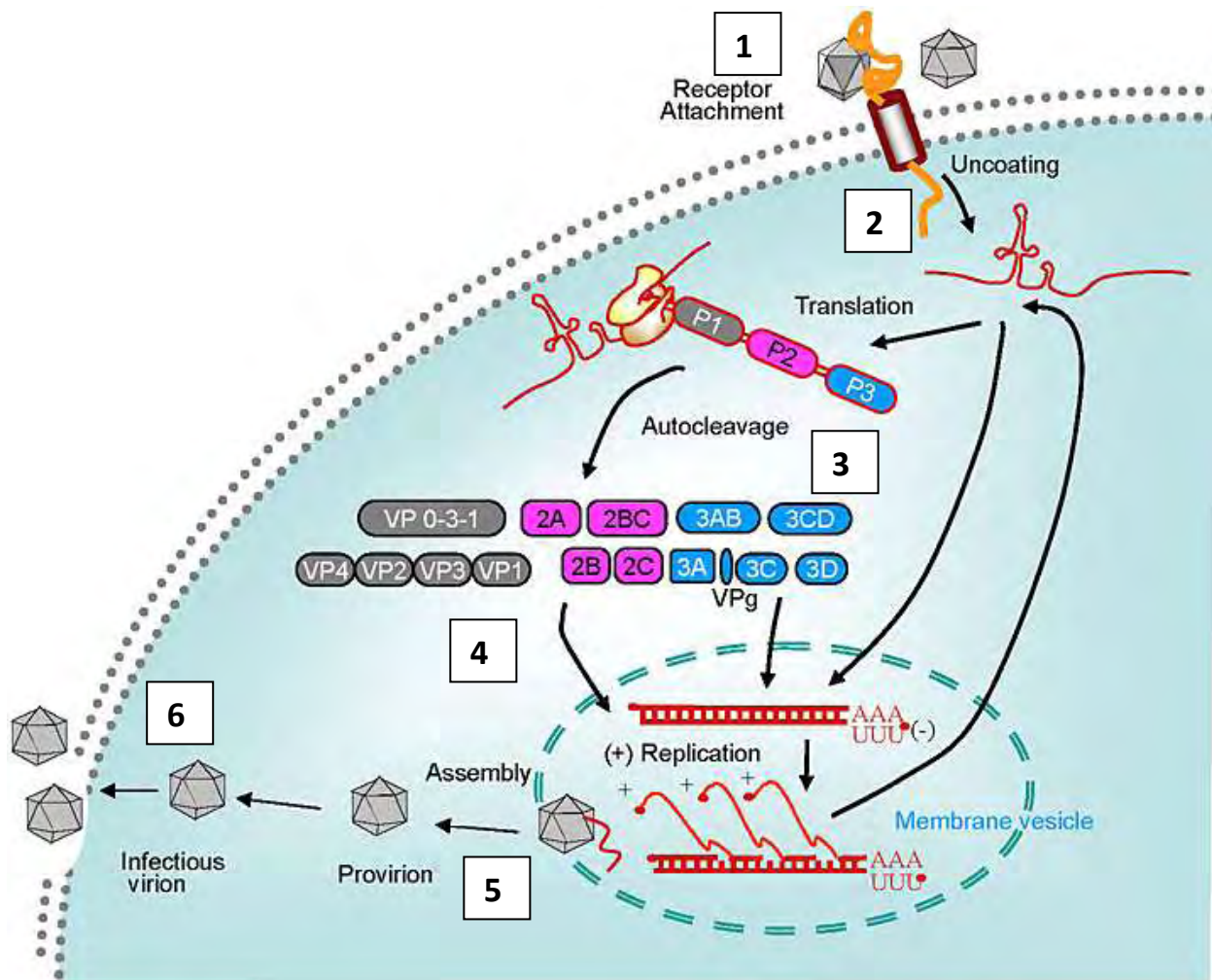
**Εικόνα 11:** Αντιγραφή ιικού γενώματος.

#### 1.4.5 Συναρμολόγηση και ωρίμανση των νέων ιικών σωματίων.

Η διαδικασία της συναρμολόγησης περιλαμβάνει τη συλλογή όλων των συστατικών που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό του ιικού καψιδίου σε μια συγκεκριμένη θέση στο κύτταρο. Στους εντεροϊούς η συναρμολόγηση γίνεται στο κυτταρόπλασμα και είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αντιγραφή του ιικού RNA. Το στοιχείο IRES φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην είσοδο του RNA στο καψίδιο και η όλη διαδικασία φαίνεται να εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως η VPg (Gromeier et al., 1996). Το πρώτο στάδιο της συναρμολόγησης του ιικού καψιδίου περιλαμβάνει την διάσπαση της P1 πρόδρομου πρωτεΐνης από την 3CDpro και τη δημιουργία ενός πρωτομερούς αποτελούμενο από τις VP0, VP1 και VP3 δομικές πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, τα πρωτομερή συναρμολογούνται σε πενταμερή [(VP0, VP1, VP3)<sub>5</sub>], που είναι απαραίτητα για την καψιδίωση του RNA των εντεροϊών. Δώδεκα πενταμερή [(VP0, VP1, VP3)<sub>5</sub>]<sub>12</sub> απαιτούνται για την κατασκευή ενός εικοσαεδρικού «προκαψιδίου» (Pfister et al., 1999). Την καψιδίωση του RNA ακολουθεί η αντίδραση ωρίμανσης του καψιδίου η οποία συμβαίνει με την αυτοκαταλυτική διάσπαση της πρωτεΐνης VP0 σε VP2 και VP4 και έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή του προιού σε ένα ώριμο μολυσματικό ιικό σωματίο.

#### 1.4.6 Απελευθέρωση ώριμων ιικών σωματίων.

Τέλος, τα νέα ιικά σωματία απελευθερώνονται για να μολύνουν νέα κύτταρα (Pfister et al., 1999, De Jesus NH, 2007). Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης των κυττάρων εμποδίζεται από την πρωτεάση 2A, η οποία προκαλεί ρήγμα σε έναν από τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης του γενετικού υλικού (Hellen et al., 1991). Συνεπώς, λόγω της αναστολής των διαδικασιών της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου – ξενιστή και λόγω του μεγάλου αριθμού των ιών που παράγονται ανά κύτταρο, ο ξενιστής τελικά καταστρέφεται, επιτρέποντας την απελευθέρωση των ιών



**Εικόνα 12:** Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών σε 6 βήματα (Lim Travis et al., 2008) .

## 1.5 Παθογένεια

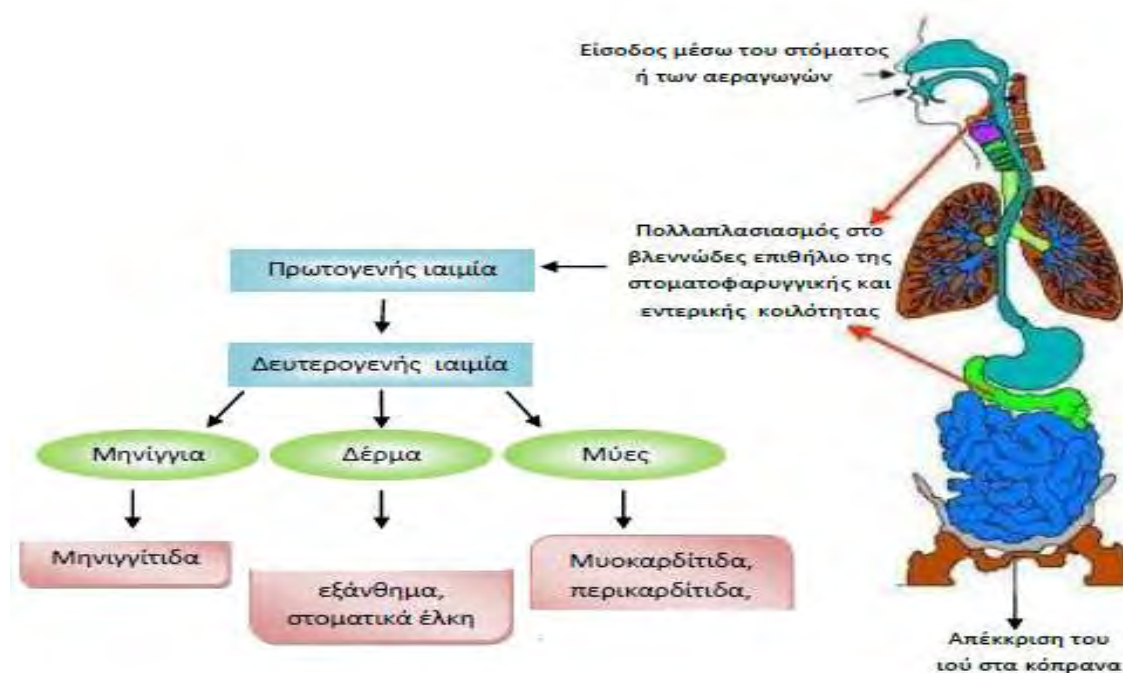
### 1.5.1 Έκθεση και Μηχανισμοί Λοίμωξης

Σύμφωνα με στοιχεία που δημοσιεύτηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), οι Coxsackievirus έχουν παγκόσμια μετάδοση, με αυξημένη συχνότητα τους ζεστούς μήνες σε εύκρατα κλίματα (Hawley et al. 1973). Η είσοδος των εντεροϊών γίνεται από το στόμα και η μόλυνση προχωρά μέσω του πεπτικού συστήματος (**Εικόνα 13**). Εξαιρέση αποτελούν ο ιός Coxsackie A21 (CAV21), ο οποίος μεταδίδεται κυρίως από εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος, και ο εντεροϊός 70 (EV70), ο οποίος εκκρίνεται στα δάκρυα και μεταδίδεται μέσω των δακτύλων και των κοπράνων (Knipe and Howley, 2007). Λοιμώξεις από ιούς Coxsackie μπορούν να μεταδοθούν απευθείας από άτομο σε άτομο μέσω των κοπράνων, του



στόματος ή την επαφή με εκκρίσεις του φάρυγγα (Hunter 1998). Επιπλέον, ο ιός μπορεί να μεταδοθεί με αεροζόλ ή μέσω του νερού.

Ο ιός μολύνει τους βλεννογόνους ιστούς του φάρυγγα, του εντέρου ή και τα δύο και εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος όπου αποκτά πρόσβαση σε όργανα-στόχους, όπως οι μνίγγες, το μυοκάρδιο και το δέρμα. Μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό των εντεροϊών στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και στο λεπτό έντερο, προκαλείται ιαιμία, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε περαιτέρω πολλαπλασιασμό του ιού σε κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και τελικά στο όργανο – στόχο. Η περίοδος επώασης του ιού, 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 από 2 – 35 ημέρες, σε ακραίες περιπτώσεις. Μετά τη μόλυνση με εντεροϊό, σε άτομα που έχουν είτε κλινικές είτε υποκλινικές ενδείξεις, ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για 8 εβδομάδες και είναι παρών στο φάρυγγα για 1 – 2 εβδομάδες (Melnick J.L., et al., 1990).



**Εικόνα13:** Παθογένεια των Coxsackie B ιών (Murray et al., 2005).

### 1.5.2 Πρωτοβάθμια συμπτώματα της νόσου και επιπτώσεις

Γενικά, οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τα μέλη της ομάδας των εντεροϊών στον άνθρωπο, ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό και χαρακτηρίζονται από ένα υψηλό ποσοστό υποκλινικών ενδείξεων. Οι περισσότερες είναι ασυμπτωματικές και γι' αυτό οι εντεροϊοί θεωρούνται από πολλούς ως μη σημαντικοί για να βρεθούν στο επίκεντρο συστηματικής

έρευνας. Παρόλα αυτά, οι εντεροϊοί προκαλούν μια ευρεία ποικιλία οξέων συμπτωμάτων, ως αποτέλεσμα της προσβολής του κεντρικού νευρικού συστήματος, του μυοκαρδίου, των 25 σκελετικών μυών, του παγκρέατος, του δέρματος και των βλεννωδών μεμβρανών (Muir et al., 1998). Αν και κάποιοι εντεροϊοί είναι πιο συχνά υπεύθυνοι για περιστατικά επιδημιών που αφορούν ένα συγκεκριμένο σύνδρομο, σε άλλες παραμέτρους τύπου και χρόνου οι ίδιοι ορότυποι εντεροϊών μπορεί να εμπλέκονται σε σποραδικές ή επιδημικές λοιμώξεις, οι οποίες έχουν εντελώς διαφορετικές κλινικές ενδείξεις ή καθόλου συμπτώματα. Οι κλινικές ενδείξεις των λοιμώξεων ιού coxsackie κυμαίνονται από αφανή λοίμωξη στα περισσότερα άτομα έως και θανατηφόρα ασθένεια σε πιο σπάνιες περιπτώσεις. Ήπιες ασθένειες περιλαμβάνουν το κοινό κρυολόγημα και τα εξανθήματα, τύπου Hand Foot Mouth Disease (HFMD) και τον αφθώδη πυρετό. Παιδιά ηλικίας μεταξύ ενός και επτά ετών έχουν την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης HFMD. Οι περισσότερες λοιμώξεις συμβαίνουν κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, είτε σποραδικά είτε σε εστίες. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από απότομο πυρετό μαζί με πονόλαιμο, δυσφαγία, υπερβολική σιαλόρροια, ανορεξία, και κακουχία. Περίπου το 25% των ασθενών υποφέρουν από εμετούς και κοιλιακό άλγος. Τα κυστίδια εμφανίζονται στους πρόσθιους πυλώνες των αμυγδαλών. Κεφαλαλγία και μυαλγία είναι κοινά συμπτώματα σε ορισμένα κρούσματα. Ο πυρετός διαρκεί από μία έως τέσσερις μέρες, τα τοπικά και συστηματικά συμπτώματα αρχίζουν να υποχωρούν σε 4-5 ημέρες και η συνολική ανάκαμψη παρατηρείται συνήθως μέσα σε μια εβδομάδα. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να οδηγηθούν σε ανάπτυξη άσηπτης μηνιγγίτιδας, και παρωτίτιδας (Hlanová 1989).

Από τη δεκαετία του 1960, έχει προταθεί ότι η ομάδα των ιών coxsackie B είναι ο πιο συχνός ιογενής αιτιολογικός παράγοντας που σχετίζεται με καρδιακές παθήσεις συμπεριλαμβανομένων μυοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα και ενδοκαρδίτιδα (Burch and Giles 1972, Koontz and Ray 1971, Pongpanich et al. 1983, Ward 2001, Gauntt and Huber 2003), προκαλώντας πάνω από το 50% όλων των περιπτώσεων της ιογενούς μυοκαρδίτιδας (Ali, Abdel-Dayem 2003). Η παρουσία καρδιακών-ειδικών αυτοαντισωμάτων σε ορούς ορισμένων ασθενών με Coxsackievirus B3-επαγόμενη μυοκαρδίτιδα συνηγορεί στο ότι η αυτοανοσία είναι ένα επακόλουθο της ιογενούς μυοκαρδίτιδας (Wolfgram et al., 1985).

Οι σποραδικές περιπτώσεις παράλυσης έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις από ιό Coxsackie. Οι ορότυποι που πιο συχνά ενοχοποιούνται είναι οι Coxsackie B2-B6 (Kono et al., 1977). Η νόσος είναι ηπιότερη από ότι η πολιομυελίτιδα και η παράλυση που προκαλείται συνήθως

δεν είναι μόνιμη. Οι Coxsackie ιοί μπορούν, έστω και σπάνια, να προκαλέσουν εγκεφαλίτιδα (McAbee and Kadakia 2001).

## 1.6 Εξέλιξη των Εντεροϊών

### 1.6.1 Μεταλλάξεις

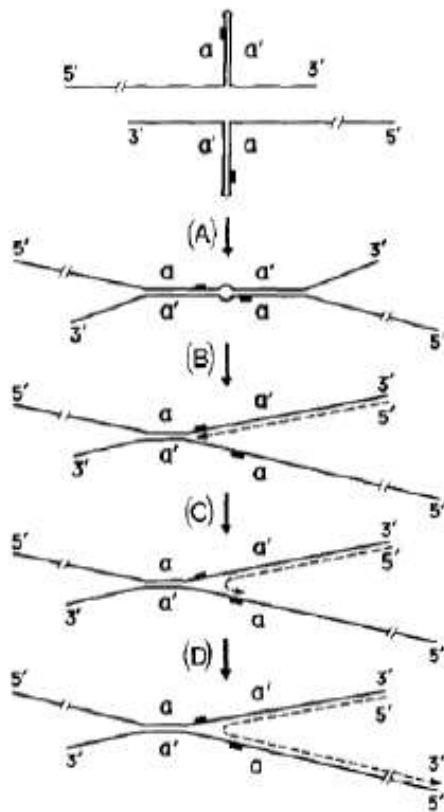
Όπως όλοι οι RNA ιοί, έτσι και οι εντεροϊοί χαρακτηρίζονται από την συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων που συμβαίνουν λόγω του υψηλού ποσοστού ενσωμάτωσης λαθών της ιικής RNA πολυμεράσης ( $3D^{pol}$ ) και της απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης των λαθών αυτών (μηχανισμός proof-reading). Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων ( $4,5 \times 10^{-4}$  μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής, δηλαδή 1 λάθος νουκλεοτίδιο ανά 2222 βάσεις) είναι ένα πολύ συνηθισμένο φαινόμενο στους εντεροϊούς το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των λυτικών RNA ιών (Stanway G., 1990). Η απουσία ενός μηχανισμού ελέγχου της RNA πολυμεράσης για την πιστότητα της αντιγραφής του ιικού RNA, έχει ως συνέπεια την εξέλιξη των Εντεροϊών ώστε να έχουν μικρό γένωμα και οδηγεί σε ρυθμούς μεταλλάξεων πολύ μεγαλύτερους από αυτούς που παρατηρούνται κατά την αντιγραφή του DNA από τις αντίστοιχες DNA πολυμεράσες. Η μεγάλη συχνότητα λαθών της RNA πολυμεράσης οδηγεί και στη δημιουργία ετερογενών πληθυσμών. Ο όρος quasi-species (σχεδόν είδος) έχει εισαχθεί για να περιγράψει το φαινόμενο της ύπαρξης μιας μεγάλης ομάδας συσχετιζόμενων γονιδιωμάτων, που έχουν γενικά μια κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους σε μία ή περισσότερες περιοχές (Domingo et al., 1985). Αυτή η γενετική ετερογένεια επιτρέπει στους Εντεροϊούς να προσαρμόζονται γρήγορα σε ένα νέο περιβάλλον. Υπάρχουν 2 κύριοι μηχανισμοί για την επικράτηση των μεταλλάξεων, η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή (Garvilin et al., 2000).

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των Εντεροϊών είναι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών τους. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 με την μεγαλύτερη ποικιλομορφία να εμφανίζεται σε περιοχές στο εξωτερικό του ιικού καψιδίου, καθώς εξελίσσονται πιο γρήγορα λόγω της ισχυρής εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Muir et al., 1998). Από αυτές τις δομικές πρωτεΐνες η VP1 συγκεντρώνει τις περισσότερες μεταλλάξεις.

### 1.6.2 Ανασυνδυασμός

Οι ανασυνδυασμοί μαζί με τις μεταλλάξεις κατευθύνουν την εξέλιξη των ιών. Ο γενετικός ανασυνδυασμός, δηλαδή η ανταλλαγή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών μορίων RNA, παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε κύτταρα μολυσμένα με πολιοϊό (Hirst G., 1962), αλλά γεγονότα ανασυνδυασμού έχουν βρεθεί και σε κυκλοφορούντα στελέχη εντεροϊών (Lukashev A., 2005). Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από τον βαθμό ομολογίας των πατρικών κλώνων RNA (Knipe and Howley, 2007). Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στον γενετικό ανασυνδυασμό, ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (Kirkegaard and Baltimore, 1986) και ο μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (Gmyl et al., 1999).

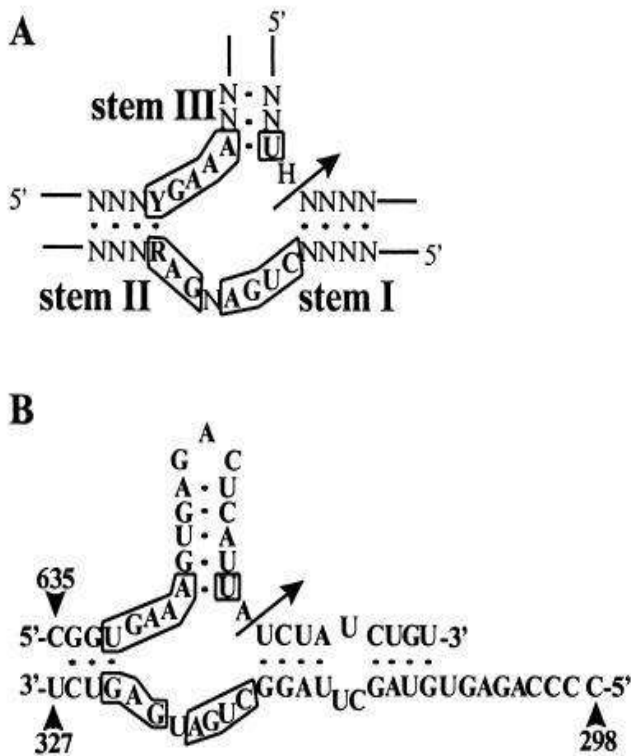
Μηχανισμός αλλαγής μήτρας (ή αντιγραφικός μηχανισμός): Κατά την ιική αντιγραφή, η ιική πολυμεράση 3D χρησιμοποιεί σαν καλούπι για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας, τον κλώνο θετικής πολικότητας του ιού επάγοντας τη δημιουργία με αυτόν τον τρόπο ενός δίκλωνου μορίου RNA, γνωστού ως αντιγραφικό ενδιάμεσο. Ωστόσο κατά τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου η ιική πολυμεράση μπορεί να συναντήσει κάποιο «εμπόδιο», με αποτέλεσμα την αποδέσμευση της ίδιας, καθώς και του νεοσυντιθέμενου RNA κλώνου αρνητικής πολικότητας, από τον θετικής πολικότητας κλώνο που χρησιμοποιείται σαν καλούπι (Kirkegaard & Baltimore, 1986). Έχει προταθεί ότι το συγκεκριμένο εμπόδιο μπορεί να είναι είτε μια σταθερή δευτεροταγής RNA δομή (Romanova et al., 1986) είτε η προσθήκη λάθους νουκλεοτιδίου από την ιική πολυμεράση στον νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο (Pilipenko et al., 1995). Η αποδέσμευση της ιικής πολυμεράσης σε σύμπλοκο με τον νεοσυντιθέμενο αρνητικό κλώνο οδηγεί στην δέσμευση της ιικής πολυμεράσης καθώς και του ημιτελούς αρνητικού κλώνου, σε περιοχή υψηλής ομολογίας ενός διαφορετικού κλώνου θετικής πολικότητας που θα λειτουργήσει τώρα σαν καλούπι για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Αν η μετάβαση από τον ένα κλώνο στον άλλο είναι ακριβής τότε ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος. Αν όμως δεν είναι ακριβής τότε είναι μη ομόλογος και έχει αντίκτυπο στη βιωσιμότητα των νέων στελεχών (Kirkegaard and Baltimore 1986). Ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας θεωρείται ο επικρατέστερος μηχανισμός RNA ανασυνδυασμού (**Εικόνα 14.**), (Romanova et al., 1986, King et al., 1988).



**Εικόνα14:** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού αλλαγής μήτρας κατά τον ανασυνδυασμό μεταξύ RNA. Οι μαύρες γραμμές αναπαριστούν τα δύο μόρια RNA. Οι δύο ανάστροφες επαναλήψεις παριστάνονται ως α και α'. Η διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά το παραγόμενο ανασυνδυασμένο RNA (Romanova et al., 1986)

Μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (ή μη αντιγραφικός μηχανισμός):

Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, τα μόρια του RNA κόβονται σε κάποια σημεία και τα εκτεθειμένα 5' άκρα τους ενώνονται. Με άλλα λόγια, ένα ανασυνδυασμένο γονιδίωμα προκύπτει από τη σύνδεση τμημάτων RNA που προέρχονται από τη διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων (Gmyl et al., 1999). Υπάρχουν δύο προτεινόμενοι μηχανισμοί. Σύμφωνα με τον πρώτο, οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί των δύο διαφορετικών μορίων δέχονται επίθεση από ένα εξωτερικό νουκλεόφιλο μόριο νερού με αποτέλεσμα τη διάσπασή τους και την έκθεση των 5' και 3' άκρων τους. Έπειτα τα άκρα αυτά από τα διαφορετικά RNA ενώνονται μεταξύ τους μέσω ενεργοποίησης της 5' φωσφορικής ομάδας. Στον δεύτερο χημικό μηχανισμό, ένας φωσφοδιεστερικός δεσμός σε κάθε ανασυνδυασμένο μόριο δέχεται επίθεση από το παρακείμενο 2'OH, το οποίο παίζει το ρόλο του εσωτερικού νουκλεόφιλου, με αποτέλεσμα σε κάθε μόριο την παραγωγή ενός άκρου που περιέχει ένα κυκλικό 2',3' φωσφορικό ενδιάμεσο και ενός 5' άκρου που φέρει OH. Στη συνέχεια τα 5' και 3' άκρα από τα διαφορετικά μόρια RNA ενώνονται μέσω αντίδρασης τρανς εστεροποίησης (**Εικόνα 15.**) (Gmyl et al., 1999).



**Εικόνα15:** Μηχανισμός ανασυνδυασμού μέσω ρήξης και επανένωσης, που περιλαμβάνει τη συμμετοχή μιας hammerhead-like ριβοενζυμικής δραστηριότητας. Τα περιγεγραμμένα νουκλεοτίδια αποτελούν συντηρημένες θέσεις. Η θέση τομής φαίνεται με βέλος (Gmyl et al., 1999).

## 1.7 Επιδημιολογία

Παρά την ευρέως διαδεδομένη φύση των λοιμώξεων από εντεροϊούς και την μεγάλη ποικιλία των κλινικών τους συμπτωμάτων, υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού (Knipe and Howley, 2007). Οι εντεροϊοί μεταδίδονται σε συνθήκες φτώχης υγιεινής και μπορούν να επιζήσουν ακόμα και σε συνθήκες εξαιρετικά χαμηλών εξωτερικών θερμοκρασιών το χειμώνα. Σε τροπικά κλίματα προσβάλλουν ανθρώπους ενεργά όλες τις εποχές του χρόνου, αλλά σε ψυχρότερα κλίματα οι εξάρσεις των ασθενειών συμβαίνουν συχνότερα το καλοκαίρι και το φθινόπωρο (Eliane Druyts-Voets, et al., 1993).

### 1.7.1 Ηλικία

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες του αποτελέσματος λοίμωξης από Εντεροϊό είναι η ηλικία. Διαφορετικές ηλικιακές ομάδες έχουν διαφορετικές ευαισθησίες σε μόλυνση, στη σοβαρότητα της ασθένειας, στις κλινικές εκδηλώσεις και στην πρόγνωση της νόσου μετά από μόλυνση από Εντεροϊό. Επειδή η μόλυνση είναι τόσο κοινή, οι πιο πρωτογενείς λοιμώξεις συμβαίνουν κατά την παιδική ηλικία (Mandell, 2000). Γι' αυτό το λόγο μικρά παιδιά είναι ίσως οι πιο σημαντικοί μεταδότες της μόλυνσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η έκθεση

των παιδιών στον ιό κατά τη διάρκεια της μόλυνσης μπορεί να τους προκαλέσει σοβαρά κλινικά συμπτώματα. Σε αναπτυσσόμενες περιοχές, όπου το κοινωνικο-οικονομικό υπόβαθρο είναι χαμηλό, οι μολύνσεις από εντεροϊούς είναι εξαιρετικά διαδεδομένες. Όσον αφορά την ηλικία των προσβαλλόμενων ατόμων, πιο επιρρεπείς στις μολύνσεις από εντεροϊούς είναι τα άτομα μικρής ηλικίας, τα οποία είναι λιγότερο πιθανό να έχουν αντισώματα από προηγούμενες μολύνσεις (Exindari M et al., 2005).

### 1.7.2 Φύλο

Έχει παρατηρηθεί ότι και το φύλο παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού. Φαινομενικά, οι λοιμώξεις από εντεροϊούς κυριαρχούν μεταξύ των ανδρών. Μετά από μετρήσεις των λοιμώξεων που έγιναν με βάση τον πληθυσμό (π.χ. ορολογικές έρευνες), οι οποίες ήταν ανεξάρτητες από το φύλο των προσβαλλόμενων ατόμων, έδειξαν μια αυξημένη τάση των ανδρών να μολύνονται από εντεροϊούς. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει επειδή εκτίθενται περισσότερο στο παθογόνο σε σχέση με τα θηλυκά άτομα, ίσως λόγω διαφορών ως προς τις συνθήκες παιχνιδιού των νεαρών αγοριών. Εκτός από αυτό, οι άνδρες είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν σοβαρή ασθένεια, λόγω μόλυνσης από εντεροϊό, σε σχέση με το γυναικείο φύλο. Για παράδειγμα, ο λόγος που η μυοκαρδίτιδα είναι πιο συχνή σε ενήλικους και έφηβους άνδρες σε σχέση με τις αντίστοιχες ηλικίες των γυναικών (εκτός από εγκύους), μπορεί να οφείλεται σε ενδοκρινείς ενέργειες που σχετίζονται με το φύλο, οι οποίες οδηγούν σε διαφορές ως προς την ευαισθησία στη μόλυνση από εντεροϊούς (Wong et al., 1977). Επιπλέον παρατηρήθηκε συσχετισμός ανάμεσα στο φύλο και την ηλικία των ανδρών. Συγκεκριμένα σύμφωνα με το Εθνικό Σύστημα Επιτήρησης Εντεροϊών στις Η.Π.Α (NESS), επικράτηση της ασθένειας στο ανδρικό φύλο ήταν παρούσα στους ασθενείς ηλικίας <20 χρονών, αλλά όχι στα άτομα ηλικίας >20 ετών (αναλογία ανδρών / γυναικών: 1.4 και 0.9, αντίστοιχα) (Khetsuriani et al., 2006).

### 1.7.3 Συχνότητα εμφάνισης της νόσου

Η ακριβής συχνότητα εμφάνισης και επικράτησης των λοιμώξεων ιών coxsackie δεν είναι γνωστές, αλλά είναι εξαιρετικά κοινές. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα δεδομένα για την οροεπικράτηση των B2 Coxsackie, B3, B4 και B5 ιών στην περιοχή Μόντρεαλ του Καναδά κατά τη διάρκεια μιας επιδημιολογικής μελέτης σχετικά με ασθένειες που σχετίζονται με το νερό (Payment et.al., 1991).

Serogroup	Age groups (years)				
	9–19	20–39	40–49	50–59	60+
B2	51	60	67	66	60
B3	51	64	63	55	60
B4	44	80	77	74	80
B5	58	74	61	62	20

**Πίνακας 2.:** Επιδημιολογική μελέτη ασθενειών από Coxsackie B2-B5 ιών στον Καναδά (Payment et al., 1991).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το Εθνικό Σύστημα Επιτήρησης Εντεροϊών (NESS) συλλέγει πληροφορίες σχετικά με την κυκλοφορία των εντεροϊών και παρακολουθεί την χρονική και γεωγραφική τους εξάπλωση. Κατά τη διάρκεια του 1970 - 2005 αναφέρθηκαν συνολικά 52.812 ανιχνεύσεις εντεροϊών από τον NESS (29.772 κατά τη διάρκεια των ετών 1983-2005, (Khetsuriani et al., 2006).

### 1.8 Πρόληψη και έλεγχος

Τα μόνα διαθέσιμα εμβόλια για Εντεροϊούς αυτή τη στιγμή είναι ενάντια στους τρεις ορότυπους των πολιοϊών. Η εφαρμογή τους για σχεδόν 40 χρόνια έχει οδηγήσει στην επίτευξη του στόχου της παγκόσμιας εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας. Μια καλύτερη κατανόηση της οργάνωσης του γονιδιώματος και της λειτουργίας των εντεροϊών, καθώς επίσης και των μηχανισμών της ταχείας εξέλιξης και της μεταβλητότητάς τους, θα βοηθούσε πολύ στο σχεδιασμό αντι-ικών παραγόντων, όπου οι ζωτικές λειτουργίες τους να αποτελούσαν στόχο. Επιπλέον, οι μελέτες των κυτταρικών υποδοχέων είναι μεγάλης σπουδαιότητας για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων ενός ιού με το κύτταρο ξενιστή του, αποτελώντας ένα πιθανό στόχο για εμβόλια. Η καλύτερη κατανόηση του εντοπισμού της δομικής διαμόρφωσης των επιτόπων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ανασυνδυασμένων εμβολίων.



## 1.8 Εργαστηριακή Διάγνωση

Η διάγνωση της μόλυνσης με εντεροϊούς και ο χαρακτηρισμός τους μπορεί να είναι πολύπλοκη διαδικασία, είτε λόγω περιορισμών των διαγνωστικών μεθόδων είτε λόγω των βιολογικών και επιδημιολογικών χαρακτηριστικών των εντεροϊών. Η δυσκολία οφείλεται στο γεγονός ότι οι εντεροϊοί μπορούν να βρίσκονται στο αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα τόσο υγιών όσο και ασθενών ατόμων με μεγάλη ποικιλία στην κλινική εικόνα καθώς οι μολύνσεις είναι συνήθως ασυμπτωματικές ή παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα. Λόγω της ομοιότητας των συμπτωμάτων που προκαλούνται από διαφορετικούς τύπους εντεροϊών, υπάρχει ανάγκη όχι μόνο διάγνωσης αλλά και ταυτοποίησής τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τόσο παραδοσιακές τεχνικές, όπως η απομόνωση του ιού, η οροταυτοποίηση και η ανίχνευση αντισωμάτων, όσο και μοριακές τεχνικές (Pallansch and Roos, 2007, Muir et al., 1998, Siafakas et al., 2001).

Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των εντεροϊών, βασίζονται στην απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες και την εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης τους με ειδικούς αντι-ορούς.

Τα βιολογικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του ιού, περιλαμβάνουν το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), φαρυγγικά επιχρίσματα και δείγματα που προέρχονται από το πεπτικό σύστημα όπως πρωκτικά επιχρίσματα ή δείγματα κοπράνων, τα οποία αποτελούν και το πιο αξιόπιστο υλικό για την ανίχνευση εντεροϊών. Η ική καλλιέργεια από ENY αποτελεί συνηθισμένη μέθοδο σε περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας (Minor et al., 2000). Η απομόνωση των εντεροϊών από συστατικά του αίματος είναι επίσης χρήσιμη και παρέχει ένδειξη συστημικής μόλυνσης (Shulman et al, 1997). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν δάκρυα (Yin-Murphy et al., 1985), ή εκκρίματα του επιπεφυκότος χιτώνα (Yin-Murphy et al., 1984) σε περιπτώσεις οξείας αιμορραγικής επιπεφυκίτιδας. Σε περιπτώσεις θανάτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δείγματα αυτοψίας εγκεφάλου ή νωτιαίου μυελού.

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την απομόνωση εντεροϊών, είναι η χρήση κυτταρικών σειρών. Η ανάπτυξη όλων των γνωστών οροτύπων των εντεροϊών όμως, δεν μπορεί να γίνει στον ίδιο τύπο κυττάρων. Κατά συνέπεια, η χρήση πολλαπλών κυτταρικών σειρών αυξάνει την παραγωγή και ενισχύει την πιθανότητα και ταχύτητα της ικής απομόνωσης (Chonmaitree et al., 1988, Kopecka 1999). Κάτω από ιδανικές συνθήκες η απομόνωση μπορεί να είναι

εμφανής μέσα σε λίγες μέρες μέσω της παρατήρησης κυτταροπαθογόνου δράσεως (CPE). Τα κύτταρα στρογγυλοποιούνται και συρρικνώνονται πριν αποκολληθούν από την επιφάνεια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Παρ'όλα αυτά οι διάφοροι ορότυποι δεν μπορούν να διακριθούν με την ανάπτυξη σε κυτταροκαλλιέργειες καθώς προκαλούν όμοια κυτταροπαθογόνο δράση (Minor et al., 2000).

Μετά την απομόνωση του Εντεροϊού ακολουθεί η ταυτοποίηση του οροτύπου μέσω εξουδετέρωσης με ειδικό αντιορό για κάθε ορότυπο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται συνδυασμοί εξειδικευμένων πολυκλωνικών αντισωμάτων που επιτρέπουν την ταυτοποίηση 42 οροτύπων Εντεροϊών. Συγκεκριμένα το προς ανάλυση δείγμα επωάζεται με κάθε διαφορετικό δείγμα αντιορού και ενοφθαλμίζεται σε κατάλληλα κύτταρα. Μετά από επώαση αρκετών ημερών διαβάζεται το πρότυπο εξουδετέρωσης και αξιολογούνται τα αποτελέσματα (Melnik et al., 1973).

Μέσω της ορολογικής διάγνωσης, μπορούμε να έχουμε ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης από εντεροϊό, αφού τα IgM αντισώματα παράγονται κατά την πρώτη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού (Melnick J.L., 2001). Ο έλεγχος αυτός γίνεται με την μέθοδο ELISA, η οποία όμως είναι πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης αναμνηστικών ετεροτυπικών αντιδράσεων των αντισωμάτων, της έλλειψης ενός ομοιόμορφα αντιδρώντος αντιγόνου των εντεροϊών και του μεγάλου αριθμού οροτύπων. Το ανθρώπινο ανοσολογικό σύστημα αντιδρά στη λοίμωξη από εντεροϊό με την δημιουργία αντισωμάτων τα οποία ενεργούν έναντι ειδικών και κοινών επιτόπων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε επιδημιολογικές μελέτες και έχει μεγάλη ευαισθησία στη διάγνωση λοίμωξης από εντεροϊούς, όμως δεν μπορεί να διακρίνει τους διάφορους οροτύπους (Bell et al., 1986, Magnius et al., 1988).

Η εφαρμογή της μοριακής βιολογίας στην κλινική βιολογία, έχει αλλάξει σημαντικά και τις μεθόδους διάγνωσης. Λόγω του πλεονεκτήματος της ταχύτητας, πολλές μοριακές μέθοδοι έχουν αντικαταστήσει τις παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης και ταυτοποίησης των εντεροϊών (Pallansch and Roos, 2007).

Η πρώτη μοριακή μέθοδος ανίχνευσης εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *in situ* υβριδοποίηση με την χρήση cDNA ανιχνευτών (M.Oikarinen et al., 2008). Η μέθοδος αυτή παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την κατανομή της λοίμωξης από εντεροϊούς στα διάφορα κύτταρα, όμως δεν είναι αρκετά ευαίσθητη για την διάγνωση εντεροϊών από κλινικά

δείγματα κοπράνων, εγκεφαλονωτιαίου και περικαρδικού υγρού, ούτε για την ταυτοποίηση διαφορετικών οροτύπων καθώς οι cDNA ανιχνευτές μπορούν να ανιχνεύουν το γενετικό υλικό μιας ευρείας ομάδας εντεροϊών.

Η ανάπτυξη της τεχνικής RT – PCR (Αντίστροφης Μεταγραφής – Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης) παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την ανίχνευση ιικού RNA από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (Kessler et al., 1997, Olive et al., 1990, Rotbart et al. 1994). Με τη χρήση κατάλληλων εκκινητικών μορίων που στοχεύουν στις διατηρημένες περιοχές του ιικού γενώματος (Romero J.R., 1999), όπως η 5'UTR, είναι δυνατή η ανίχνευση των περισσότερων ή όλων των εντεροϊών περιλαμβανομένων και αυτών των οποίων δεν είναι εφικτή η ανάπτυξη τους σε κυτταροκαλλιέργεια (Thoelen et al., 2003, Bolonaki et al., 2005, Siafakas et al., 2003). Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και ταχύτητα στην έκδοση των αποτελεσμάτων και γι' αυτό το λόγο αποτελεί σημαντική εφαρμογή στην κλινική διάγνωση. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η αδυναμία ταυτοποίησης του οροτύπου του εντεροϊού. Συνεπώς, για την ταυτοποίηση του ιού απαιτείται κάποια μέθοδος συμπληρωματική της RT-PCR όπως πχ η ανάλυση πολυμορφισμού τμημάτων των προϊόντων της RT-PCR από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (RFLP) (Siafakas et al., 2002, Siafakas et al., 2003).

Εκτός από την διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, η RT-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των διαφορετικών στελεχών με την χρήση ειδικών ζευγών εκκινητικών μορίων που το καθένα αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο στέλεχος. Έχουν βρεθεί οι αλληλουχίες που προσδιορίζουν τις αντιγονικές ιδιότητες των ιών και έτσι σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια που στοχεύουν σε αυτές (Melnick J.L., 2001).

Η RT-PCR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μοριακή τυποποίηση των εντεροϊών, ακολουθούμενη από τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ιικού γενώματος. Συγκεκριμένα, ενισχύεται το γονιδίου της VP1 καψιδιακής πρωτεΐνης, η οποία είναι η πλέον εκτεθειμένη στην επιφάνεια του ώριμου ιοσώματος και φαίνεται να αντιστοιχεί στον ορότυπο του κάθε στελέχους. Με σκοπό την ενίσχυση όλων των διαφορετικών οροτύπων των εντεροϊών, χρησιμοποιούνται ειδικά σχεδιασμένοι εκφυλισμένοι εκκινητές (Oberste et al., 2003). Ακολουθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδίου και η σύγκριση με γνωστές αλληλουχίες προτύπων και αγρίων στελεχών με σκοπό την ταυτοποίηση του ιικού στελέχους. Η ανάλυση της αλληλουχίας της VP1 αποτελεί έναν σύγχρονο, ακριβή τρόπο μοριακής

ταυτοποίησης των εντεροϊών (Oberste et al., 1999, Oberste et al., 2000, Oberste et al., 2003, Caro et al., 2001, Bolanaki et al., 2006, Kottaridi et al., 2006).

### **Σκοπός της εργασίας**

Σκοπός της εργασίας είναι η χρήση πολλαπλών εκκινητικών μορίων τα οποία στοχεύουν σε διάσπαρτες περιοχές και καλύπτουν μεγάλο μέρος του γονιδιώματος των Coxsackie B ιών, με στόχο τη γρήγορη ανίχνευσή τους και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδιώματος οποιουδήποτε στελέχους.

Αρχικά έγινε διερεύνηση της καταλληλότητας ήδη σχεδιασμένων εκκινητών με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής ClustalW, με σκοπό την επιλογή των καταλληλότερων ζευγών και ακολούθησε η εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τα επιλεγμένα ζεύγη εκκινητών σε πρότυπα και κλινικά στελέχη Coxsackie B ιών.

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Πρότυπα και κλινικά στελέχη

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα 6 πρότυπα στελέχη για τους Coxsackie B ιούς (CVB1-CVB6) καθώς και 12 κλινικά στελέχη εκπροσωπώντας όλους τους οροτύπους (Πίνακας 3.). Ως θετικοί μάρτυρες για την PCR χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη Coxsackie A (CAV9) και Sabin 2. Όλα τα ιικά στελέχη, τόσο τα πρότυπα όσο και τα κλινικά, υπήρχαν διαθέσιμα σε κυτταροκαλλιέργειες Rd (κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος) και Hep-2 (κύτταρα ανθρώπινου επιδερμικού καρκινώματος) στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Η απομόνωση και η οροταυτοποίηση όλων των κλινικών στελεχών προηγήθηκαν της παρούσας μελέτης (Bolanaki et al., 2005).

Δείγμα	Ορότυπος	Προέλευση	Κλινικά Συμπτώματα	Έτος
98/74/2	CoxB1	Cantacuzino Institute	Παροδική παράλυση	1974
99/74/1	CoxB1	Cantacuzino Institute	Παροδική παράλυση	1974
118/95/2	CoxB2	Cantacuzino Institute	Άγνωστο	Άγνωστο
116/95/2	CoxB2	Cantacuzino Institute	Άγνωστο	Άγνωστο
109/85/1	CoxB3	Cantacuzino Institute	Παροδική παράλυση	1985
77/78/13	CoxB3	Cantacuzino Institute	Μηνιγγο-εγκεφαλιτιδα	1978
69/86/1	CoxB4	Cantacuzino Institute	Γαστρεντερική διαταραχή	1986
169/75/1	CoxB4	Cantacuzino Institute	Γαστρεντερική διαταραχή	1975
14/76/1	CoxB5	Cantacuzino Institute	Μηνιγγίτιδα	1970
254/77/1	CoxB5	Cantacuzino Institute	Παροδική παράλυση	1977
86/73/1	CoxB6	Cantacuzino Institute	Παροδική παράλυση	1973
7/73/19	CoxB6	Cantacuzino Institute	Άγνωστο	1973

**Πίνακας 3:** Κλινικά δείγματα Coxsackie B ιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

## **2.2 Υπολογισμός ιικού τίτλου και σειριακές αραιώσεις του ιού**

Ο αριθμός των ιικών σωματιδίων που περιέχονται σε 100μl του ιικού δείγματος αποτελεί τον τίτλο του ιού και προσδιορίστηκε σε στέλεχος CoxB6 σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (**Εικόνα 15.**) επιστρωμένη με Her-2 κύτταρα.

Σε πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (erpendorf) δημιουργούνται 8 σειριακές αραιώσεις του ιού από  $10^{-1}$ - $10^{-8}$  σε θρεπτικό υλικό MEM. Έπειτα χρησιμοποιούνται 900μl του θρεπτικού υλικού MEM και 100μl από τον ιο και δημιουργείται η αραιώση  $10^{-1}$ . Από την αραιώση αυτή τοποθετούνται 100μl σε 900μl του MEM για τη δημιουργία της αραιώσης  $10^{-2}$ . Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται μέχρι και τη δημιουργία της αραιώσης  $10^{-8}$ . Στη συνέχεια 1ml της αραιώσης  $10^{-1}$  ενοφθαλμίζεται στις θέσεις A1-A10 (100μl/θέση), ενώ 1ml της αραιώσης  $10^{-2}$  ενοφθαλμίζεται στις θέσεις B1-B10 (100μl/θέση). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι και τον ενοφθαλμισμό της  $10^{-8}$  αραιώσης στην πλάκα. Οι στήλες 11 και 12 χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες. Η πλάκα τοποθετείται για επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$  και παρακολουθείται καθημερινά για την εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίζεται ο ιικός τίτλος είναι:

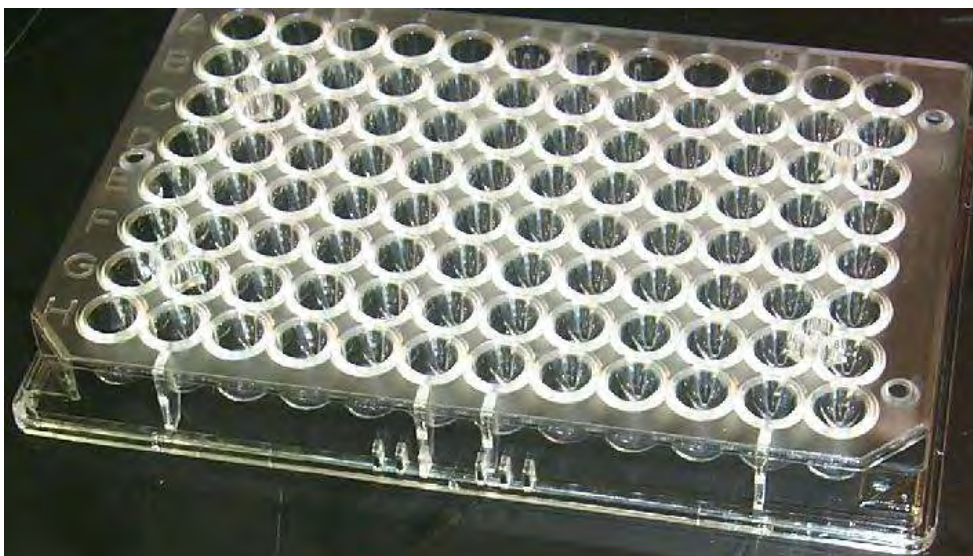
$$\log\text{TCID}_{50} = L - d(S - 0,5)$$

L: η μικρότερη αραιώση όπου εμφανίζεται πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρείται κυτταροπαθογόνος δράση.

Μετά τον υπολογισμό του ιικού τίτλου χρησιμοποιήθηκαν οι υποδεκαπλάσιες σειριακές αραιώσεις του ιού για τον έλεγχο ευαισθησίας των PCR.



**Εικόνα 15:** Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων.

### 2.3 Εκχύλιση ιικού RNA

Η εκχύλιση του RNA έγινε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) (Casas et al., 1995). Συγκεκριμένα, σε eppendorf των 2 ml αναμείχθηκαν 10 μl γλυκογόνου (100 mg/ml), 100 μl από το κάθε δείγμα και 300 μl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min, ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών, η αποδιάταξη των πρωτεϊνών και να απελευθερωθεί το ιικό RNA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C), ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και τα eppendorf τοποθετήθηκαν για 20 min στους -20°C. Ύστερα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 14.000 rcf στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500 μl παγωμένης αιθανόλης 70%. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και δεύτερη φυγοκέντρηση για 10 min στις 14.000 rcf στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl διπλά απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O) ελεύθερου νουκλεασών. Το RNA των δειγμάτων αποθηκεύθηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

#### Διάλυμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης(GuSCN):

4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiothreitol, 25mM sodium citrate (Merck, Germany).

### 2.4 Εκκινητικά Μόρια

Ο σχεδιασμός και η επιλογή των κατάλληλων εκκινητών γίνεται σύμφωνα με τις σταθερές περιοχές του DNA-στόχου. Επιπλέον οι εκκινητές πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή στο 5' άκρο τους, να απέχουν μεταξύ τους τουλάχιστον κατά 80 ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (melting temperature,  $T_m$ ).

Το ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) είναι ένα πρόγραμμα που πραγματοποιεί στοίχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με εξαιρετική ακρίβεια και ταχύτητα. Χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την επιλογή των καταλληλότερων, από ένα σύνολο εκκινητικών μορίων που είχαν σχεδιαστεί για εντεροϊούς, σε προηγούμενες εργασίες (Πίνακας 4). Έγινε στοίχιση των αλληλουχιών όλων των εκκινητικών μορίων με την αλληλουχία κάθε πρότυπου στελέχους των Coxsackie B ιών, που έχει κατατεθεί στην GeneBank. Η επιλογή έγινε με κριτήρια την ταύτιση της αλληλουχίας, την θερμοκρασία αποδιάταξης ( $T_m$ ) και την περιοχή

υβριδισμού κάθε μορίου, έτσι ώστε να επιλεγθούν τα καταλληλότερα ζεύγη και να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του γονιδιώματος Coxsackie B ιών.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Πολικότητα	Περιοχή	Προϊόν	Βιβλιογραφία ή αναφορά
UG <sub>52</sub>	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	Sense	5'UTR	168-188	Georgopoulou et al. (2000)
UC <sub>53</sub>	TTGTCACCATAACCAGCCA	Antisense	5'UTR	588-606	Georgopoulou et al., 2000
ENV-2	CCCCTGAATGCGGCTAATC	Sense	5'UTR	451-469	Bessaud et al. 2008
1200R	GGGAATTTCCACCACCACCC	Antisense	VP2	1196–1177	Lukashev et al., 2005
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARA YNGG	Sense	VP1	2602-2627	Nix et al., 2000
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYR WACAT	Antisense	VP1	2977-2951	Nix et al., 2000
EUG3a	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	Sense	VP1	2946-2965	Caro et al., 2001
EUG3b	TGGCAAACATCTTCMAATCC	Sense	VP1	2946-2965	Caro et al., 2001
EUG3c	TGGCAGACTTCAACHAACCC	Sense	VP1	2946-2965	Caro et al., 2001
EUC2	TTTGCACCTTGAAGTGTATGTA	Antisense	2C	4413-4433	Caro et al., 2001
EUC2a	GGTTCAATACGGCATTG	Antisense	2C	4428-4448	Caro et al., 2001
EUC2b	GGTTCAATACGGTGTGTTGCT	Antisense	2C	4428-4448	Caro et al., 2001
CHR1	CNTCHCARAGTGAYCARGARCA RYT	Sense	2C	4284-4308	Kottaridi et al. 2007
CHR2	GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAK A	Antisense	3A	5084-5061	Kottaridi et al. 2007
HEV-B (481)	ACCCTACYGYAYTAACCGAAC	Sense	3'UTR	7325 – 7356	Oberste et al. 2006
HEV-B (424)	CCGCACCGAAYGCGGAKAATTT AC	Antisense	3'UTR	7389–7367	Oberste et al. 2006

**Πίνακας 4:** Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.



## 2.5 Αντίστροφη Μεταγραφή (RT)

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι θετικής πολικότητας RNA, θα πρέπει να προηγηθεί η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA, ώστε να ακολουθήσει η ενίσχυση με PCR συγκεκριμένων περιοχών του γενώματος του ιού.

Σε eppendorf των 500  $\mu$ l προστέθηκαν 5  $\mu$ l RNA (από κάθε δείγμα) και 7  $\mu$ l από το μείγμα (M1), το οποίο περιείχε τυχαίους εκκινητές HEPTAN (N7) (Metabion) (100 pmol), 10mM από κάθε dNTP και 5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια τα δείγματα (eppendorf) φυγοκεντρήθηκαν και επώαστηκαν στους 65°C για 5 min σε θερμοκυκλοποιητή. Αμέσως μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετήθηκαν στον πάγο και προστέθηκε το δεύτερο μείγμα (M2). Το M2 περιείχε 4  $\mu$ l 5x first strand buffer, 2  $\mu$ l 0,1M DTT, 1  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu$ l RNase out (20 u/ $\mu$ l) καθώς και 100 u ένζυμο RT M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA). Ακολούθησε φυγοκέντρωση και επώαση αρχικά στους 25°C για 10 min, μετά στους 37°C για 50 min και τέλος στους 70°C για 15 min.

Εκτός από την αντίστροφη μεταγραφή με τυχαίους εκκινητές πραγματοποιήθηκε και αντίστροφη μεταγραφή με συγκεκριμένους αντικωδικούς εκκινητές, τους EUC2a και EUC2b, σε συγκέντρωση 10 pmol και σε θερμοκρασία επώασης 42°C για 50min.

## 2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε eppendorf των 200  $\mu$ l. Σε όλες τις αντιδράσεις το μείγμα αποτελείται από 2  $\mu$ l εκκινητών (1  $\mu$ l από τον καθένα, συγκέντρωσης 50 pmol), 5  $\mu$ l 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5  $\mu$ l από μείγμα dNTPs με αρχική συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, UK), 2,5 units Paq DNA πολυμεράση (Paq5000 Polymerase, Agilent Technologies, USA), 3  $\mu$ l cDNA από κάθε δείγμα και ddH<sub>2</sub>O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 47  $\mu$ l. Στο ζεύγος εκκινητών HEV-B(481)/HEV-B(424) χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 12,5 pmol ο καθένας εκκινητής.

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους. Κάθε κύκλος πραγματοποιείται σε στάδια-φάσεις και αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA-στόχου.

Το κύριο προϊόν της PCR είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές. Το μέγεθος του προϊόντος σε ζεύγη βάσεων ισούται με το άθροισμα των βάσεων των εκκινητών και της παρεμβλλόμενης αλληλουχίας του DNA-στόχου που επεκτείνεται.

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει 3 διαφορετικές θερμοκρασίες για τα 3 στάδια: αποδιάταξης, υβριδοποίησης και πολυμερισμού-επιμήκυνσης, οι οποίες είναι ξεχωριστές για κάθε ζεύγος

εκκινητών (**Πίνακας 5**). Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας επιτυγχάνονται με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, των θερμικών ανακυκλωτών ή θερμοκυκλοποιητών και είναι ταχύτατες, ώστε αυξομειώσεις της τάξεως των 40°C λαμβάνουν χώρα σε λιγότερο από ένα λεπτό. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής της εταιρείας eppendorf (Mastercycler personal).

Η ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος της αντίδρασης πιστοποιείται με την παρουσία ομοιογενούς προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου.

<b>Ζεύγος Εκκινητών</b>	<b>Συνθήκες</b>	<b>Μέγεθος Προϊόντος</b>	<b>Αριθμός Κύκλων</b>
<b>UG52 /UC53</b>	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδισμός: 63°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	458	50
<b>ENV-2/1200R</b>	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδισμός: 47°C για 20sec Επιμήκυνση: 72°C για 1min	745	50
<b>AN89/ AN88</b>	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδισμός: 60°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	375	50
<b>EUG3a,b,c/ EUC2</b>	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδισμός: 45°C για 1min Επιμήκυνση: 72°C για 1min	1487	50
<b>CHR1/ CHR2</b>	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδισμός: 50°C για 20sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	800	50
<b>HEV-B(481)/HEV-B(424)</b>	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδισμός: 48°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 10sec	64	50

**Πίνακας 5:** Συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για κάθε ζευγάρι εκκινητών

### 2.6.1 Auto-nested PCR

Για την περαιτέρω ενίσχυση των προϊόντων με τα εκκινητικά μόρια ENV2/1200R πραγματοποιήθηκε auto-nested PCR. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται ενίσχυση με το ζεύγος εκκινητών ENV2/1200R. Συγκεκριμένα, το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl προϊόντος της PCR, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα, συγκέντρωσης 25 pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Paq reaction buffer), 5 μl από μείγμα dNTPs με αρχική συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, UK), 2,5 units Paq DNA πολυμεράση (Paq5000 Polymerase, Agilent Technologies, USA), και ddH<sub>2</sub>O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 50 μl. Σε κάθε αντίδραση auto-nested PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2 min και ακολουθούν τα εξής τρία στάδια: αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, με συνθήκες για το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών και για 25 κύκλους. Το τελευταίο στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις είναι μια επώαση για 5 min στους 72°C. Στο δεύτερο στάδιο το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται για τη δεύτερη. Συγκεκριμένα, το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl προϊόντος της PCR, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα, συγκέντρωσης 25 pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Paq reaction buffer), 5 μl από μείγμα dNTPs με αρχική συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, UK), 2,5 units Paq DNA πολυμεράση (Paq5000 Polymerase, Agilent Technologies, USA), και ddH<sub>2</sub>O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 50 μl. Ακολουθούν τα 3 στάδια αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, με συνθήκες για το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών όμως για 40 κύκλους. Το τελευταίο στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις είναι μια επώαση για 5 min στους 72°C.

### **2.7 Ηλεκτροφόρηση Προϊόντων της PCR**

Η εξέταση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή αгарόζης. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζουμε ποιοτικά εάν ενισχύθηκε η περιοχή του DNA που μας ενδιαφέρει και εξακριβώνουμε ότι δεν πολλαπλασιάστηκαν, παράλληλα, μη ειδικά τμήματα DNA.

Η συγκέντρωση του πηκτώματος στις περισσότερες ηλεκτροφορήσεις ήταν 2%. Πραγματοποιήθηκαν όμως μία ηλεκτροφόρηση με εκκινητές τους EUG3a,b,c/ EUC2 και μέγεθος προϊόντος 1487bp με συγκέντρωση πηκτώματος 1,5% και μία ηλεκτροφόρηση με εκκινητές τους HEV-B(481)/HEV-B(424) και μέγεθος προϊόντος 64bp με συγκέντρωση πηκτώματος 3% για την ανίχνευση αυτών των μικρότερων τμημάτων. Συγκεκριμένα, για ένα πήκτωμα 2% διαλύονται 1,2 gr αгарόζης σε 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (Tris Boric

EDTA). Προστίθενται επίσης και 100  $\mu$ l βρωμιούχου αιθιδίου (1  $\mu$ g/ml), το οποίο ενσωματώνεται στο DNA και φθορίζει σε μήκος κύματος 290 nm. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα, φορτώνουμε 10  $\mu$ l του κάθε προϊόντος της PCR αναμεμιγμένα με 2  $\mu$ l χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 120 Volts περίπου για 1 h. Στη συνέχεια τοποθετείται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne) και φωτογραφίζεται.

### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έξι διαφορετικά ζεύγη εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR με σκοπό την ενίσχυση τμημάτων του γονιδιώματος των πρότυπων και κλινικών στελεχών των Coxsackie B ιών. Τα στελέχη μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση με PCR ήταν ο Sabin 2 (S2) και CAV9 (Coxsackie A9) ως θετικοί μάρτυρες και Rd ως αρνητικός μάρτυρας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 6 και 7.

#### 3.1 Αποτελέσματα PCR –Πρότυπα στελέχη

Πιο αναλυτικά παρατηρούμε ότι το ζεύγος UG52/UC53 ήταν αποτελεσματικό στην ενίσχυση όλων των πρότυπων στελεχών των Coxsackie B ιών και ενίσχυσε και το στέλεχος Sabin 2 που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας αντίστοιχα.

Ομοίως, το ζεύγος ENV2/1200R, ήταν αποτελεσματικό σε όλα τα πρότυπα στελέχη των Coxsackie B ιών και ενίσχυσε και το στέλεχος Sabin 2 αποτελεσματικά. Επίσης ζώνες στις 375bp έδωσαν όλα τα πρότυπα στελέχη με το ζεύγος εκκινητών AN89/AN88 και ίδια ενίσχυση μαρτύρων.

Οι εκκινητές EUG3a,b,c/EUC2 είχαν εξίσου θετικό αποτέλεσμα για όλα τα πρότυπα στελέχη, αλλά ενίσχυσαν μόνο το στέλεχος Sabin 2 και όχι το CAV9 που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες.

Τα ζεύγη εκκινητών CHR1/CHR2 και HEV-B(481)/HEV-B(424) ενίσχυσαν εξίσου αποτελεσματικά όλα τα πρότυπα στελέχη, αλλά στην PCR με τους CHR1/CHR2 δεν ενισχύθη ο μάρτυρας Sabin 2 ενώ με τους HEV-B(481)/HEV-B(424), ενισχύθηκε ο θετικός μάρτυρας CAV9.

Ορότυπος	UG <sub>52</sub> /UC <sub>53</sub>	ENV2/1200R	AN89/AN88	EUG <sub>a,b,c</sub> /EUC2	CHR1/CHR2	HEV-B(481)/ HEV B(424)
CVB1	+	+	+	+	+	+
CVB2	+	+	+	+	+	+
CVB3	+	+	+	+	+	+
CVB4	+	+	+	+	+	+
CVB5	+	+	+	+	+	+
CVB6	+	+	+	+	+	+

**Πίνακας 6.:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα PCR πρότυπων CBV στελεχών και μαρτύρων.

### 3.2 Αποτελέσματα PCR –Κλινικά στελέχη

Για την ενίσχυση 12 κλινικών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια ζεύγη εκκινητών και τα συνολικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**.

Πιο ειδικά το ζεύγος εκκινητών UG<sub>52</sub>/UC<sub>53</sub> ήταν εξίσου αποτελεσματικό σε όλα τα κλινικά στελέχη.

Για τους εκκινητές ENV2/1200R δεν παρατηρήθηκε ικανοποιητική ενίσχυση, σε όλα τα κλινικά στελέχη. Διακριτές ζώνες έδωσαν μόνο τα 8 από τα 12 κλινικά δείγματα. Το ζεύγος εκκινητών AN89/AN88 δεν οδήγησε στην ενίσχυση των περισσότερων κλινικών στελεχών εκτός τεσσάρων και ενός εκ των μαρτύρων, του CAV9. Ανεπιτυχής ενίσχυση έγινε και με τους εκκινητές EUG<sub>3a,3b,3c</sub>/EUC<sub>2</sub> με μόνο 2 κλινικά στελέχη να δίνουν ζώνες ενίσχυσης.

Τέλος, οι εκκινητές CHR1/CHR2 οδήγησαν σε επιτυχή ενίσχυση όλων των κλινικών στελεχών. Οι εκκινητές (HEV-B(481)/HEV-B(424) ενίσχυσαν όλα τα κλινικά στελέχη εκτός από ένα.

Δείγμα	Ορότυπος	UG <sub>52</sub> /UC <sub>53</sub>	ENV2/1200R	AN89/AN88	EUG <sub>a,b,c</sub> /EUC <sub>2</sub>	CHR1/CHR2	HEV-B (481) /HEV B(424)
98/74/2	CoxB1	+	+	-	-	+	-
99/74/1	CoxB1	+	-	-	-	+	+
118/95/2	CoxB2	+	-	-	-	+	+
116/95/2	CoxB2	+	αχνή	-	-	+	+
109/85/1	CoxB3	+	-	-	-	+	+
77/78/13	CoxB3	+	+	+	-	+	+
69/86/1	CoxB4	+	-	-	-	+	+
169/75/1	CoxB4	+	+	-	-	+	+
14/76/1	CoxB5	+	+	-	-	+	+
254/77/1	CoxB5	+	+	+	-	+	+
86/73/1	CoxB6	+	+	+	+	+	+
7/73/19	CoxB6	+	+	+	+	+	+

**Πίνακας 7.:** Αποτελέσματα PCR κλινικών δειγμάτων.

### 3.3 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας

Για τα 6 ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος ευαισθησίας με το δείγμα CoxB6 από τα πρότυπα δείγματα, σε συγκεντρώσεις  $10^5$  TCID/0,1ml,  $10^3$  TCID/0,1ml, 10 TCID/0,1ml, 1 TCID/0,1ml, και  $10^{-1}$  TCID/0,1ml. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν καταγράφονται στον **Πίνακα 8**.

Αραιώσεις CoxB6	UG <sub>52</sub> /UC <sub>53</sub>	ENV2/1200R	AN89/AN88	EUGa,b,c/EUC2	CHR1/CHR2	HEV-B (481) /HEV B(424)
$10^5$	+	+	+	+	+	+
$10^3$	+	+	+	+	+	+
10	+	-	+	+	-	+
1	+	-	-	+	-	+
$10^{-1}$	+	-	-	-	-	+

**Πίνακας 8:** Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι Coxsackie B ιοί (CVB) έχουν συσχετιστεί με μια ποικιλία ασθενειών του ανθρώπου που κυμαίνονται από συμπτώματα κοινού κρυολογήματος, ήπια γαστρεντερική δυσφορία έως και περικαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, παγκρεατίτιδα και άσηπτη μηνιγγίτιδα. Προκαλούν μια ευρεία ποικιλία συμπτωμάτων.

Η διάγνωση της μόλυνσης με εντεροϊούς και ο χαρακτηρισμός τους μπορεί να είναι πολύπλοκη διαδικασία. Η δυσκολία οφείλεται στο γεγονός ότι οι εντεροϊοί μπορούν να βρισκονται στο αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα τόσο υγιών όσο και ασθενών ατόμων με μεγάλη ποικιλία στην κλινική εικόνα καθώς οι μολύνσεις είναι συνήθως ασυμπτωματικές ή παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα. Λόγω της ομοιότητας των συμπτωμάτων που προκαλούνται από διαφορετικούς τύπους εντεροϊών, υπάρχει ανάγκη όχι μόνο διάγνωσης αλλά και ταυτοποίησής τους. Επίσης λόγω του υψηλού ρυθμού εξέλιξής τους είναι ανάγκη να γνωρίζουμε πληροφορίες από διάφορα τμήματα του γονιδιώματός τους. Η γρήγορη ανίχνευση και ταυτοποίησή τους, όπως και των υπόλοιπων Εντεροϊών, επιτυγχάνεται πλέον με την εφαρμογή των σύγχρονων μοριακών μεθόδων RT-PCR, στοχεύοντας και ενισχύοντας τμήματα σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματός τους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 6 ζεύγη κατάλληλων εκκινητών που στοχεύουν σε διαφορετικές περιοχές του γενόματος των εντεροϊών (**Πίνακας 4**). Όπως φαίνεται και από προηγούμενες συγκριτικές μελέτες (Kottaridi et al., 2004, Bolonaki et al., 2005) κάθε περιοχή ενδείκνυται για διαφορετικό σκοπό.

Η 5' UTR είναι μια σχετικά συντηρημένη περιοχή στο γονιδίωμα των Εντεροϊών. Για το λόγο αυτό η ενίσχυση τμημάτων της χρησιμοποιείται για την ανίχνευσή τους (Bolanaki et al., 2005, Kyriakopoulou et al., 2012). Στην 5' UTR εφαρμόστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Το ζεύγος UG<sub>52</sub>/UC<sub>53</sub> ήταν αποτελεσματικό στην ανίχνευση τόσο των πρότυπων όσο και των κλινικών στελεχών. Οι UG<sub>52</sub>/UC<sub>53</sub> είναι οι καταλληλότεροι εκκινητές για την ανίχνευση πρότυπων και κλινικών στελεχών διότι στοχεύουν σε πολύ συντηρημένες περιοχές με δευτεροταγείς δομές. Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών που στοχεύει στην 5'UTR/VP2 περιοχή, οι ENV2/1200R, ήταν εξίσου αποτελεσματικό σε όλα τα πρότυπα στελέχη στα οποία δοκιμάστηκε αλλά όχι και σε όλα τα κλινικά. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η VP2 καψιδιακή περιοχή βρίσκεται στο εξωτερικό του καψιδίου και φέρει αντιγονικές περιοχές, δεχόμενη εξελικτική πίεση, και έτσι καθίσταται αρκετά ευμετάβλητη και εύκολα συσσωρεύει μεταλλάξεις.



Στην VP1 περιοχή, εφαρμόστηκε το ζεύγος εκκινητών AN89/AN88, το οποίο ενίσχυσε αποτελεσματικά όλα τα πρότυπα δείγματα αλλά δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα και στα κλινικά δείγματα καθώς ενίσχυσε μόνο 4 από αυτά. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι εκκινητές AN89/AN88 είναι εκφυλισμένοι όπως φαίνεται και από την αλληλουχία τους (Πίνακας 4). Βέβαια πρέπει να έχουμε κατά νου ότι η VP1 πρωτεΐνη, όπως και η VP2, βρίσκεται στο εξωτερικό του καψιδίου των εντεροϊών και φέρει τα κύρια αντιγονικά σημεία του ιού. Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζει τον ορότυπο του ιού και θεωρείται η καταλληλότερη για την μοριακή ταυτοποίηση των διαφόρων οροτύπων εντεροϊών (Oberste et al., 2004). Λόγω του υψηλού ρυθμού μεταλλάξεων που εμφανίζεται στην συγκεκριμένη περιοχή είναι προτιμότερη η χρήση εκφυλισμένων εκκινητικών μορίων παρέχοντας την δυνατότητα αναγνώρισης και ενίσχυσης περισσότερων στελεχών εντεροϊών (Nix et al., 2006).

Επίσης, οι εκκινητές EUG3a,b,c/EUC2a, ενισχύουν ένα μεγάλο τμήμα του γονιδιώματος που περιλαμβάνει το 3' άκρο της VP1, τις 2A, 2B και το 5' άκρο της 2C περιοχής. Οι εκκινητές αυτοί ομοίως έδωσαν ζώνες για όλα τα πρότυπα στελέχη αλλά απέτυχαν να ενισχύσουν και όλα τα κλινικά. Μόνο 2 από αυτά ενισχύθηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η VP1 καψιδιακή περιοχή εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό μεταβλητότητας και μπορεί να υφίσταται μεταλλάξεις (Muir et al., 1998).

Το επόμενο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε, CHR1/CHR2, ενισχύει ένα τμήμα που περιλαμβάνει τις 2C και 3A περιοχές. Ενίσχυσε αποτελεσματικά όλα τα πρότυπα και κλινικά στελέχη και τους μάρτυρες, εκτός από το εμβολιακό στέλεχος S2, λογικό αφού οι εκκινητές αυτοί σχεδιάστηκαν βάση των HEVB και ο S2 είναι HEVC.

Στην 3'UTR περιοχή εφαρμόστηκε το ζεύγος HEV-B(481)/HEV-B(424) με εξίσου πολύ αποτελεσματική ενίσχυση όλων των στελεχών, πρότυπων και κλινικών. Και αυτοί οι εκκινητές δεν έδωσαν ζώνη για τον μάρτυρα S2 καθώς σχεδιάστηκαν για να ανιχνεύουν ιούς της ομάδας των HEVB μόνο και όχι των HEVC.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καταδεικνύουν την καταλληλότητα κάποιων εκκινητικών μορίων για την ανίχνευση και ενίσχυση διαφόρων περιοχών του γονιδιώματος των Coxsackie B ιών. Ιδιαίτερα ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα για την ενίσχυση των δύο ακραίων περιοχών του γονιδιώματος. Με τη χρήση τους μπορούμε να συλλέξουμε πληροφορίες από διάφορα σημεία του γενώματος τους καθώς επίσης παρέχουν τις αλληλουχίες για το σχεδιασμό εκκινητικών μορίων με απώτερο στόχο την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος κυκλοφορούντων στελεχών.

## 5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ali, M.A. and Abdel-Dayem, T.M.K.** (2003) Myocarditis: an expected health hazard associated with water resources contaminated with Coxsackie viruses type B. *International Journal of Environmental Health Research*, 13(3), 261–270.
- Andréoletti, L., Hober, D., Hober-Vandenberghc, C., Isabelle Fajardy, I., Belaich, S., Lambert, V., Vantighem, M-C., Lefebvre, J. and Wattre, P.** (1998) Coxsackie B virus infection and beta cell autoantibodies in newly diagnosed IDDM adult patients. *Clinical and Diagnostic Virology*, 9,125–133.
- Anonymous** (1997) Nonpolio enterovirus surveillance – United States, 1993–1996. *MMWR*, 46(32), 748–750.
- Anonymous** (2000) Enterovirus surveillance – United States 1997–1999. *MMWR*, 49(40), 913–916.
- Anonymous** (2002) Enterovirus surveillance – United States, 2000–2001. *MMWR*, 51(46), 1047–1049.
- Arnold E, Luo M, Vriend G.** Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:21-25.
- Banerjee R, Dasgupta A.** (2001) Interaction of picornavirus 2C polypeptide with the viral negative-strand RNA. *J Gen Virol.* 2001 Nov;82(Pt 11):2621-7.
- 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 – 3364
- Bell EJ, McCartney RA, Basquill D, Chaudhuri AK.** (1986) Mu-antibody capture ELISA for the rapid diagnosis of enterovirus infections in patients with aseptic meningitis. *J Med Virol.* 1986 Jul;19(3):213-7.

**Belov G. A., Bonnet N. A., Kovtunovych G., Jackson C. L., Lippincott – Schwartz J., Ehrenfeld E.** (2007) Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *J. Virol.* 81(2): 558 – 567

**Bergelson, J.M., M. Chan, K.R. Solomon, N.F.St.John, H.Lin, and R.W.Finberg,** (1994). Decay –accelarating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol- anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6245-6248.

**Bergelson, J.M.,Cunningham JA, Droguett G.** 1997. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses an adenoviruses2 and 5. *Science* 1997:275:1320-1323.

**Bessaud M., Jequic S., Joffret M. L., Barge C., Balanant J., Gouandjika – Vasilacle I., Delpeyroux F.** (2008) Characterization of the genome of human enteroviruses: design of generic primers for amplification and sequencing of different regions of the viral genome. *J. Virol. Methods* 149(2): 277 – 284

**Bienz K, Egger D, Troxler M, Pasamontes L.** (1990) Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol.* 1990 Mar;64(3):1156-63.

**Blondel B, Duncan G, Couderc T, Delpeyroux F, Pavio N, Colbère-Garapin F.** (1998) Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J Neurovirol.* 1998 Feb;4(1):1-26. Review.

**Bolonaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorchis T.** (2005). Nucleotide analysis and phylogenetic study of the homology boundaries of coxsackie A and B viruses. *Virus Genes* 31:307-20.

**Bolonaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorchis T.** (2006). Evolution of 2B and 2C genomic parts of species B Coxsackie viruses.Phylogenetic study and comparison with other regions. *Virus Genes* 32:249-59.

**Bolonaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Kyriakopoulou Z., Margaritis L., and Katsorchis T.** (2007). Partial 3D gene sequences of Coxsackie viruses reveal interspecies exchanges. *Virus Genes*. 35:129-40.

**Burch, G.E. and Giles, T.D.** (1972) The role of viruses in the production of heart disease. *American Journal of Cardiology*, **29**, 231–240.

**Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., and Crainic R.** (2001) Molecular strategy for ‘serotyping’ of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82(1): 79 – 91

**Casas I., Powell L., Klapper P. E., and Cleator G. M.** (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods* 53: 25 – 36

**Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL.** (1988) Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 1988 Dec;26(12):2576-80.

**Clements, G.B., Galbraith, D.N. and Taylor, K.W.** (1995) Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. *The Lancet*, **346**, 221–223.

**Colston E. and V. R. Racaniello.** 1994. Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *The EMBO Journal* 13(24): 5855-5862.

**Cuconati, A., W. Xiang, F. Lahser, T. Pfister, and E. Wimmer.**1998. A Protein Linkage Map of the P2 Nonstructural Proteins of Poliovirus. *J. Virol.* **72**: 1297-1307.

**De Jesus NH** (2007). "Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis". *Virol. J.* **4**:70.doi:10.1186/1743-422X-4-70. PMID 17623069. PMC 1947962.

**Domingo E., Martinez – Salas E., Sobrino F., de la Torre J. C., Portela A., Ortin J., Lopez – Galindez C., Perez – Brena P., Villanueva N., Najera R., et al.** (1985) The

quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance – a review. *Gene* 40(1): 1 – 8

**Eliane Druyts-Voets, Lieve Van Renterghem, Sabine Gerniers.**(1993) Institute of Hygiene and Epidemiology, Brussels, Belgium Department of Bacteriology and Virology, University Hospital, Ghent, Belgium Children's Hospital, University Hospital, Ghent, Belgium

**Exindari M, Gioula G, Raptis D, Mavroidi V, Bouzia E, Kyriazopoulou V**(2005).Laboratory of Microbiology, Clinical Virology Department, Medical School, Aristotelian University of Thessaloniki, Greece

**Fields, Bernard N., David M. Knipe,** Robert M. Chanock, Joseph L. Melnick, **Bernard Roizman, Robert E. Shope** (1985).*Fields Virology*. New York: Raven Press. pp. 739–794 ISBN 0-88167-026-X.

**Fujita K, Krishnakumar SS, Franco D, Paul AV, London E, Wimmer E.** (2007) Membrane topography of the hydrophobic anchor sequence of poliovirus 3A and 3AB proteins and the functional effect of 3A/3AB membrane association upon RNA replication. *Biochemistry*. 2007 May 1;46(17):5185-99. Epub 2007 Apr 7.

**Gavrilin GV, Cherkasova EA, Lipskaya GY, Kew OM, Agol VI.** (2000). Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J Virol* 74:7381-90.

**Gauntt, C. and Huber, S.** (2003) Coxsackievirus experimental heart diseases. *Frontiers in Bioscience*, **8**, e23–35.

**Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., and Vamvakopoulos N. C.** (2000) Improved genotyping vaccine and wild-type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications.. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4337-42.

**Gmyl A. P., Belousov E. V., Maslova S. V., Khitrina E. V., Chetverin A. B., and Agol A. I.** (1999) Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J. Virol.* 73(11): 8958 – 8965

**Gromeier M., Alexander L., and Wimmer E.** (1996) Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *PNAS*. 93(6): 2370 – 2375

**Halonen P, Rocha E, Hierholzer J, Holloway B, Hyypiä T, Hurskainen P, Pallansch M.** (1995) Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization. *J Clin Microbiol*. 1995 Mar;33(3):648-53.

**Hellen C. U., Facke M., Krausslich H. G., Lee C. K., Wimmer E.** (1991) Characterization of poliovirus 2A proteinase by mutational analysis: residues required for autocatalytic activity are essential for induction of cleavage of eukaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol*. 65(8): 4226 – 4231

**Hirst G. K.** (1962) Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus, and influenza. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27: 303 – 309

**Hlavová, H.** (1989) Coxsackie A virus infections. *Ceskoslovenska Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*, 38(2), 74–81.

**Horwitz, M.S., Ilic, A., Fine, C., Balasa, B. and Sarvetnick, N.** (2004) Coxsackieviral-mediated diabetes: induction requires antigen-presenting cells and is accompanied by phagocytosis of beta cells. *Clinical Immunology*, **110**(2), 134–144.

**Hunter, P.R.** (1998) *Waterborne Disease. Epidemiology and Ecology*. John Wiley and Son Ltd, Chichester, UK.

**Jaekel, E., Manns, M. and Von Herrath, M.** (2002) Viruses and diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 958, 7.

**Kauder S. E. and Racaniello V. R.** (2004) Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* 113(12): 1743 – 1753

**Kessler HH, Santner B, Rabenau H, et al.** (1997). Rapid diagnosis of enterovirus infection by a new one-step reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:976-977

**Khetsuriani N, Parashar UD.** (2006) Enteric viral infections. In: Dale DC, Federman DD, eds. *Scientific American medicine*. New York, NY: WebMD, Inc.; 2003:1758--66.

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

**Kirkegaard K., and Baltimore D.** (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47(3): 433 – 443 77

**Knipe D. M., and Howley P. M.** (2007) *Fields Virology*, 5th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.

**Knowles N. J., Hovi T., Hyypia T., King A. M. Q., Lindberg A. M., Pallansch M. A., Palmenberg A. C., Simmonds P., Skern T., Stanway G., Yamashita T., and Zell R.** (2012) *Picornaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., and Lefkowitz E. J. *San Diego: Elsevier* 855 – 880

**Kono, R., Miyamura, K., Tajiri, E., Sasgawa, A. and Phuapradit, P.** (1977) Virological and serological studies of neurological complications of acute hemorrhagic conjunctivitis in Thailand. *Journal of Infectious Diseases*, 135, 706–713.

**Koontz, C.H. and Ray, C.G.** (1971) The role of coxsackievirus B infections in sporadic myopericarditis. *American Heart Journal*, 82(6), 750–758.

**Kopecka Helena,** (1999) Academic Press, Echoviruses. In: Allan Granoff, Robert G. Webster , "Encyclopedia of Virology, 3-Volume Set, ISBN-10: 0122270304.

**Kottaridi C., Bolanaki E., and Markoulatos P.** (2004) Amplification of Echoviruses genomic regions by different RT-PCR protocols--a comparative study. *Mol. Cell. Probes.* **18**:263-9.

**Kottaridi C., Bolanaki E., Mamuris Z., Stathopoulos C., Markoulatos P.** (2006) Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation. *Arch. Virol.* **151**:1117-32.

**Kottaridi C., Bolanaki E., Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pratti A., Markoulatos P.** (2007) Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **58**(4): 407 – 412.

**Kuttner-Kondo, L., Medof, M. E., Brodbeck, W. & Shoham, M.** (1996) *Protein Eng.* **9**, 1143–1149.

**Kuyumcu-Martinez N. M., M. E. Van Eden, P.Younan, and R. E. Lloyd.** 2004. Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation:a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. and Cell. Biology* **24**(4):1779-1790.

**Kyriakopoulou Z., Tsolis K., Pliaka V., Tsakogiannis D., Ruether I. G. A., Gartzonika C., Levidiotou – Stefanou S., Markoulatos P.** (2012) A combined 5'UTR RFLP analysis and VP1 sequencing for epidemic investigation of enteroviruses. *Arch Virol.* 2012 Sep 16.

**Lauber Chris and Alexander E,** 2012. Toward Genetics-Based Virus Taxonomy: Comparative Analysis of a Genetics-Based Classification and the Taxonomy of Picornaviruses Gorbalenya Molecular Virology Laboratory, Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Leslie, R.D. and Elliott, R.B.** 1994. Early environmental events as a cause of IDDM. Evidence and implications. *Diabetes*, **43**(7), 843-850.



**Lim Travis, Jane Yuan, Huifang Mary Zhang, Alhousseynou Sall, Zhen Liu, Yue Su, Decheng Yang,** 2008. Antisense DNA and RNA agents against picornaviruses. Providence Heart and Lung Institute, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia-St. Paul's Hospital, Vancouver, Canada

**Lukashev A. N., Lashkevich V. A., Ivanova O. E., Koroleva G. A., Hinkkanen A. E., and Ilonen J.** (2005) Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.* 86:3281-90.

**Lukacik, P., P. Roversi, J. White, D. Esser, G. P. Smith, J. Billington, P. A. Williams, P. M. Rudd, M. R. Wormald, D. J. Harvey, M. D. Crispin, C. M. Radcliffe, R. A. Dwek, D. J. Evans, B. P. Morgan, R. A. Smith, and S. M. Lea.** (2004). Complement regulation at the molecular level: the structure of decayaccelerating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:1279–1284.

**Le Gall O., Christian P., Fauquet C. M., King A. M. Q., Knowles N. J., Nakashima N., Stanway G., Gorbalenya E. E.** (2008) *Picornavirales*, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo T=3 virion architecture. *Arch. Virol.* 153(4): 715 – 727.

**Magnius LO, Saleh LH, Vikerfors T, Norder H.** (1988). A solid-phase reverse immunosorbent test for the detection of enterovirus IgM. *J Virol Methods.* 1988 May;20(1):73-82.

**Marcotte L. L., Wass A. B., Gohara D. W., Pathak H. B., Arnold J. J., Filman D. J., Cameron C. E., and Hogle J. M.** (2007) Crystal structure of poliovirus 3CD Protein: virally encoded protease and precursor to the RNA-dependent RNA polymerase. *J.Virol.* 81(7): 3583 – 3596.

**McAbee, G.N. and Kadakia, S.** (2001) A child with Coxsackie A3 encephalitis. *Pediatric Neurology*, 25(1), 84.

**Melchers W. J., Zoll J., Tessari M., Bakhmutov D. V., Gmyl A. P., Agol V. I., and Heus H. A.** (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* 12(9): 1671 – 1682.

**Melnick J. L., Rennick V., Hampil, Schmidt N. J., Ho H. H.** (1973) Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull World Health Organ.* 48(3): 263 – 268.

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

**Mena, I., Perry, C.M., Harkins, S., Rodriguez, F., Gebhard, J. and Whitton, J.L.** (1999) The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *American Journal of Pathology*, **155**, 1205–1215.

**Mena, I., Fischer, C., Gebhard, J.R., Perry, C.M., Harkins, S. and Whitton, J.L.** (2000) Coxsackievirus infection of the pancreas: evaluation of receptor expression, pathogenesis, and immunopathology. *Virology*, **271**, 276–288.

**Minor D. Philip, Morgan-Capner Peter, Muir Peter,** (2000), Enteroviruses, Principles and Practice of Clinical Virology, Fourth Edition Pages: 427–449, 2000 Published Online : 15 OCT 2002, DOI: 10.1002/0470842474.ch14.

**Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M. N., Poyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G. M., and van Loon A. M.** (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(1): 202 – 227.

**Murray K. E. and D. J. Barton.** 2003. Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(8): 4739-4750.

**Nardelli L., Lodetti E., Gualandi G. L., Burrows R., Goodbridge D., Brown F., Cartwright B.** (1968) A foot and mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus. *Nature* 219(5160): 1275 – 1276.

**Nasri D., Bouslama L., Omar S., Saoudin H., Bourlet T., Aouni M., Pozzetto B., Pillet S.** (2007) Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J. Clin. Microbiol.* 45(8): 2370 – 2379.

**Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA.** (2006) Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006 Aug;44(8):2698-704.

**Nomoto A., Detjen B. M., Pozzatti R., Wimmer E.** (1977) Location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* 268(5617): 208 – 213.

**Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Flemister M. R., Brown B. A., and Pallansch M. A.** (1999) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* 37(5): 1288 – 1293.

**Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA.** (2000) Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 2000 Mar;38(3):1170-4.

**Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA.** (2003) Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol.* 2003 Apr;26(3):375-7.

**Oberste M. S., Maher K., and Pallansch M. A.** (2004) Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J. Virol.* 78:855-67.

**Oberste M. S., Maher K., Schnurr D., Flemister R. M., Lovchik C. J., Peters H., Sessions W., Kirk C., Chatterjee N., Fuller S., Hanauer J. M. and Pallansch A. M.** (2004). Evnterivirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enterovirus and the rhinoviruses. *J. Gen. Virol.* 85:2577-2584.

**Oberste M. S., Michele S. M., Maher K., Schnurr D., Cisterna D., Junttila N., Uddin M., Chomel J. J., Lau C. S., Ridha W., al-Busaidy S., Norder H., Magnus L. O., and Pallansch M. A. (2004)** Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J. Gen. Virol.* **85**:3205-3212.

**Oberste M. S., Peñaranda S., and Pallansch M. A. (2004)** RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. *J. Virol.* **78**:2948-55.

**Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, Peñaranda S, Mishrik N, Uddin M, Pallansch MA. (2006)** Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol.* 2006 Jan 87(Pt 1):119-28.

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

**Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, et al. (1990).** Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J Gen Virol* 1990 71:2141-2147.

**M Oikarinen, S Tauriainen, T Honkanen, S Oikarinen, K Vuori, K Kaukinen, I Rantala, M Mäki, and H Hyöty, 2008.** Detection of enteroviruses in the intestine of type 1 diabetic patients. Department of Virology, University of Tampere, Tampere, Finland.

**Pallansch M. and Roos R., (2007).** Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2007: 840-893.

**Paul A. V., Mugavero J., Molla A., and Wimmer E. (1998)** Internal ribosomal entry site scanning of the poliovirus polyprotein: implications for proteolytic processing. *Virology* 250(1): 241 – 253.

**Palmenberg A. C.** (1987) Picornaviral processing: some new ideas. *J. Cell Biochem.* 33(3): 191 – 198 80.

**Payment, P.** (1991) Antibody levels to selected enteric viruses in a normal randomly selected Canadian population. *Immunology and Infectious Diseases*, **1**, 317–322.

**Perera, R., S. Daijogo, B. L. Walter, J. H. C. Nguyen, and B.L. Semler.** 2007. Cellular Protein Modification by Poliovirus: the Two Faces of Poly(rC)-Binding Protein. *J.Virol.***81**:8919-8932.

**Pilipenko E. V., Gmyl A. P., Agol V. I. (1995).** A model for rearrangements in RNA genomes. *Nuc. Ac. Res.* 23(11): 1870 – 1875.

**Pfister T., and Wimmer E.** (1999) Characterization of nucleotide triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem* 274(11): 6992 – 7001.

**Pfister T., Mirzayan C. and Wimmer E.** (1999) Molecular biology. In “Encyclopedia of Virology” second edition (A. Granoff and R. G. Webster, Eds) *Academic Press Ltd*: 1330 – 1348.

**Pilipenco E. V., Gmyl A. P., and Agol V. I.** (1995) A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 23(11): 1870 – 1875.

**Prevot D., Decimo D., Herbreteau C. H., Roux F., Garin J., Luc Darlix J., and Ohlmann T.** (2003) Characterization of a novel RNA – binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *EMBO* 22(8): 1909 – 1921.

**Pongpanich, B., Boonpucknavig, S., Wasi, C., Tanphaichitr, P. and Boonpucknavig, V.** (1983) Immunopathology of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. The demonstration of Coxsackie group B viral antigen in the myocardium. *Clinical Rheumatology*, 2(3), 217–222.

**Racaniello R. Vincent (2007).** Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2007: 796-838.

**Ramsingh, A.I., Chapman, N.M. and Tracy, S. (1997)** Coxsackievirus and diabetes. *Bioessays*, **19**, 793–800.

**Read SJ, Kurtz JB. (1999)** Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J Clin Microbiol.* 1999 May;37(5):1352-5.

**Rohll J. B., Moon D. H., Evans D. J., and Almond J. W. (1995)** The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J. Virol.* 69(12): 7835 – 7844.

**Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Viktorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., and Agol V. I. (1986)** The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: A model of recombination between RNA genomes. *Virology* 155(1): 202 – 213.

**Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, et al. (1994)** Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microbiol* 1994. 32:2590-25924.

**Romero JR. (1999).** Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med.* 1999 Dec;123(12):1161-9. Review.

**Rossmann M. G. and Johnson J. E. (1989)** Icosahedral RNA virus structure. *Annual Rev. Biochem.* 58: 533 – 573.

**Rossmann M. G., He Y., Kuhn R. J. (2002)** Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 10(7): 324 – 331.

**Rotbart H. A. (1991)** Nucleic acid detection systems for enteroviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 4(2): 156 – 168.

**Rueckert R. R.** (1985) Picornaviruses and their replication. *In Virology, New York, Raven Press* (ed. B. N. Fields): 705 – 738.

**Sanfacon H., Gorbalenya A. E., Knowles N. J., and Chen Y.** (2011) *Picornavirales*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International 81 Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., and Lefkowitz E. J. *San Diego, Elsevier*: 835 – 839.

**Selinka Hans-Christoph, Michael Huber, Andreas Pasch, Karin Klingel, Christian Aepinus, Reinhard Kandolf.** (1998) Department of Molecular Pathology, Institute for Pathology, University of Tübingen, Liebermeisterstr. 8, D-72076 Tübingen, Germany.

**Siafakas N., A. Gergopoulou, P. Markoulatos, N. Spyrou, and G. Stanway.** 2001. Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J. Clin. Laboratory Analysis* 15:87-95.

**Siafakas N., Markoulatos P., Stanway G., Tzanakaki G., Kourea-Kremastinou J.** (2002a). A reliable RT-PCR/RFLP assay for the molecular classification of enterovirus reference and wild type strains to either of the two genetic clusters on the basis of 5'-UTR. *Mol. Cell. Probes*. 16(3): 209-16.

**Siafakas N, Markoulatos P, Stanway G.** (2002b) Molecular classification of coxsackie A viruses on the basis of the 5'-UTR: structural and evolutionary aspects. *J Mol Evol*. 2002 Dec;55(6):638-52.

**Siafakas N., Markoulatos P., Vlachos C., Stanway G., Tzanakaki G., Kourea-Kremastinou J.** (2003). Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Mol. Cell. Probes*. 17(2-3): 113-23.

**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(20): 7859 – 7875.

**Stanway G.** (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* 71(11): 2483 – 2501.

**Shulman L.M., Manor Y., Azar R., Handsher R., Vonsover A., Mendelson E., Rothman S., Hassin D., Halmut T., Abramovitz B., Varsano N.** (1997). Identification of a new strain of fastidious enterovirus 70 as the causative agent of an outbreak of hemorrhagic conjunctivitis. *J. Clin. Microbiol.* 35(8): 2145-9.

**Thoelen I, Lemey P, Van Der Donck I, Beuselinck K, Lindberg AM, Van Ranst M.** (2003). Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J Med Virol.* 2003 Jul;70(3):420-9.

**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(5): 761 – 770.

**Todd S., Nguyen J.H., Semler B.L.** (1995). RNA-protein interactions directed by the 3' end of human rhinovirus genomic RNA. *J. Virol.* 69(6): 3605-14.

**Towner J. S., Brown D. M., Nguyen J. H. C., and Semler B. L.** (2003) Functional conservation of the hydrophobic domain of polypeptide 3AB between human rhinovirus and poliovirus. *Virology.* 314:432-442.

**Ward, S.** (2001) Complement modulates induction of autoimmune myocarditis. *Trends in Immunology*, 22(10), 544.

**Wimmer E., Hellen C. U., and Cao X.** (1993) Genetics of poliovirus. *Annual Rev. Genet.* 27: 353 – 436.

**Wolfgram, L.J., Beisel, K.W. and Rose, N.R.** (1985) Heart-specific autoantibodies following murine coxsackievirus B3 myocarditis. *Journal of Experimental Medicine*, 161, 1112–1121.



**Wong C. Y., Woodruff J. J., Woodruff J. F. (1977)** Generation of cytotoxic T lymphocytes during coxsackievirus B-3 infection. III. Role of sex. *J. Immunol.* 119(2): 591 – 597.

**Xiangxi Wang,Wei Peng,Jingshan Ren,Zhongyu Hu, Jiwei Xu,Zhiyong Lou,Xumei Li,Weidong Yin,Xinliang Shen,Claudine Porta,Thomas S Walter,Gwyndaf Evans,Danny Axford,Robin Owen,David J Rowlands,Junzhi Wang,David I Stuart,Elizabeth E Fry ,Zihe Rao, 2012.** A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71 *Nature Structural & Molecular Biology* 19 424–429.

**Yanping Chen, Jay Evans, Mark Feldlaufer, 2006.** USDA-ARS, Bee Research Laboratory, Beltsville, MD 20705, USA

**Yin-Murphy M, Almond JW (1996).** Baron S *et al.* ed. *Picornaviruses.* in: *Baron's Medical Microbiology* (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.section.2862>.

**Yozwiak Nathan L. , Peter Skewes-Cox, Aubree Gordon,Saira Saborio, Guillermina Kuan, Angel Balmaseda,Don Ganem,Eva Harris, and Joseph L. DeRisi 2010.** Human Enterovirus 109: a Novel Interspecies Recombinant Enterovirus Isolated from a Case of Acute Pediatric Respiratory Illness in Nicaragua *J Virol.* 84(18): 9047–9058.

**Zaher, S.R., Kassem, A.S. and Hughes, J.J. (1993)** Coxsackie virus infections in rheumatic fever. *Indian Journal of Pediatrics,* 60(2), 289–298.

**Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM. (1992).** General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol.* 1992 Jan;30(1):160-5.

