



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός Echo 13
στελέχους που απομονώθηκε από Άσηπτη Μηνιγγίτιδα το
2001

Full genome analysis of an Echo 13 strain isolated from
aseptic meningitis case in 2001



Χναράκη Μαρία
Λάρισα 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Z. ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ (Επιβλέπουσα):

Ειδικό Εργαστηριακό και Διδακτικό Προσωπικό (ΕΕΔΙΠ)

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ:

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:

Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη διδάκτορα κα. Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα για την επίβλεψη, την πολύτιμη βοήθειά της, την ενθάρρυνσή της με τον καλύτερο και γλυκύτερο τρόπο και τη σαφή καθοδήγησή της κατά την διάρκεια των πειραμάτων όπως και την αμέριστη συμπαράσταση σε όποιες δυσκολίες παρουσιάστηκαν κατά την τέλεση τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση του θέματος αυτής της πτυχιακής εργασίας, στο πρόσωπο μου, για την εμπιστοσύνη, την ενθάρρυνση και τη βοήθειά του κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόρη που δέχτηκε να συμμετέχει στην τριμελή επιτροπή, για την κρίση της εργασίας.

Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας-Ιολογίας: Δημητρίου Τηλέμαχο, Νικολούλη Κατερίνα, Ρούτερ Ειρήνη και Τσακογιάννη Δημήτρη τόσο για την βοήθεια και συμπαράστασή τους, όσο και για την φιλική τους διάθεση, καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας και απασχόλησής μου στο εργαστήριο όπως και εκείνους τους φίλους που μου συμπαραστάθηκαν και με βοήθησαν εκτός εργαστηρίου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και όλη την οικογένειά μου που με στήριξαν οικονομικά και ψυχικά κατά τη διάρκεια όλης της φοιτητικής μου ζωής και όχι μόνο.

Μία αξέχαστη εμπειρία που δυστυχώς τελείωσε αλλά θα αργήσει να αποδώσει καρπούς...

Σας ευχαριστώ!

Περίληψη

Οι Echo ιοί του γένους των εντεροϊών B, ανήκουν στην οικογένεια των Picornaviridae ιών και είναι μικρού μεγέθους RNA ιοί. Το γονιδιώμά τους είναι θετικής πολικότητας RNA, μήκους 7500 νουκλεοτιδίων περίπου. Λόγω της ανθεκτικότητας του καψιδίου τους μπορούν να μολύνουν επιτυχώς τον άνθρωπο ξεκινώντας από το πεπτικό σύστημα, ενώ ο πολλαπλασιασμός τους λαμβάνει χώρα στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και του εντέρου. Οι εντεροϊοί μολύνουν συχνά το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), προκαλώντας νευρολογικές ασθένειες, όπως η άσηπτη μηνιγγίτιδα.

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκε σε ολόκληρο το γονιδίωμα ένα στέλεχος Echovirus 13 (Echo 13) το οποίο απομονώθηκε από ασθενή με άσηπτη μηνιγγίτιδα το 2001 κατά τη διάρκεια επιδημίας στην Ελλάδα. Το στέλεχος (85929) αρχικά είχε ταυτοποιηθεί με οροεξουδετέρωση ως Echo 30, ενώ η αλληλούχηση τμήματος της VP1 γενωμικής περιοχής έδειξε ότι πρόκειται για Echo 13 ορότυπο. Για τον έλεγχο αυτής της ασυμφωνίας καθώς και για την ύπαρξη ανασυνδυασμών, το στέλεχος αλληλουχήθηκε και μελετήθηκε σε ολόκληρο το γονιδίωμά του.

Η αλληλούχηση ολόκληρης της VP1 περιοχής επιβεβαίωσε την ταυτοποίηση του στελέχους 85929 ως Echo 13. Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας του στελέχους μας με αυτή του προτύπου έδειξε κάποιες διαφορές στην καψιδιακή περιοχή οι οποίες ίσως θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν την αδυναμία ταυτοποίησης με οροεξουδετέρωση. Επίσης δημιουργήθηκαν φυλογενετικά δέντρα στη VP1 γενωμική περιοχή για την επιδημιολογική μελέτη του στελέχους τα οποία έδειξαν ότι το στέλεχος που εμπλέκεται στην επιδημία της Ελλάδας την περίοδο 2000-2001 κυκλοφόρησε ταυτόχρονα σε Γαλλία Ισπανία Κορέα, Ιαπωνία και Αυστραλία, χαρακτηριζόμενο από μια παγκόσμια εξάπλωση. Τέλος η σύγκριση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους 85929 με άλλα στελέχη Echo 13 καθώς και άλλων οροτύπων εντεροϊών που υπάρχουν κατατεθειμένα στη GenBank δεν έδειξε την ύπαρξη πιθανού γενετικού ανασυνδυασμού.

Η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος στελεχών είναι πολύ σημαντική διότι συμβάλλει στην ευρύτερη συλλογή πληροφοριών από όλες τις περιοχές του γονιδιώματός τους και επομένως στην σαφέστερη αντίληψη της εξέλιξης των εντεροϊών.

Abstract

The echoviruses of the enterovirus B genus, belong to the Picornaviridae family. Enteroviruses are small non enveloped viruses with a 7.500nt single stranded positive RNA genome protected by an icosahedral capsid. Due to their capsid resilience, enteroviruses can successfully infect humans by fecal-oral route and they can multiply mainly in gastrointestinal tract. Enteroviruses often infect the central nervous system (CNS), causing neurological diseases, such as aseptic meningitis.

In the present study the almost complete genome of an Echovirus 13 (Echo 13) strain isolated from a patient with aseptic meningitis in 2001 during an epidemic in Greece was conducted. The strain (85929) had been identified by serum neutralization as Echo 30, while the sequencing of part of VP1 genomic region revealed that the strain belongs to Echo 13 serotype. In order to investigate this discrepancy between seroneutralisation test and molecular identification the capsid coding region of the 85929 was analysed. Nucleotide sequence analysis of the complete genome was conducted in order to reveal the existence of recombination events.

The sequencing of the entire VP1 region confirmed the identification of strain 85929 as Echo 13. The comparison of the amino acid sequence of the capsid coding region of the strain 85929 with that of the prototype one revealed substitutions that could explain the incongruence in identification by seroneutralization test and VP1 sequencing. In addition phylogenetic trees in different parts of VP1 genomic region revealed that the strains 85929 correlates with Echo 13 strains isolated the same period, 2000-2001, France, Spain, Korea, Japan and Australia, characterized by a global circulation. Finally, the nucleotide and SimPlot analysis of the entire genome of the 85929 strain excluded the presence of recombination event in the evolutionary history of the strain.

Full genome sequence analysis of circulating enteroviral strains is a prerequisite in order to obtain information from all genomic regions of enterovirus genome leading to the understanding of the complexity of enterovirus evolution.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

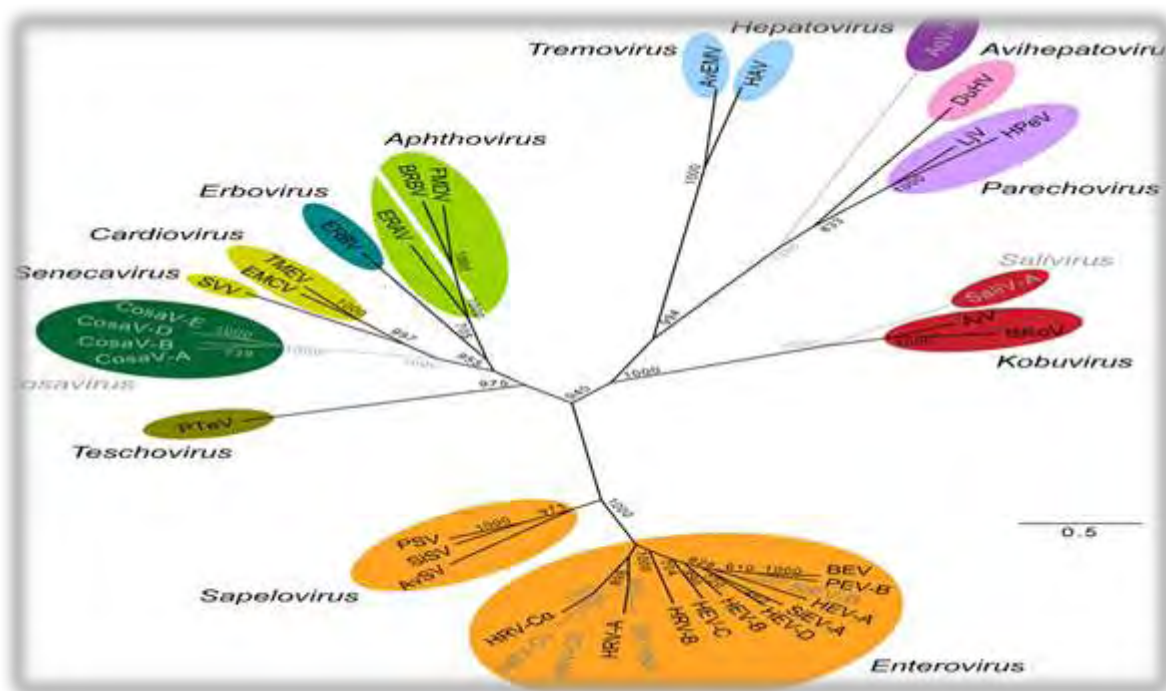
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1 Ταξινόμηση.....	8
2 Δομή καψιδίου και οργάνωση γονιδιώματος εντεροϊών.....	10
2.1 Δομή καψιδίου	10
2.2 Δομή του γονιδιώματος	12
2.3 5΄ Αμετάφραστη περιοχή (5΄ UTR)	13
2.4 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)	14
2.4.1 Ιδιότητες λειτουργικών και μη λειτουργικών πρωτεϊνών	15
2.5 3΄ Αμετάφραστη περιοχή (3΄ UTR)	16
3 Υποδοχείς εντεροϊών	17
4 Κύκλος ζωής των εντεροϊών.....	18
4.1 Πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς	18
4.2 Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απελευθέρωση του γενώματος στο εσωτερικό.....	18
4.3 Μετάφραση του ιικού RNA-πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης.....	19
4.4 Αντιγραφή ιικού γενώματος.....	19
4.5 Συναρμολόγηση και ωρίμανση των νέων ιικών σωματίων.....	20
4.6 Απελευθέρωση ώριμων ιικών σωματίων.....	21
5 Παθογένεια	21
5.1 Έκθεση και Μηχανισμοί Λοίμωξης	21
5.2 Πρωτοβάθμια συμπτώματα της νόσου και επιπτώσεις	22
6 Επιδημιολογία.....	23
6.1 Ηλικία	23
6.2 Φύλο.....	24
7 Εργαστηριακή Διάγνωση	24
7.1 Κλινικά δείγματα.....	25
7.2 Κυτταρικές σειρές	25
7.3 Οροτυπική ταυτοποίηση	25
7.4 Μοριακές τεχνικές	26
8 Εξέλιξη των εντεροϊών	27
8.1 Μεταλλάξεις	27
8.2 Ανασυνδυασμός.....	28
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
1 Περιγραφή στελεχών.....	31

2	Μόρια-Εκκινητές	31
3	Εκχύλιση ιικού RNA	32
4	Αντίστροφη μεταγραφή (RT).....	33
5	Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR)	33
6	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR	35
7	Καθαρισμός προϊόντων της PCR και αλληλούχηση	35
8	Επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		37
1	Μελέτη γονιδιώματος του στελέχους 85929	37
2	Μελέτη αμινοξικών αλλαγών στην καψιδιακή περιοχή.....	38
3	Φυλογενετικά δέντρα της VP1 περιοχής	44
4	Έλεγχος για ανασυνδυασμό.....	47
Εικόνα 22: SimPlot ανάλυση της VP1-3D γενωμικής περιοχής του στελέχους 58929. ΣΥΖΗΤΗΣΗ		47
ΣΥΖΗΤΗΣΗ		48
1	Μελέτη γονιδιώματος στελέχους 85929	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		51

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 Ταξινόμηση

Το γένος των εντεροϊών ανήκει στην οικογένεια των Picornaviridae, και αποτελείται πάνω από 300 ορότυπους (Πίνακας 1), οι περισσότεροι των οποίων είναι γνωστά ανθρώπινα παθογόνα και κυκλοφορούν ευρέως σε όλο τον κόσμο. Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί κατηγοριοποιούνται σε τέσσερα είδη (species) HEV-A, HEV-B, HEV-C και HEV-D. 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 Picorna ιοί ταξινομούνται στα εξής δεκαεπτά γένη: τους Aphthoviruses, τους Aquamaviruses, τους Anihepatoviruses, τους Cardioviruses, τους Cosaviruses, τους Dicipiriviruses, τους Enteroviruses, τους Erboviruses, τους Hepatoviruses, τους Kobuviruses, τους Megrivirus, τους Parechoviruses, τους Saliviruses, τους Sapeloviruses, τους Senecaviruses, τους Tescoviruses και τους Tremoviruses (Knowles *et al.*, 2012). 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 1).



Εικόνα 1: Απεικόνιση φυλογενετικών σχέσεων και αποστάσεων μεταξύ των μελών της οικογένειας των Picornaviridae.

Είδη	Ορότυποι
Enterovirus A, 24 (formerly Human enterovirus A)	coxsackievirus A2 (CV-A2), CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16 enterovirus A71 (EV-A71), EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A92, EV-114, EV-A119, EV-A120, SV19, SV43, SV46 & BA13
Enterovirus B, 61 (formerly Human enterovirus B)	coxsackievirus B1 (CV-B1), CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5 (incl. SVDV), CV-B6, CV-A9, echovirus 1 (E-1; incl. E-8), E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9 (incl. CV-A23), E-11, E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, E-17, E-18, E-19, E-20, E-21, E-24, E-25, E-26, E-27, E-29, E-30, E-31, E-32, E-33 enterovirus B69 (EV-B69), EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81, EV-B82, EV-B83, EV-B84, EV-B85, EV-B86, EV-B87, EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110, EV-B111, SA5
Enterovirus C, 23 (formerly Human enterovirus C)	poliovirus (PV) 1, PV-2, PV-3 coxsackievirus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, 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
Enterovirus D, 5 (formerly Human enterovirus D)	eterovirus D68 (EV-D68), EV-D70, EV-D94, EV-D111, EV-D120
Enterovirus E, 4 (formerly Bovine enterovirus group A)	enterovirus E1 (EV-E1), EV-E2, EV-E3, EV-E4
Enterovirus F, 6 (formerly Bovine enterovirus group B)	enterovirus F1 (EV-F1), EV-F2, EV-F3, EV-F4, EV-F5, EV-E6
Enterovirus G, 11 (formerly Porcine enterovirus B)	enterovirus (EV) G1 (EV-G1), EV-G2, EV-G3, EV-G4, EV-G5, EV-G6, EV-G7, EV-G8, EV-G9, EV-G10, EV-G11
Enterovirus H, 1 (formerly Simian enterovirus A)	enterovirus H1 (EV-H1)
Enterovirus J, 6	simian virus 6 (SV6), enterovirus J103 (EV-J103), EV-J108, EV-J112, EV-J115, EV-J121
Rhinovirus A, 80 (formerly Human rhinovirus A)	human rhinovirus (RV-A) A1, A2, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A18, A19, A20, A21, A22, A23, A24, A25, A28, A29, A30, A31, A32, A33, A34, A36, A38, A39, A40, A41, A43, A44, A45, A46, A47, A49, A50, A51, A53, A54, A55, A56, A57, A58,

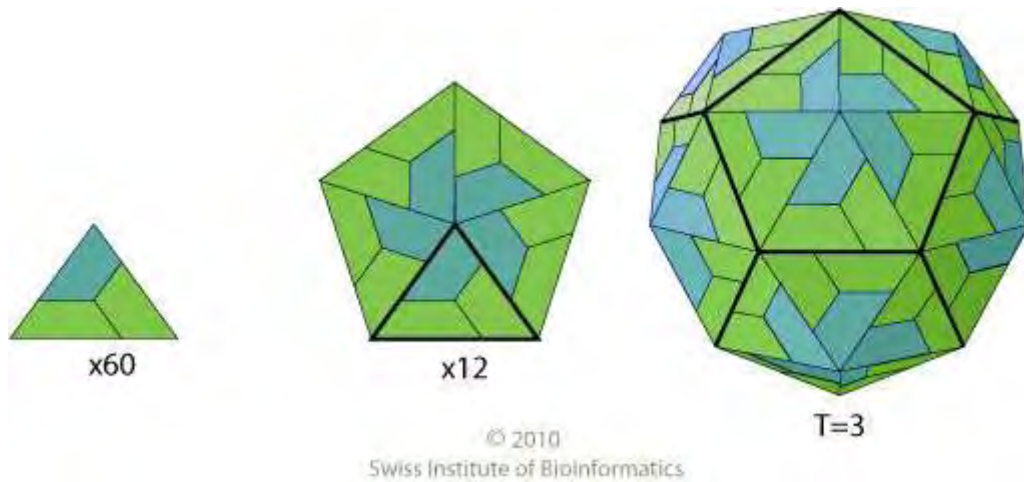
	A59, A60, A61, A62, A63, A64, A65, A66, A78, A80, A81, A82, A85, A88, A89, A90, A67, A68, A71, A73, A74, A75, A76, A77, A94, A96, A98, A100, A101, A102, A103, A104, A105, A106, A107, A108, A109
Rhinovirus B, 32 (formerly Human rhinovirus B)	human rhinovirus (RV-B) B3, B4, B5, B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91, B92, B93, B97, B99, B100, B101, B102, B103, B104, B105, B106
Rhinovirus C, 53 (formerly Human rhinovirus C)	human rhinovirus (RV-C) C1-C53α

Πίνακας 1: Ταξινόμηση όλων των οροτύπων των εντεροϊών.

2 Δομή καψιδίου και οργάνωση γονιδιώματος εντεροϊών

2.1 Δομή καψιδίου

Το γονιδίωμα των εντεροϊών περιβάλλεται από ένα σχετικά μικρό (30nm), σφαιρικό, 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 ικής 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 (*Rossmann et al., 1989*). Τα τρία πολυπεπίδια VP0, VP3 και VP1 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και από την συσσωμάτωση των πρωτομερών τους σχηματίζονται τα πενταμερή (VP0, VP3,VP1)₅. Δώδεκα από αυτά τα πενταμερή συναρμολογούνται για να σχηματίσουν το «προκαψίδιο» [(VP0,VP3,VP1)₅]₁₂ (Εικόνα 2). 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*). Κατά το στάδιο της καψιδίωσης όπου το RNA «πακετάρεται» στα ιικά σωματίδια, πραγματοποιείται η «αντίδραση ωρίμανσης». Η διάσπαση της VP0 στις VP4 και VP2 χαρακτηρίζει το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης καψιδίου και της σταθεροποίησης του ώριμου πλέον ιού (*Stanway G., 1990*). Οι VP1, VP2 και VP3 πρωτεΐνες βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια 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 (*Racaniello, 2007*). Το ώριμο ιικό σωματίδιο χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα και ανεκτικότητα σε ισχυρά απορρυπαντικά όπως το SDS, σε πρωτεολυτικά ένζυμα και σε όξινο pH (~3) (*Pfister et al., 1999*).



Εικόνα 2: Δομή του καψιδίου των Picorna ιών. Κάθε πρωτομερές [vp0 (vp2+vp4), vp3, vp1] που σχηματίζεται από τα προϊόντα πρωτεολυτικής διάσπασης της πολυπρωτεΐνης P1, σχηματίζουν αρχικά τα πενταμερή (5 πρωτομερή) και στη συνέχεια 12 πενταμερή σχηματίζουν το εικοσάεδρο ώριμο καψίδιο των εντεροϊών.

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 και 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 E. & Racaniello V.R., 1994), ενώ παράλληλα προστατεύονται από την άμυνα του ξενιστή, αφού τα αντισώματα είναι ογκώδη και η θέση στο εσωτερικό της αύλακας μικρή (Stanway G., 1990). Αν και οι περιοχές αυτές λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασής τους με τους κυτταρικούς υποδοχείς, διατηρούνται φυλογενετικά μεταξύ διαφορετικών στελεχών, καθίστανται ευπαθείς στα αντισώματα. Αντίθετα, οι 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.

Έχει πραγματοποιηθεί ο εντοπισμός επίτοπων (αντιγονικών θέσεων) σε ορισμένα είδη εντεροϊών, όπως στους CAV9, rotiovirus (ορότυποι 1,2,3), SVDV, CBV4 και CBV5 (Borrego et al., 2002, Halim S. & Ramsingh Al., 2000). Στους rotiovirus, οι τρεις ορότυποι έχουν διαφορετικούς επίτοπους. Οι επίτοποι εντοπίζονται στις τρεις καψιδιακές περιοχές VP1, VP2 και VP3, κυρίως στο N και C τελικό άκρο της VP1. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι αντιγονικές θέσεις (sites) κάποιων εντροϊών, ανάλογα με τη θέση των αμινοξέων που

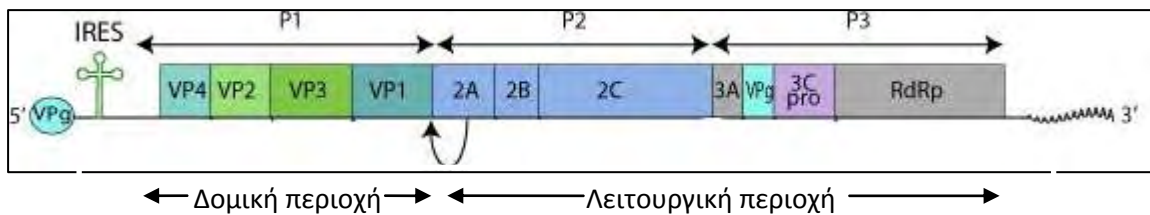
βρίσκονται, στην αντίστοιχη γενωμική περιοχή (Iwai et al., 2010, Buttinelli et al., 2003, Jorba et al., 2008, Minor et al., 1986, Page et al., 1988, Patel et al., 1993, Shin et al., 2003, Pulli et al., 1998).

CAV9		Poliovirus			
Γενωμική περιοχή	Θέση αμινοξέων	Sites	Γενωμική περιοχή	Θέση αμινοξέων	Ορότυπος
VP1	1-14, 21-41, 60-71	Site 1	VP1	89-100	PV2, PV3
VP2	154-168	Site 2a	VP1	220-222	PV1
VP3	1-21, 34-48, 52-81	Site 2b	VP2	164-172	PV1, PV3
		Site 3a	VP1	286-290	PV3
		Site 3b	VP3	58-60, 70, 71, 77, 79	PV1, PV3

Πίνακας 2: Αντιγονικές θέσεις των CAV9 και Poliovirus στις αντίστοιχες γενωμικές περιοχές.

2.2 Δομή του γονιδιώματος

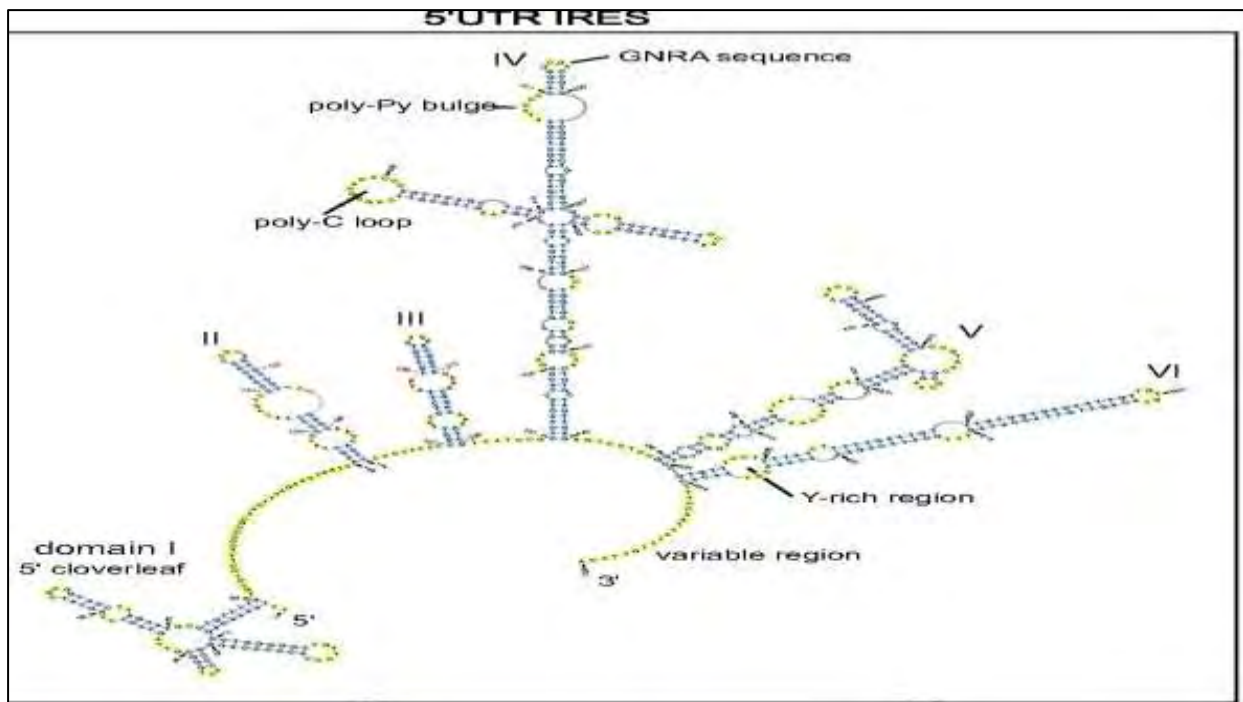
Το καψίδιο των εντεροϊών εσωκλείει ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, μήκους 7500 νουκλεοτιδίων περίπου (Melnick J.L., 1990), το οποίο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο του με μια μικρή ιική πρωτεΐνη 22 αμινοξέων, κωδικοποιούμενη από τον ιό, την VPg, η οποία φαίνεται να συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό του γενώματος, στον εγκλεισμό του στο καψίδιο και στη συγκρότηση των ιικών σωματιδίων (Nomoto et al., 1977). Στο 3' άκρο βρίσκεται η πολυαδενυλιωμένη περιοχή (poly(A)-tract) 60 νουκλεοτιδίων η οποία παίζει ρόλο στη σταθερότητα του RNA και την μολυσματικότητα του ιού. Η δομή του γονιδιώματος των εντεροϊών παρουσιάζεται στην Εικόνα 3. Οι τρεις κύριες περιοχές του γενετικού υλικού των εντεροϊών είναι: η 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 250kDa, η οποία υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία από ικές πρωτεάσες για την παραγωγή δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών και η 3' μη κωδική περιοχή (3' UTR), μήκους 62 νουκλεοτιδίων με μία χαρακτηριστική RNA δευτεροταγούς δομής θηλιά, η οποία πιθανόν παίζει ρόλο στην αντιγραφή του ιικού γενώματος. Σήμερα, η αλληλουχία του γονιδιώματος όλων των εντεροϊών είναι γνωστή και διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο από τις διεθνείς τράπεζες δεδομένων.



Εικόνα 3: Οργάνωση του γονιδιώματος των εντεροϊών. Στο 5' άκρο της 5' UTR είναι προσδεσμένη 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.

2.3 5' Αμετάφραστη περιοχή (5' UTR)

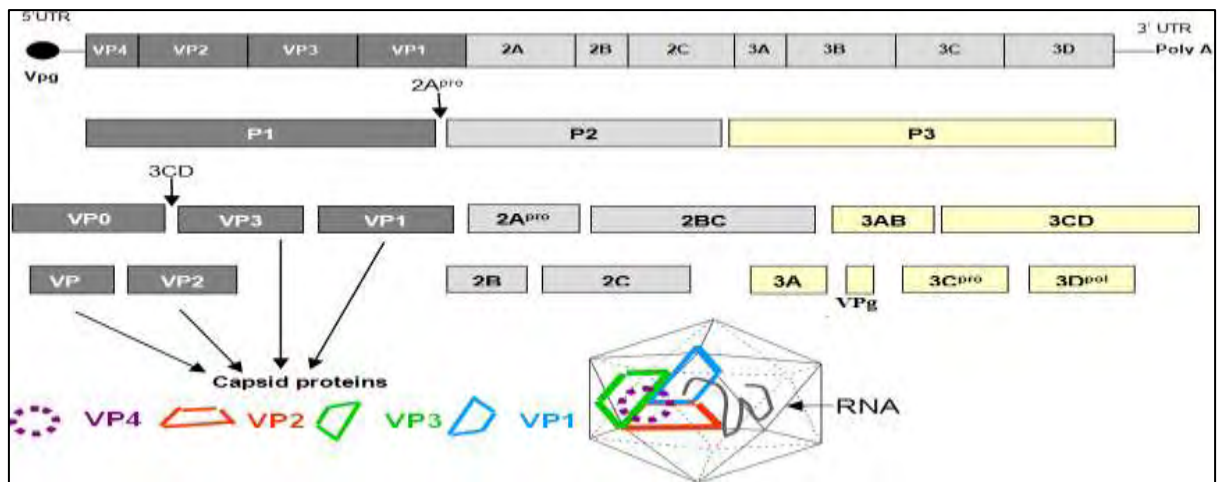
Η 5' UTR είναι μια περιοχή περίπου 750 νουκλεοτιδίων (8-12% του γενώματος) με μεγάλες περιοχές πλήρως ή μερικώς συντηρημένες μεταξύ των διαφόρων οροτύπων των εντεροϊών. Σε κοντινούς φυλογενετικά ιούς η 5' UTR παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία των βάσεων. Περιέχει μεγάλα τμήματα νουκλεοτιδίων που διατηρούνται πλήρως ή μερικώς από είδος σε είδος, υποδηλώνοντας ότι η 5' UTR επηρεάζει την παθογένεια του ιού, τον εγκλεισμό του RNA στο ιικό καψίδιο και τον πολλαπλασιασμό του (Stanway *et al.*, 1984). 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), 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 και περιέχει το κωδικόνιο έναρξης (Wimmer *et al.*, 1993) (Εικόνα 4). Η περιοχή cloverleaf αποτελεί μια δομή σχήματος τριφυλλίου 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 την έναρξη της μετάφρασης και τη μολυσματικότητα του ιού (Kauder & Racaniello, 2004). 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 4: Δευτεροταγής δομή της 5'UTR περιοχής του γενώματος των εντεροϊών. Η δομή I αντιστοιχεί στο cloverleaf ενώ οι δομές II-VI αποτελούν το IRES.

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 ιικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του. Αρχικά δημιουργείται μια πολυπρωτεΐνη περίπου 250 kDa, με 2 περιοχές, τη δομική (P1) και τη λειτουργική (P2, P3). Μετά από πρωτεολυτική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης προκύπτουν οι δομικές VP1, VP2, VP3, VP4 πρωτεΐνες και οι λειτουργικές 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, και 3D πρωτεΐνες του ιού καθώς και οι πρόδρομες ικές πρωτεΐνες όπως οι VP0, 2BC, 3AB και 3CD (Racaniello 2007) (Εικόνα 5). Συγκριτικές μελέτες σε διάφορους *Picornavirus* ιούς μεταξύ μη δομικών και καψιδιακών πρωτεϊνών έδειξαν ότι οι πρώτες διατηρούνται φυλογενετικά περισσότερο, δείχνοντας την έλλειψη εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών που προσβάλλονται από εντεροϊούς.



Εικόνα 5: Χάρτης του γονιδιώματος των εντεροϊών. Παρουσιάζεται η VPg πρωτεΐνη στο 5' άκρο, η 5' UTR, η πολυπρωτεΐνη και πως διασπάται σε δομικές (από την P1) και λειτουργικές (από τις P2-P3) πρωτεΐνες καθώς και η 3' UTR και η πολυ(A) ουρά στο 3' άκρο.

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). Παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιικού RNA, διεγείροντας την έναρξη της σύνθεσης της αρνητικής αλυσίδας. Επίσης, ευθύνεται για την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου-ξενιστή και για τη σταθεροποίηση του ιικού RNA.

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 αναδιάταξη των μεμβρανών και δημιουργία κυστιδίων τα οποία συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα και αποτελούν θέσεις ιικής αντιγραφής (Paul *et al.*, 1998).

Πρωτεΐνη 2B: Δρα σαν πολυμεράση, συμμετέχει στην ιική αντιγραφή (Cuconati *et al.*, 1998) και αυξάνει την διαπερατότητα των μεμβρανών (Barco *et al.*, 1995). Εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύμπλεγμα Golgi αφού συνδέεται με αυτά με την υδρόφοβη περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου της.

Πρωτεΐνη 2C: Είναι μία ελικάση που παρουσιάζει δραστικότητα ATPάσης και GTPάσης και είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του ιικού γενώματος (Pfister *et al.*, 1999, Wimmer *et al.*, 1999). Παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου ενώ η ακινητοποίηση του στο 3' cloverleaf του αρνητικής πολικότητας κλώνου προάγει την

εκκίνηση της σύνθεσης του θετικής πολικότητας κλώνου (*Banerjee et al., 2001*). Είναι προσδεμένη σε μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και συμβάλει στη δημιουργία του συμπλόκου αντιγραφής (*Bienz et al., 1990*).

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 ιική DNA πολυμεράση και ευνοεί την επιμήκυνση της πολυ(A) ουράς του RNA. Διεγείρει την αυτοκατάλυση του πρόδρομου 3CD και διαθέτει δράση μορίου συνοδού (chaperonin). Οι 3AB και 3CD πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν ειδικά με τη δομή cloverleaf στο 5' άκρο, αντίδραση που απαιτείται για την αντιγραφή του RNA (*Fujita et al., 2007*).

Πρωτεΐνη 3A: Είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη και αποτελεί μέρος του συμπλόκου αντιγραφής. Εμποδίζει τη μεταφορά πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi και μειώνει τις εκκρίσεις του κυττάρου (*Belov 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 ιικής πολυπρωτεΐνης (*Towner et al., 2003*).

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

Πρωτεΐνη 3CD: Έχει δραστηριότητα πρωτεάσης και παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία κυστιδίων αντιγραφής (*Marcotte et al., 2007*). Μπορεί να προκαλέσει τερματισμό της ιικής μετάφρασης και έναρξη της ιικής αντιγραφής (*Perera et al., 2007*). Εισέρχεται στον πυρήνα και διασπάται σε 3C και 3D.

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

Πρωτεΐνη 3D: Αποτελεί την RNA πολυμεράση των picorna ιών. 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*).

2.5 3'Αμετάφραστη περιοχή (3'UTR)

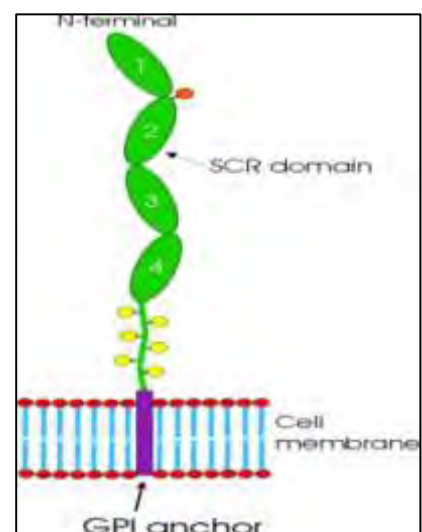
Η 3'UTR βρίσκεται στο 3' άκρο του γενώματος των Picorna ιών και διαφέρει σε μήκος (~ 70 νουκλεοτίδια) μεταξύ των διαφορετικών εκπροσώπων της οικογένειας αυτής. Η νουκλεοτιδική αυτή περιοχή αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι απαραίτητη για την φυσιολογική 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).

3 Υποδοχείς εντεροϊών

Για την επίτευξη της μόλυνσης ενός κυττάρου-ξενιστή από έναν ιό, είναι απαραίτητη η προσκόλλησή του 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-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 ικό 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). Πολλοί εντεροϊοί προσδένονται στον παράγοντα επιτάχυνσης της αλλοίωσης (decay-accelerating factor) DAF ή CD55, που είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών ρύθμισης της ενεργότητας του συμπληρώματος.

Ο DAF είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω γλυκοσυλιωμένης φωσφατίδουλο-ινοσιτόλης που βρίσκεται στην επιφάνεια των περισσότερων ορο-εκτιθέμενων κυττάρων, προστατεύοντάς τα από επίθεση από το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Η λειτουργική, εξωκυτταρική περιοχή του DAF αποτελείται από τέσσερις μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (short consensus repeats, SCR1, -2, -3, και -4), ακολουθούμενες από μια Ο-γλυκοσυλιωμένη περιοχή, πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη, η οποία συνδέεται με φωσφοϊνοσιτόλη (Brodbeck et al., 2000). (Εικόνα 6). Ολόκληρο το μόριο DAF είναι σχετικά άκαμπτο, και έχει τη διαμόρφωση μιας εκτεταμένης ράβδου (Lukacik et al., 2004). Οι υποδοχείς αυτοί δε συμβάλλουν στην αποσταθεροποίηση του ιικού καψιδίου.



Εικόνα 6: Απεικόνιση της δομής της DAF/CD55

4 Κύκλος ζωής των εντεροϊών

4.1 Πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς

Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών αρχίζει με την προσκόλληση του ιού στον υποδοχέα που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή. Αυτή η αλληλεπίδραση εξαρτάται από την εξαιρετικά διατηρημένη αρχιτεκτονική του καψιδίου των εντεροϊών και την ύπαρξη του κυτταρικού υποδοχέα, που θα πρέπει να αποτελείται από μία παρόμοια ανοσοσφαιρίνη (Ig-like). Μία βαθιά επιφανειακή κοιλότητα που είναι γνωστή ως αύλακα (canyon) περιβάλλει μία προεξοχή σχήματος αστεριού στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας. Αυτή η αύλακα αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό του υποδοχέα. Ένα μικρό άνοιγμα στη βάση της αύλακας οδηγεί σε μία υδρόφοβη «rocket» γεμάτη με λιπίδια, που ονομάζεται «rocket factor». Η παρουσία του rocket factor πιθανόν σταθεροποιεί το ώριμο καψίδιο. Οι Ig-like υποδοχείς προσδένονται στην αύλακα, ο rocket factor μετακινείται και επιτρέπει στις πρωτεΐνες να ολισθαίνουν ως άκαμπτα σώματα. Σχηματίζεται έτσι ένα διογκωμένο A-σωματίδιο. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας το N-τελικό άκρο της VP1 μεταφέρεται στην εξωτερική επιφάνεια του ιικού καψιδίου, προσδίδοντας του υδρόφοβες ιδιότητες και συνεπώς αυξημένη συγγένεια με τις μεμβράνες, ενώ η VP4 αποβάλλεται από το καψίδιο. Έτσι το RNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και το καψίδιο αποικοδομείται (*Shingler et al., 2013*).

4.2 Είσοδος του ιού στο κύτταρο και απελευθέρωση του γενώματος στο εσωτερικό

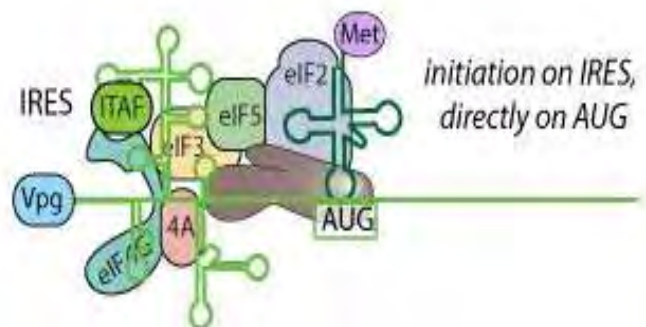
Η είσοδος του ιικού γενώματος στο εσωτερικό του κυττάρου πραγματοποιείται με ενδοκύττωση. Στο κυτταρόπλασμα, η VPg πρωτεΐνη που είναι συνδεδεμένη στην 5'UTR περιοχή του ιικού γενώματος αποκόπτεται από μια φωσφοδιεστεράση του κυττάρου-ξενιστή. Η απελευθέρωση του γενώματος του ιού στο εσωτερικό του κυττάρου είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συνυποδοχέα. Πιο συγκεκριμένα, μια αντλία πρωτονίων (H^+) 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 καψιδικών 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 (*Wimmer et al., 1993*).

4.3 Μετάφραση του ιικού RNA-πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης

Το γονιδίωμα των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, το οποίο δρα και ως mRNA και μπορεί να μεταφραστεί αμέσως από τα ριβοσώματα του κυττάρου-ξενιστή, παράγοντας τις ικές πρωτεΐνες. Ο θετικός αυτός κλώνος του RNA μεταγράφεται στο συμπληρωματικό του αρνητικό κλώνο RNA, ο οποίος χρησιμεύει ως πρότυπο για τη σύνθεση νέων μονόκλωνων θετικής πολικότητας RNA. Συγκεκριμένα, μετά την είσοδο του ιού στο κυτταρόπλασμα το γενετικό υλικό των εντεροϊών δρα ως mRNA και μεταφράζεται από τα ριβοσώματα του κυττάρου-ξενιστή οδηγώντας στη δημιουργία μιας πολυπρωτεΐνης, η οποία υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από τρεις ικές πρωτεάσες ($2A^{pro}$, $3C^{pro}$ και $3CD^{pro}$), ώστε να παραχθούν οι δομικές και λειτουργικές ικές πρωτεΐνες. Αρχικά η $2A^{pro}$ θα επάγει τον αποχωρισμό της P1 πρόδρομης πρωτεΐνης, ώστε να παραχθούν οι δομικές πρωτεΐνες από την P1 και οι λειτουργικές από τις P2 και P3, με τη δράση των $3C^{pro}$ και $3CD^{pro}$. Τέλος δημιουργούνται οι VP2 και VP4 από την αυτοκατάλυση της VP0. Το 5' άκρο των εντεροϊών δε φέρει καλύπτρα (cap) για να αναγνωριστεί από τα ριβοσώματα, αλλά τροποποιείται με την προσθήκη της VPg πρωτεΐνης. Τα ριβοσώματα χρησιμοποιούν μια εσωτερική θέση δέσμευσης στο 5' άκρο (Internal Ribosome Entry Site – IRES), όπου προσδένεται η 40S υπομονάδα του ριβοσώματος, ενώ κοντά στο κωδικόνιο έναρξης προσδένεται και η 60S υπομονάδα για να ξεκινήσει 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), εκτός της eIF4E (Ochs et al., 2002), (Εικόνα 7). 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.

4.4 Αντιγραφή ιικού γενώματος

Το ικό γένωμα αντιγράφεται σε μεμβρανικά κυστίδια ο σχηματισμός των οποίων προάγεται από τις 2BC και 3C ικές πρωτεΐνες, χρησιμοποιώντας σαν μήτρα το RNA θετικής πολικότητας, για την παραγωγή του RNA αρνητικής πολικότητας. Η έναρξη της σύνθεσης του RNA από την $3D^{pol}$ απαιτεί την ουριδυλιωμένη VPg ιική πρωτεΐνη ως εκκινήτη. Έτσι παράγεται ένα δίκλωνο

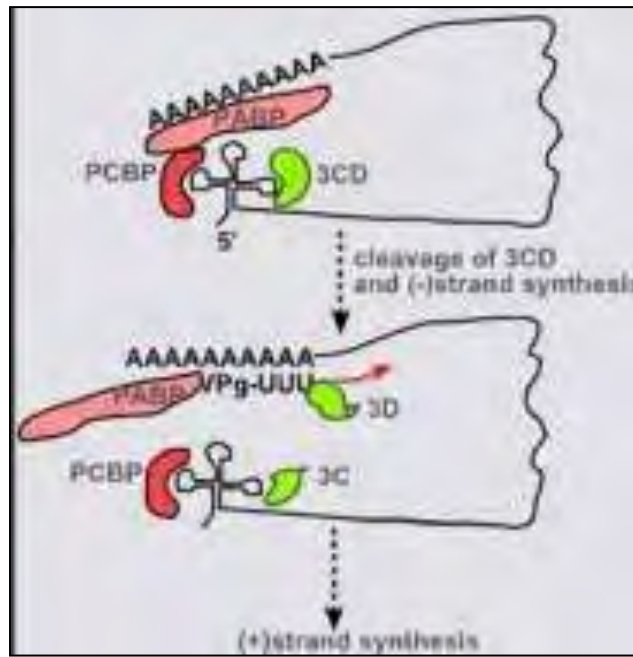


μόριο RNA (replicative form, RF). Από IRES.

έναν αρνητικής πολικότητας κλώνο,

παράγονται πολλοί κλώνοι θετικής πολικότητας (Murray K. E & 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 ικές και κυτταρικές πρωτεΐνες 3Dpol, 3CD^{pro}, PCBP, PABP (Poly(A) Binding Protein) καθώς και οι δομές 5' cloverleaf και 3' UTR του ικού γενώματος (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Αντιγραφή ικού γενώματος.

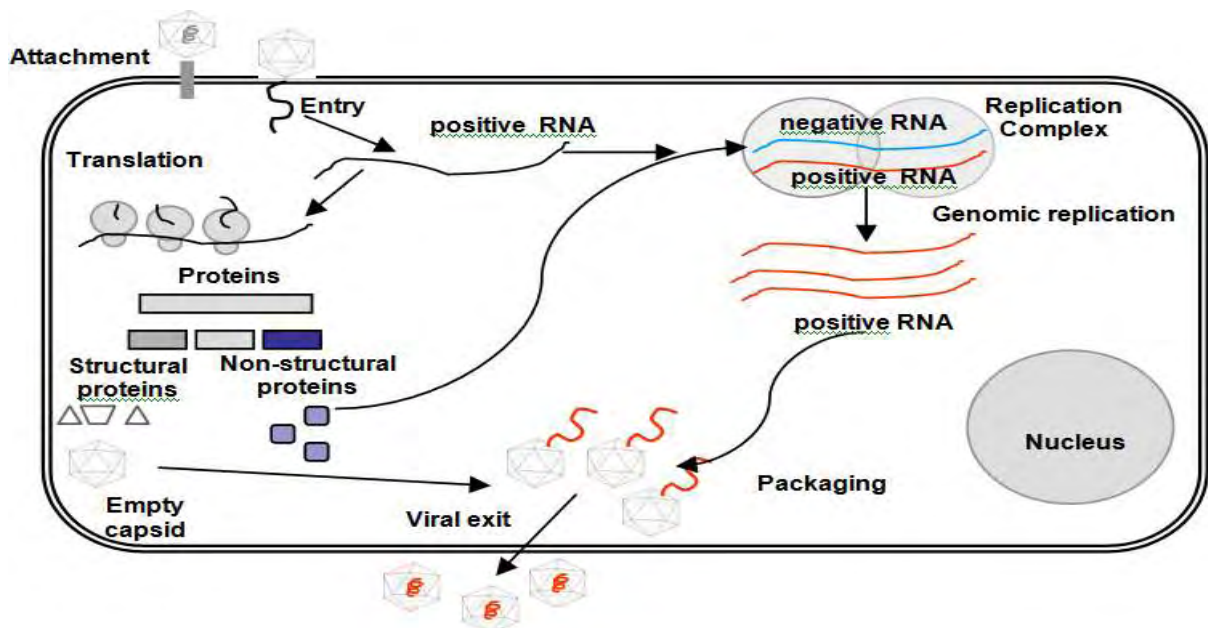
4.5 Συναρμολόγηση και ωρίμανση των νέων ικών σωματίων

Το νεοσυντιθέμενο θετικής πολικότητας RNA εγκλείεται στα νέα ικά καψίδια (*Gromeier et al., 1996*). Στους εντεροϊούς η συναρμολόγηση γίνεται στο κυτταρόπλασμα και είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αντιγραφή του ικού RNA. Το στοιχείο IRES φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην είσοδο του RNA στο καψίδιο και όλη η διαδικασία φαίνεται να εξαρτάται και από άλλους παράγοντες (πχ. VPg). Το πρώτο στάδιο της συναρμολόγησης του ικού καψιδίου περιλαμβάνει την διάσπαση της P1 πρόδρομου πρωτεΐνης από την 3CD^{pro} και τη δημιουργία ενός πρωτομερούς αποτελούμενο από τις VP0, VP1 και VP3 δομικές πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, τα πρωτομερή συναρμολογούνται σε πενταμερή (VP0, VP1, VP3)₅, που είναι απαραίτητα για την καψιδίωση του RNA των εντεροϊών. Δώδεκα πενταμερή [(VP0, VP1, VP3)₅]₁₂ απαιτούνται για την κατασκευή ενός εικοσαεδρικού «προκαψιδίου» (*Pfister et al., 1999*). Τέλος, 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 προ-ιού σε ένα ώριμο μολυσματικό ικό σωματίο (Εικόνα 5).

4.6 Απελευθέρωση ώριμων ιικών σωματίων

Τα νέα ιικά σωματλια απελευθερώνονται τελικά για να μολύνουν νέα κύτταρα (Pfister *et al.*, 1999, De Jesus N.H., 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 από τον ιό και λόγω του μεγάλου αριθμού των ιών που παράγονται ανά κύτταρο, ο ξενιστής τελικά καταστρέφεται, επιτρέποντας την απελευθέρωση των ιών.

Στην εικόνα 9 φαίνονται συνοπτικά οι διαδικασίες που παρατηρούνται στον κύκλο ζωής των εντεροϊών.



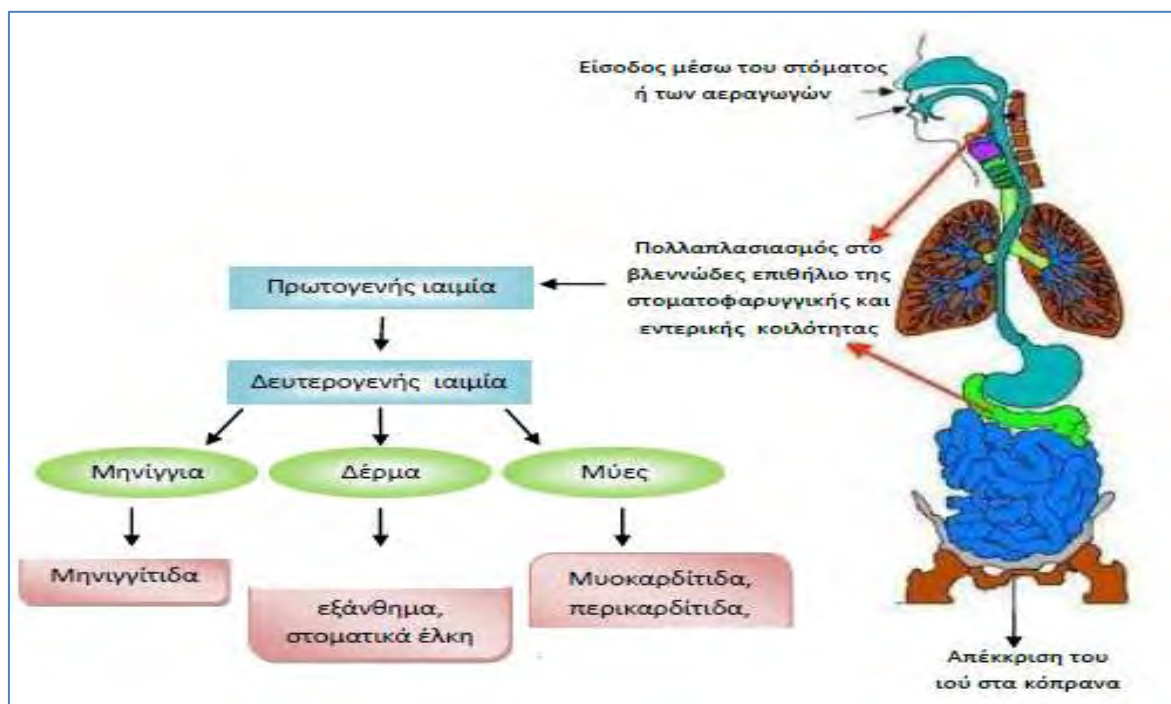
Εικόνα 9: Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών.

5 Παθογένεια

5.1 Έκθεση και Μηχανισμοί Λοίμωξης

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), οι echoviruses παρουσιάζουν παγκόσμια εξάπλωση και αποτελούν κοινή αιτία των λοιμώξεων του αναπνευστικού στα παιδιά κυρίως κατά τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες (Mandell G.L., 2000). Απεκκρίνονται στα κόπρανα των μολυσμένων ατόμων και σπανίως εκκρίνονται από τα μάτια ή το λαιμό (WHO 2003). Μεταξύ των ιών που ανιχνεύονται σε κυτταρικές καλλιέργειες, από λύματα, υδάτινους πόρους και επεξεργασμένο πόσιμο νερό, οι περισσότεροι ιοί ανήκουν στους εντεροϊούς συμπεριλαμβανομένων και των Echo ιών (WHO 2003). Η είσοδος των εντεροϊών γίνεται από το στόμα και η μόλυνση προχωρά μέσω του πεπτικού συστήματος (Εικόνα 10). Συγκεκριμένα, μερική αντιγραφή του ιού λαμβάνει χώρα στο ρινοφάρυγγα μετά

την κατάποση και εξαπλώνεται στους τοπικούς λεμφαδένες αν και οι περισσότεροι φτάνουν στο κατώτερο γαστρεντερικό σύστημα, όπου και δεσμεύονται σε ειδικούς υποδοχείς των κυττάρων του εντέρου. Ο ιός διασχίζει το εντερικό επιθήλιο και φτάνει στις πλάκες του Peyer και στο λεπτό έντερο όπου και πολλαπλασιάζεται. Υπάρχουν πολλές δευτερεύουσες θέσεις μόλυνσης, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα, το ήπαρ, ο σπλήνας, ο μυελός των οστών, η καρδιά και οι πνεύμονες, στα οποία συμβαίνει επιπλέον αντιγραφή προκαλώντας σημαντική αιμία που συμπίπτει με την έναρξη της κλινικής νόσου, συνήθως τέσσερις έως έξι μέρες μετά την έκθεση. Η καθυστερημένη εμφάνιση συμπτωμάτων από τη μόλυνση του κεντρικού νευρικού συστήματος δηλώνει ότι η ιική εξάπλωση μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια μικρής ή μεγάλης αιμίας (WHO 2003). Λοιμώξεις του ίδιου οροτύπου μπορεί να διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό όσον αφορά τα κλινικά συμπτώματα, ενώ διαφορετικοί ορότυποι μπορούν να παρουσιάζουν το ίδιο κλινικό σύνδρομο. 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 D. M. & Howley P. M., 2007).



Εικόνα 10: Παθογένεια των εντεροϊών.

5.2 Πρωτοβάθμια συμπτώματα της νόσου και επιπτώσεις

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). Πιο συγκεκριμένα οι echo ιοί μπορεί να είναι υπεύθυνοι για οξεία άσηπτη μηνιγγίτιδα, πλευροδυνία, εξανθήματα, περικαρδίτιδα, μη ειδική εμπύρετη νόσο και οξεία εγκεφαλομυοκαρδίτιδα στα νεογέννητα (WHO 2003). Η μόλυνση από Echo ιό μπορεί να επάγει μία διαδικασία της αυτοάνοσης βλάβης των βήτα-κυττάρων, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι οι λοιμώξεις από εντεροϊό είναι σημαντικοί παράγοντες στην ανάπτυξη του Διαβήτη τύπου I (Diaz-Horta et al., 2001). Αρκετές περιπτώσεις έχουν δείξει ότι ο Echo 7 μπορεί να προκαλέσει σποραδικές περιπτώσεις ή μικρά κρούσματα σοβαρούς ή θανατηφόρας εγκεφαλίτιδας σε υγιή παιδιά. Θανατική μόλυνση από Echo 7 έχει αναφερθεί σε βρέφη κατά τη διάρκεια κρουσμάτων σε βρεφοκομείο για βρέφη με ειδικές ανάγκες (Kazi et al., 1988). Οι Echo 9 και 30 συνδέονται συχνά με την εμφάνιση άσηπτης μηνιγγίτιδας, την ηπιότερη μορφή ασθένειας του κεντρικού νευρικού συστήματος (Andersson et al., 1975). Από αναφορές που δημοσιεύτηκαν καθώς και από τα διεθνή δεδομένα από τον WHO υποστηρίζεται ότι οι Echo 6 και 19 μοιράζονται τη δυνατότητα του ιού coxsackie B να προκαλούν οξεία καρδίτιδα και πλευροδυνία (Bell E.J. & Grist, N.R. 1970). Επίσης έχει αναφερθεί μία συσχέτιση μεταξύ της μόλυνσης από Echo 33 και οξείας χαλαρής παράλυσης (Grimwood et al., 2003). Τέλος έχει προταθεί ότι η υψηλή επικράτηση του Echo 13 (υπεύθυνο για την άσηπτη μηνιγγίτιδα), αν και θεωρούνταν σπάνιος ορότυπος, φαίνεται να είναι ένας τύπος αναδυόμενης επιδημίας (Inge et al., 2003).

6 Επιδημιολογία

Οι άνθρωποι είναι η μόνη πηγή μόλυνσης με εντεροϊούς, οι οποίοι μεταδίδονται σε συνθήκες φτωχής 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. Η μόλυνση του ανθρώπου από εντεροϊό εξαρτάται από κάποιους παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση (Knipe D. M. & Howley P. M., 2007).

6.1 Ηλικία

Κάθε ηλικιακή ομάδα έχει διαφορετικές ευαισθησίες στη μόλυνση, στη σοβαρότητα της ασθένειας, στις κλινικές εκδηλώσεις και στην πρόγνωση της νόσου μετά από μόλυνση από εντεροϊό. Επειδή η μόλυνση είναι τόσο κοινή, συνήθως οι πρωτογενείς λοιμώξεις συμβαίνουν κατά την παιδική ηλικία (Mandell G.L., 2000) και γι' αυτό τα μικρά παιδιά είναι οι πιο σημαντικοί μεταδότες. Όσο μεγαλύτερη είναι η έκθεση των παιδιών στον ιό κατά τη

διάρκεια της μόλυνσης μπορεί να τους προκαλέσει σημαντικότερα κλινικά συμπτώματα. Συνεπώς, άτομα μικρής ηλικίας είναι πιο επιρρεπή στη μόλυνση από εντεροϊό.

Σε αναπτυσσόμενες περιοχές, όπου το κοινωνικο-οικονομικό υπόβαθρο είναι χαμηλό, οι μολύνσεις από εντεροϊούς είναι εξαιρετικά διαδεδομένες.

6.2 Φύλο

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 στη μεταχείριση των γονέων ως προς τις συνθήκες παιχνιδιού των νεαρών αγοριών. 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).

7 Εργαστηριακή Διάγνωση

Όπως και σε άλλους τομείς της μικροβιολογίας, η ανίχνευση ενός ιού σε ένα κλινικό δείγμα, δεν υποδηλώνει την αιτία της ασθένειας. Το πρόβλημα αυτό επιδεινώνεται με τις όλο και πιο ευαίσθητες μεθόδους ανίχνευσης (εκτός αυτών που βασίζονται στην καλλιέργεια του ιού), όπως την PCR, η οποία μπορεί να γνωστοποιήσει πολύ χαμηλά επίπεδα της λοίμωξης ή ακόμα και λανθάνουσα μόλυνση που δε σχετίζεται με την τρέχουσα ασθένεια του ασθενή. Για να διαπιστωθεί η αιτία της ασθένειας απαιτείται η εξέταση πολλών παραγόντων, όπως η φύση του ιού σε αλληλεπίδραση με τον ξενιστή και το κατά πόσο είναι γνωστό ότι ο ιός προκαλεί τις εκδηλώσεις της νόσου που ασθενής βιώνει. Εάν ο ιός προκαλεί μόνο οξεία λοίμωξη, η ανίχνευση του εν λόγω ιού πιθανόν να σχετίζεται με την τρέχουσα ασθένεια, αν όμως ο ιός σχετίζεται με ανθεκτική ή λανθάνουσα μόλυνση, η ανίχνευσή του απαιτεί άλλα αποδεικτικά στοιχεία, προτού γίνει αποδεκτή ως αιτιώδης.

Η σωστή διάγνωση του ιού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα του δείγματος που θα εξεταστεί στο εργαστήριο. Μεταβλητές όπως η χρονική στιγμή που απομονώθηκε το δείγμα από τον ασθενή, ο τύπος του δείγματος, η ποιότητα και η ποσότητα του υλικού που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη του δείγματος καθώς ο χρόνος και οι συνθήκες μεταφοράς στο εργαστήριο επηρεάζουν επίσης το αποτέλεσμα της διάγνωσης.

7.1 Κλινικά δείγματα

Για τη διάγνωση οξείας ιογενούς λοίμωξης, δείγματα λαμβάνονται συνήθως από την περιοχή της νόσου. Για παράδειγμα, από ασθενή με υποψία ιογενούς μηνιγγίτιδας, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) είναι το καλύτερο δείγμα. Άλλα βιολογικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του ιού είναι φαρυγγικά επιχρίσματα και δείγματα που προέρχονται από το πεπτικό σύστημα όπως πρωκτικά επιχρίσματα και δείγματα κοπράνων, τα οποία αποτελούν αξιόπιστο υλικό για την ανίχνευση του εντεροϊού (King et al., 2000). Σε λοιμώξεις που αφορούν το δέρμα ή τους βλεννογόνους λαμβάνονται δείγματα από αυτές τις επιφάνειες. Για την ταυτοποίηση της ύπαρξης συστημικής μόλυνσης, είναι δυνατή η απομόνωση εντεροϊού από κύτταρα του αίματος (Shulman et al., 1997), ενώ σε περιπτώσεις οξείας αιμορραγικής επιπεφυκίτιδας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκκρίματα του επιπεφυκότος χιτώννα ή δάκρυα (Yin-Murphy et al., 1996). Σε περιπτώσεις θανάτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δείγματα αυτοψίας εγκεφάλου ή νωτιαίου μυελού. Ο τίτλος των ιών είναι υψηλότερος στην αρχική φάση της ασθένειας, οπότε τα δείγματα που λαμβάνονται τις πρώτες ημέρες δίνουν πιο σίγουρα αποτελέσματα.

Για την απομόνωση και ανίχνευση των εντεροϊών από κλινικά δείγματα χρησιμοποιούνται τόσο παραδοσιακές τεχνικές, όπως η απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες, η οροταυτοποίηση και η ανίχνευση αντισωμάτων, όσο και μοριακές τεχνικές (Pallansch M. & Roos R., 2007, Muir et al., 1998, Siafakas et al., 2001).

7.2 Κυτταρικές σειρές

Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των εντεροϊών, βασίζονται στην απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες και την εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης με ειδικούς αντι-ορούς. Ο ίδιος τύπος κυττάρων, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη όλων των γνωστών οροτύπων των εντεροϊών. Συνεπώς, η χρήση πολλαπλών κυτταρικών σειρών αυξάνει την παραγωγή και ενισχύει την πιθανότητα και ταχύτητα της ιικής απομόνωσης (Knipe D. M. & Howley P. M., 2007). Κάτω από ιδανικές συνθήκες η απομόνωση μπορεί να είναι εμφανής μέσω της παρατήρησης κυτταροπαθογόνου δράσεως του ιού (CPE) μέσα σε λίγες μέρες. Τα κύτταρα στρογγυλοποιούνται και συρρικνώνονται πριν αποκολληθούν από την επιφάνεια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Παρ' όλα αυτά οι διάφοροι ορότυποι δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με την ανάπτυξη σε κυτταροκαλλιέργειες καθώς προκαλούν όμοια κυτταροπαθογόνο δράση (Minor et al., 2000).

7.3 Οροτυπική ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση του οροτύπου γίνεται μετά την απομόνωση του εντεροϊού, μέσω εξουδετέρωσης με ειδικό αντιορό για κάθε ορότυπο. Συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται συνδυασμοί εξειδικευμένων πολυκλωνικών αντισωμάτων που επιτρέπουν την ταυτοποίηση 42 οροτύπων εντεροϊών. Το προς ανάλυση δείγμα επωάζεται με κάθε μείγμα αντιορού και

ενοφθαλμίζεται σε κατάλληλα κύτταρα. Μετά από επώαση αρκετών ημερών διαβάζεται το πρότυπο εξουδετέρωσης και αξιολογούνται τα αποτελέσματα (*Melnik et al., 1973*). Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται και άλλες λιγότερο χρονοβόρες μέθοδοι ταυτοποίησης όπως ανοσοενζυμικές μέθοδοι με αντιορό ειδικό για κάθε ορότυπο, ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία με πολυδύναμο και ειδικό για κάθε ορότυπο αντιορό και ανίχνευση αντιγόνων των εντεροϊών στην κυτταροκαλλιέργεια είτε με έμμεσο ανοσοφθορισμό είτε με ανοσοενζυμική μέθοδο.

Έναντι των παραδοσιακών μεθόδων επικράτησαν οι μοριακές λόγω της ταχύτητας που εξασφαλίζουν κατά τη διαδικασία ανίχνευσης και ταυτοποίησης των εντεροϊών (*Pallansch M. & Roos R., 2007*).

7.4 Μοριακές τεχνικές

Η πρώτη μοριακή μέθοδος ανίχνευσης εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *in situ* υβριδοποίηση με την χρήση cDNA ανιχνευτών. 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 συντηρημένες 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 (*Rotbart H.A., 1991, Halonen et al., 1995, Read S.J. & Kurtz J.B., 1999, Romero J.R., 1999, Siafakas et al., 2003, Thoelen et al., 2003, Zoll et al., 1992*). Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και ταχύτητα στην έκδοση των αποτελεσμάτων και γι' αυτό το λόγο αποτελεί σημαντική εφαρμογή στην κλινική διάγνωση.

Η RT-PCR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μοριακή τυποποίηση των εντεροϊών, αφού έχει προηγηθεί ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ιικού γενώματος. Συγκεκριμένα, ενισχύεται τμήμα ή ολόκληρο το γονίδιο 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, έχουν χρησιμοποιηθεί 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 που μας ενδιαφέρει. 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*).

8 Εξέλιξη των εντεροϊών

8.1 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 ικκής RNA πολυμεράσης ($3D^{pol}$) και της απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης των λαθών αυτών (μηχανισμός proof-reading). Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων ($6,3 \cdot 10^{-4}$ 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 (*Wimmer et al., 1993*). Η απουσία ενός μηχανισμού ελέγχου της RNA πολυμεράσης για την πιστότητα της αντιγραφής του ιικού RNA, έχει ως συνέπεια την εξέλιξη των εντεροϊών, με αποτέλεσμα οι ρυθμοί μεταλλάξεων να είναι πολύ μεγαλύτεροι από αυτούς που παρατηρούνται κατά την αντιγραφή του DNA από τις αντίστοιχες DNA πολυμεράσες. Η μεγάλη συχνότητα λαθών της RNA πολυμεράσης οδηγεί στη δημιουργία ετερογενών πληθυσμών. Ο όρος quasi-species (σχεδόν είδος) περιγράφει 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 δύο κύριοι μηχανισμοί για την επικράτηση των μεταλλάξεων, η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή (*Garvilin et al., 2000*). Συνήθως οι μεταλλάξεις που φέρουν κάποιο εξελικτικό πλεονέκτημα επικρατούν στα πλαίσια της φυσικής επιλογής. Οι κανόνες που ελέγχουν την εγκαθίδρυση των μεταλλάξεων σε έναν ιικό πληθυσμό είναι λιγότερο κατανοητοί. Γενικά, μία μετάλλαξη μπορεί να μειώνει ή να αυξάνει την αρμοστικότητα του ιού για μία συγκεκριμένη θέση ή να την αφήνει ανεπηρέαστη.

Οι σημειακές μεταλλάξεις των εντεροϊών που παρατηρούνται διακρίνονται σε δύο τύπους ανάλογα με τη φύση της αλλαγής που συμβαίνει από την αντικατάσταση μιας βάσης από μια άλλη. Ο πρώτος τύπος, είναι η μετάπτωση (transition) κατά την οποία μια πυριμιδίνη αντικαθίσταται από μια άλλη πυριμιδίνη ή μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια άλλη πουρίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός ζεύγους G-C με ένα ζεύγος A-T και αντίστροφα. Ο δεύτερος τύπος είναι η μεταστροφή (transversion) κατά την οποία μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια πυριμιδίνη και αντίστροφα, έτσι ώστε ένα ζεύγος A-T να μετατρέπεται σε T-A ή C-G. Οι μεταπτώσεις αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ οι μεταστροφές το υπόλοιπο 20%. Η πιο συχνά παρατηρούμενη μετάλλαξη είναι A→G ενώ μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι σπάνιες (*Figlerowicz et al., 2003*).

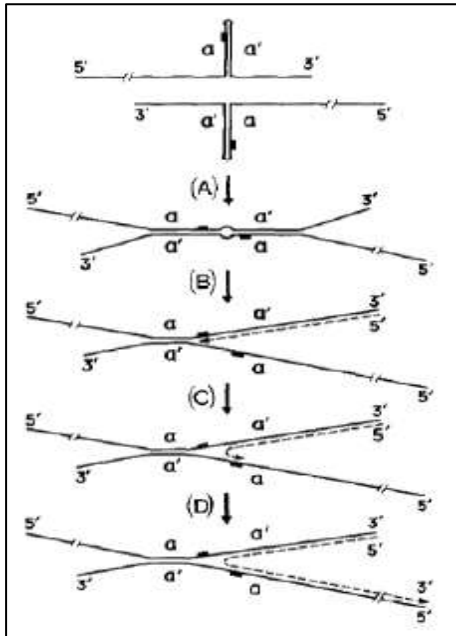
Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των εντεροϊών είναι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών τους. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 με την μεγαλύτερη ποικιλομορφία να εμφανίζεται στις 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. Ιδιαίτερα μεταβλητή είναι επίσης η 5'UTR περιοχή με εξαίρεση τα *cis* δραστικά γενετικά στοιχεία που εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή, το cloverleaf και η CRE, και στην ιική μετάφραση, το IRES. Γι' αυτό το λόγο, οι καψιδιακές πρωτεΐνες θεωρούνται οι σημαντικότεροι παράγοντες της εξέλιξης των εντεροϊών, σε σύγκριση με την 5'UTR, η οποία παρουσιάζει τους χαμηλότερους ρυθμούς εξέλιξης.

8.2 Ανασυνδυασμός

Με τον όρο γενετικό ανασυνδυασμό, περιγράφεται η ανταλλαγή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών μορίων RNA και παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε κύτταρα μολυσμένα με πολιοϊό (Hirst *G.*, 1962), αλλά γεγονότα ανασυνδυασμού έχουν βρεθεί και σε κυκλοφορούντα στελέχη εντεροϊών (Lukashev *A.*, 2005), κυρίως στις μη καψιδιακές περιοχές του γονιδιώματος τους. Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από τον βαθμό ομολογίας των πατρικών κλώνων RNA (Knipe *D. M.* & Howley *P. M.*, 2007). Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στον γενετικό ανασυνδυασμό, ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (Kirkegaard *K.* & Baltimore *D.*, 1986) και ο μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (Gmyl *et al.*, 1999).

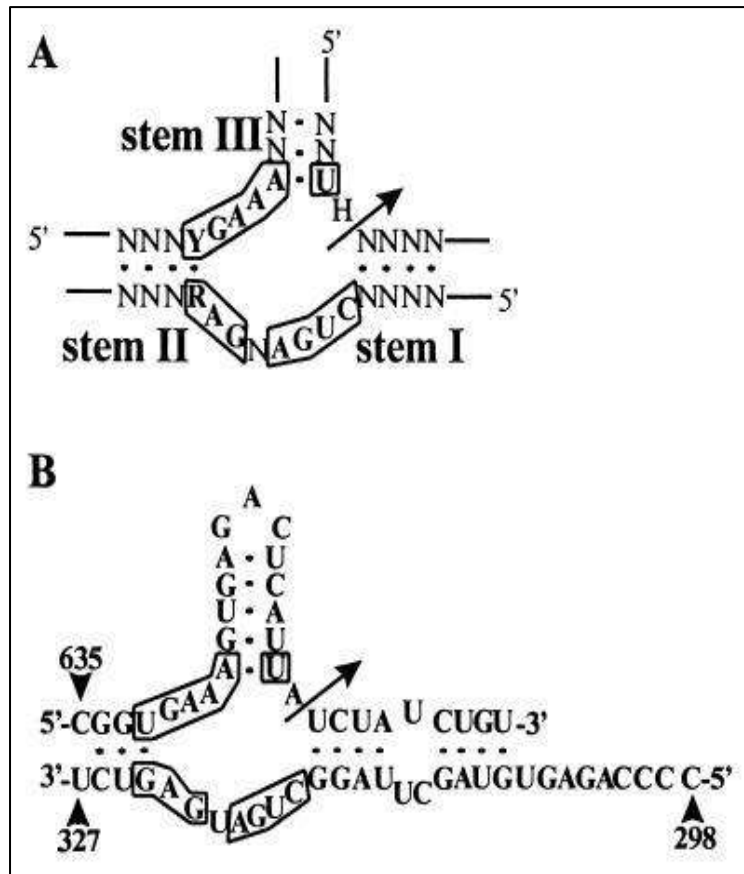
Μηχανισμός αλλαγής μήτρας (ή αντιγραφικός μηχανισμός): Κατά την ιική αντιγραφή, η ιική πολυμεράση 3D χρησιμοποιεί σαν καλούπι για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας, τον κλώνο θετικής πολικότητας του ιού επάγοντας τη δημιουργία ενός δίκλωνου μορίου RNA, γνωστού ως αντιγραφικό ενδιάμεσο. Ωστόσο 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 (Kirkegaard *K.* & Baltimore *D.*, 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 στο 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 το νέο 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 είναι μη ομόλογος και έχει αντίκτυπο στη βιωσιμότητα των νέων στελεχών (Kirkegaard *K.* & Baltimore *D.*, 1986). Ο μηχανισμός αλλαγής

μήτρας θεωρείται ο επικρατέστερος μηχανισμός RNA ανασυνδυασμού (Εικόνα 11), (Romanova et al., 1986).



Εικόνα 11: 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. Δηλαδή, 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 2 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. Στο 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 12) (Gmyl et al., 1999).



Εικόνα 12: 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*).

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους 85929. Το στέλεχος απομονώθηκε από κόπρανα ασθενή με άσηπτη μηνιγγίτιδα κατά τη διάρκεια επιδημίας το 2001 στην Ελλάδα. Αρχικά το στέλεχος είχε χαρακτηριστεί με οροταυτοποίηση ως Echo 30, ενώ αλληλούχηση τμήματος της VP1 καψιδιακής περιοχής χαρακτήρισε το στέλεχος ως Echo 13. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας της καψιδιακής περιοχής καθώς και ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος για έλεγχο για ανασυνδυασμό.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1 Περιγραφή στελεχών

Το στέλεχος 85929 απομονώθηκε το 2001 από κόπρανα ασθενούς με άσηπτη μηνιγγίτιδα κατά τη διάρκεια επιδημίας στην Ελλάδα. Το στέλεχος είχε απομονωθεί σε κυτταροκαλλιέργεια κυττάρων Rd και είχε χαρακτηριστεί ως Echo 30 με οροεξουδετέρωση. Σε προηγούμενη μελέτη αλληλουχήθηκε τμήμα της VP1 γενωμικής περιοχής και η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατέταξε το στέλεχος στον ορότυπο Echo 13. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους με σκοπό τον χαρακτηρισμό του και τη μελέτη μεταλλάξεων στην καψιδιακή περιοχή, οι οποίες θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν την ασυμφωνία μεταξύ της ταυτοποίησης γονοτύπου οροτύπου. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε μελέτη σε ολόκληρο το γονιδίωμα για την ανεύρεση γεγονότων ανασυνδυασμού αφού το δείγμα απομονώθηκε κατά τη διάρκεια επιδημίας άσηπτης μηνιγγίτιδας το 2001 όπου κυκλοφόρησαν ταυτόχρονα στελέχη Echo 13, Echo 30 και Echo 6. Το πρότυπο στέλεχος Echo 13 Del Carmen διατηρείται στο εργαστήριο Μικροβιολογίας Ιολογίας σε κυτταροκαλλιέργεια και χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Η αλληλουχία του γονιδιώματος του πρότυπου στελέχους είναι γνωστή και καταχωρημένη στη GenBank με αριθμό καταχώρησης AY302539.1.

2 Μόρια-Εκκινητές

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται πληροφορίες για τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους 85929. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων με την PCR προήλθαν κυρίως από την υπάρχουσα βιβλιογραφία αλλά σχεδιάστηκαν και κάποια ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος του Echo 13 ιού, με τη βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής, όπως το Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer/>).

ΟΝΟΜΑ	ΘΕΣΗ	ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 5' -3'	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
Das 1 F	1	Sense	TTAAAAGAGCCTGTGGGTTG	Παρούσα εργασία
ENVflapR	459-474	Antisense	GGATTRGCCGCATTC	<i>Afonina et al., 2007</i>
UG52	168-188	Sense	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	<i>Georgopoulou et al. (2000)</i>
UC53	588-606	Antisense	TTGTCACCATAACCAGCCA	<i>Georgopoulou et al. (2000)</i>
Das 462 F	462	Sense	ATGCGGCTAATCCTAACTGC	Παρούσα εργασία

Das 2680 R	2680	Antisense	GTCCCCGTGTGTGTCGTAT	Παρούσα εργασία
292	2554-2570	Sense	MIGCIGYIGARACNGG	<i>Oberste et al. (2003)</i>
222	2895-2912	Antisense	CICCIGGIGGIAYRWACAT	<i>Oberste et al. (2003)</i>
Das 2836 F	2836	Sense	TGCACCTGTCCTCACTCATC	Παρούσα εργασία
Das 3172 R	3172	Antisense	CCACGCTTTGACGTGTTTT	Παρούσα εργασία
EUG3a	2946-2965	Sense	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	<i>Caro et al. (2001)</i>
EUG3b	2946-2965	Sense	TGGCAAACATCTTCAATCC	<i>Caro et al. (2001)</i>
EUG3c	2946-2965	Sense	TGGCAGACTTCAACHAACCC	<i>Caro et al. (2001)</i>
EUC2	4413-4433	Antisense	TTTGCACTTGAAGTGTATGTA	<i>Caro et al. (2001)</i>
EUC2a	4428-4448	Antisense	GGTTCAATACGGCATTG	<i>Caro et al. (2001)</i>
EUC2b	4428-4448	Antisense	GGTTCAATACGGTGTGCT	<i>Caro et al. (2001)</i>
CHR1	4284 – 4308	Sense	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT	<i>Kottaridi et al., 2007</i>
CHR2	5084 – 5061	Antisense	GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKA	<i>Kottaridi et al., 2007</i>
Das 4842 F	4842	Sense	TGGCAGTAAAGACCTGTGATG	Παρούσα εργασία
Das 6103 R	6103	Antisense	CTTGAGAAAATGGCTTCCT	Παρούσα εργασία
Das 6355 F	6355	Sense	TGGACAAGTATGGATTGAACCT	Παρούσα εργασία
HEV-B 424	7389–7367	Antisense	CCGCACCGAAYGCGGAKAATTTAC	<i>Oberste et al., 2006</i>

Πίνακας 3: Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους 85929.

3 Εκχύλιση ιικού RNA

Με την εκχύλιση επιτυγχάνεται η απομόνωση του ιικού RNA από τα κύτταρα στα οποία εντοπίζεται ο ιός.

Η εκχύλιση του RNA από την κυτταροκαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (*Casas et al., 1995*). Αναμείχθηκαν 100μl κυτταροκαλλιέργειας, 10μl γλυκογόνου (100mg/ml) και 300μl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN), σε eppendorf των 2ml. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση (vortex) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25⁰C) για 20min, για να επιτευχθεί λύση των κυτταρικών μεμβρανών,

αποδιάταξη των πρωτεϊνών και απελευθέρωση του ιικού RNA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C), αναδεύτηκε και το erpendorf τοποθετήθηκε στους -20°C για 20min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.000rcf για 10min στους 4 °C και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500μl παγωμένης αιθανόλης 70%, αναδεύτηκε και ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 14.000rcf για 10min στους 4 °C, όπου το υπερκείμενο απορρίφθηκε και πάλι. Τέλος το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απεσταγμένου νερού (ddH₂O) ελεύθερου νουκλεασών και το δείγμα RNA αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

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

4 Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής επιτυγχάνεται η μετατροπή του RNA θετικής πολικότητας σε cDNA, με τη χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο προκειμένου να ενισχυθεί το γονιδίωμα του δείγματος με τη διαδικασία της PCR.

Σε erpendorf των 500μl αναμείχθηκαν 5μl RNA δείγματος και 7μl μείγματος M1 με σύσταση 5μl ddH₂O, 1μl τυχαίων εκκινητών HEPTAN (100pmol/μl) και 1μl dNTPs (40mM), φυγοκεντρήθηκαν και επώαστηκαν στους 65°C για 5min. Αμέσως μετά το δείγμα μεταφέρθηκε στον πάγο. Στη συνέχεια προστέθηκε το δεύτερο μείγμα M2 με σύσταση 1μl ddH₂O, 4μl first strand buffer (5x), 2μl DTT (0,1M), 0,5μl RNase out (20u/μl) και 0,5μl ενζύμου RT M-MLV (100u/μl) (Invitrogen, UK). Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε και επώαστηκε αρχικά στους 25°C για 10min, έπειτα στους 37°C για 50min και τέλος στου 70°C για 15min.

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε επίσης με συγκεκριμένους αντικωδικούς εκκινητές, τους EUC2a και EUC2b, σε συγκέντρωση 10pmol και σε θερμοκρασία επώασης 42°C αντί για τους 37°C, για να εφαρμοστεί στη συνέχεια η PCR με τους εκκινητές EUC2 – EUC3a,b,c (Caro et al., 2001).

5 Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος και επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του μέχρι και δισεκατομμύρια φορές μετά από 30-40 κύκλους, με τη χρήση εκκινητικών μορίων (primers).

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε erpendorf των 200μl. Σε όλες τις αντιδράσεις το μείγμα αποτελούνταν από 34,5μl ddH₂O, 5μl Paq buffer (10x), 5μl μείγματος dNTPs (10mM),

2μl εκκινητών (1μl από τον καθένα, συγκέντρωσης 50pmol), 0,5μl Paq DNA πολυμεράση (5u/μl) (Paq 5000 DNA Stratagene, USA) και 3μl cDNA από κάθε δείγμα (ο τελικός όγκος ήταν πάντα 50μl). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και επώαστηκαν σε θερμοκυκλοποιητές. Συγκεκριμένα, σε κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του μορίου-στόχου στους 95°C για 2min. Ακολούθησαν τα εξής τρία στάδια: αποδιάταξη, υβριδοποίηση και επιμήκυνση, για 40 κύκλους, με συνθήκες διαφορετικές για κάθε ζεύγος εκκινητών. Το τελευταίο στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις ήταν μια επώαση στους 72°C για 5min. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για κάθε ζεύγος εκκινητικών μορίων.

ΖΕΥΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR
Das 1 F/ENVflapR	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 51°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 20sec 40 κύκλοι
UG52/UC53	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 15sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 45°C για 15sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 15sec 40 κύκλοι
Das 462 F/Das 2680 R	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 94°C για 40sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 68°C για 2min, 20sec 40 κύκλοι
292/222	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 42°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 49°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1min 40 κύκλοι
Das 2836 F/Das 3172 R	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 15sec 40 κύκλοι
EUC2/EUG3a,EUG3b,EUG3c	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 45°C για 1min Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1min 40 κύκλοι
CHR1/CHR2	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30sec 40 κύκλοι
Das 4842 F/Das 6103 R	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 53°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1min 40 κύκλοι
Das 6355 F/HEV-B424	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 53°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1min 45 κύκλοι

Πίνακας 4 : Συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για κάθε ζεύγος εκκινητικών μορίων.

6 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR

Η οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Το πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% αποτελούνταν από 1,2gr αγαρόζης διαλυμένα σε 60ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (Tris Boric EDTA) και 100μl βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml), το οποίο ενσωματώνεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA και φθορίζει σε μήκος κύματος 290nm. Ηλεκτροφορήθηκαν 10μl προϊόντος της PCR αναμεμιγμένα με 2μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης) στο πήκτωμα, καθώς και 5μl μάρτυρα μοριακού βάρους 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ένταση 120Volts. Τέλος το πήκτωμα μεταφέρθηκε στη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne) και φωτογραφήθηκε με Olympus digital camera.

7 Καθαρισμός προϊόντων της PCR και αλληλούχηση

Όλη η ποσότητα από το προϊόν της αντίδρασης PCR που περίσσεψαν (40μl) ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, αφαιρέθηκε από το πήκτωμα και τοποθετήθηκε σε eppendorf των 1,5ml. Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του NucleoSpin Gel και PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση στην εταιρία CEMIA (CEMIA, Greece). Για κάθε αντίδραση αλληλούχησης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι εκκινητές από κάθε αντίδραση PCR.

8 Επεξεργασία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε διόρθωση των αλληλουχιών και μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με αλληλουχίες άλλων στελεχών εντεροϊών, με τη βοήθεια του BLAST. Ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση ξεχωριστά για κάθε γονίδιο. Για την επεξεργασία και τη μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα βιοπληροφορικής που διατίθενται στο διαδίκτυο, των οποίων η λειτουργία περιγράφεται στη συνέχεια:

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): Το εργαλείο αυτό αποτελεί μια δημοφιλή μέθοδο εύρεσης ομοιοτήτων νουκλεοτιδικών, αμινοξικών κ.α. αλληλουχιών. Ο αλγόριθμος BLAST πραγματοποιεί αναζήτηση στη διεθνή βάση δεδομένων ακολουθιών (GenBank) για αλληλουχίες ή τμήματα αλληλουχιών που παρουσιάζουν ομολογία με την αλληλουχία που μελετάμε. Χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των ιικών στελεχών που απομονώθηκαν

καθώς και για την εύρεση «συγγενικών» ικών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην επιδημιολογική και φυλογενετική μελέτη. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

CLUSTALW: Το πρόγραμμα αυτό πραγματοποιεί στοίχιση των υπό μελέτη νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών. Τα αποτελέσματα των ομοπαράθεσεων χρησιμοποιούνται για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων και τον υπολογισμό του ποσοστού ομοιότητας δύο ή περισσότερων νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

Gene Runner V.3.05: Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη διόρθωση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, τη μετάφραση της πολυπρωτεΐνης του ιικού στελέχους στα τρία πιθανά πλαίσια ανάγνωσης (επιλέχθηκε αυτό που δεν περιείχε πρόωρο κωδικόνιο λήξης) και για την συρραφή των τμημάτων αλληλουχιών του 85929.

Mega V.5.2: Το εργαλείο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων των γενωμικών περιοχών του στελέχους που απομονώθηκε. Η κατασκευή του δέντρου έγινε με βάση τον αλγόριθμο της Ένωσης Γειτόνων (Neighbor Joining – NJ), ο οποίος βασίζεται στην απόσταση. Χρησιμοποιεί, δηλαδή, το βαθμό της ανομοιότητας (απόστασης) ανάμεσα σε δύο στοιχισμένες ακολουθίες για να παράγει δέντρα. Το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε, αξιολογήθηκε με τη μέθοδο bootstrap, η οποία αποτελεί το μέτρο της επαναληψιμότητας του δέντρου. Συγκεκριμένα, δείχνει το πόσες φορές ένας συγκεκριμένος κλάδος εμφανίζεται στο δέντρο ύστερα από τη δημιουργία πολλών συνόλων δεδομένων από το αρχικό σύνολο.

RyMOL V.1.6.0: Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της τρισδιάστατης δομής των καψιδιακών πρωτεϊνών του στελέχους 85929 και προβλήθηκαν στη τρισδιάστατη δομή του Echo 11 (Protein Data Bank code 1h8t).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1 Μελέτη γονιδιώματος του στελέχους 85929

Αλληλουχήθηκαν συνολικά 7251 βάσεις (1-7251nt) του γονιδιώματος του στελέχους 85929. Για την ενίσχυση και απομόνωση του εντεροϊού χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές (PCR). Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του δείγματος με το κάθε ζεύγος εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν για την απαλοιφή των αλληλοεπικαλυπτόμενων περιοχών με τη χρήση του προγράμματος MEGA, καταλήγοντας έτσι στην ολοκληρωμένη μορφή της αλληλουχίας του γονιδιώματος. Η μοριακή ταυτοποίηση του στελέχους 85929 πραγματοποιήθηκε με αλληλούχηση της VP1 γενωμικής περιοχής και ως εκ τούτου ταυτοποιήθηκε ως Echo 13, με νουκλεοτιδική ομολογία με το πρότυπο στέλεχος Del Carmen 78,4% (>75%) και με αμινοξική ομολογία 90,94% (>85%) της συγκεκριμένης περιοχής.

Το στέλεχος 85929 συγκρίθηκε σε όλο το μήκος του με το πρότυπο στέλεχος Echo 13 Del Carmen και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5 ως % νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία. Τα στελέχη παρουσιάζουν μεγαλύτερη νουκλεοτιδική ομολογία στην 5' UTR (87.47%) και ακολουθούν οι περιοχές P2 (79.53%), P3 (79,34%) και P1 (79.08%). Το γονίδιο με τη μέγιστη ομολογία είναι το 3A (81.65%), ενώ αυτό με τη μικρότερη το 2B (77.78%).

ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	Del Carmen (Echo 13)	
	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία
5' UTR	87.47	-
P1	79.08	95.08
VP4	80.00	100.00
VP2	78.97	96.92
VP3	79.75	96.62
VP1	78.40	90.94
P2	79.53	96.02
2A	79.56	92.67
2B	77.78	97.98
2C	80.04	96.96
P3	79.34	96.93
3A	81.65	95.51
3B	80.30	100.00
3C	79.78	93.99
3D	78.65	96.61

Πίνακας 5 : Νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία του στελέχους 85929 με το πρότυπο στέλεχος Echo 13 Del Carmen για κάθε γενωμική περιοχή. *1330nt της 3D γενωμικής περιοχής από τα 1386nt του προτύπου.

Λόγω της οροτυπικής ταυτοποίησης του δείγματος 85929 ως έναν Echo 30 ιό σε προηγούμενη μελέτη, πραγματοποιήθηκε νουκλεοτιδική και αμινοξική σύγκριση του στελέχους 85929 και με το πρότυπο Echo 30 Bastianni (Πίνακας 6). Η μεγαλύτερη νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία του στελέχους 85929 με το Echo 30 εντοπίζεται στη VP4 περιοχή, γεγονός που δικαιολογείται λόγω της ύπαρξης της στο εσωτερικό του καψιδίου. Ωστόσο η μικρότερη νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία παρουσιάζεται στη VP1 περιοχή, η οποία βρίσκεται εξωτερικά του καψιδίου και ευθύνεται κυρίως για την αντιγονικότητα του ιού. Ακολουθούν οι VP2 και VP3 περιοχές αφού κι αυτές έχουν περιοχές πρόσδεσης για το αντίσωμα.

ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	Del Carmen (Echo 13)		Bastianni (Echo 30)	
	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία
P1	79.08	95.08	70.37	73.42
VP4	80.00	100.00	75.71	90.00
VP2	78.97	96.92	71.03	76.54
VP3	79.75	96.62	73.84	78.48
VP1	78.40	90.94	65.16	62.02

Πίνακας 6: Νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία μεταξύ του στελέχους 85929, του προτύπου στελέχους Echo 13 Del Carmen και του προτύπου στελέχους Echo30 Bastianni για τις τέσσερις καψιδιακές περιοχές.

2 Μελέτη αμινοξικών αλλαγών στην καψιδιακή περιοχή

Πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών των καψιδιακών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 (εκτός της VP4 που βρίσκεται εσωτερικά του καψιδίου), τόσο με το πρότυπο στέλεχος Echo 13, όσο και με το πρότυπο στέλεχος Echo 30, έτσι ώστε να εντοπιστούν πιθανές ομοιότητες του δείγματος με το στέλεχος Echo 30, που να εξηγούν το γεγονός αυτό. Στις εικόνες 13 και 14 παρουσιάζεται η αμινοξική σύγκριση για τη VP1 περιοχή του στελέχους 85929 με τα πρότυπα Echo 13 και Echo 30 αντίστοιχα, στις εικόνες 15 και 16 παρουσιάζεται η αμινοξική σύγκριση για τη VP2 περιοχή του στελέχους 85929 με τα πρότυπα Echo 13 και Echo 30 αντίστοιχα, ενώ στις εικόνες 17 και 18 παρουσιάζεται η αμινοξική σύγκριση για τη VP3 περιοχή του στελέχους 85929 με τα πρότυπα Echo 13 και Echo 30 αντίστοιχα. Επειδή δεν έχουν καθοριστεί οι αντιγονικές θέσεις του Echo 13, χρησιμοποιήθηκαν αυτές των CAV9 και Poliovirus, αφού πρώτα έγινε ομοπαράθεση μεταξύ των δύο και του στελέχους 85929. Στις εικόνες οι αντιγονικές θέσεις των CAV9 και poliovirus επισημαίνονται με πορτοκαλί γράμματα και με γκρι πλαίσιο αντίστοιχα. Δεν ήταν δυνατή η στοίχιση όλων των αντιγονικών θέσεων του poliovirus με το στέλεχος 85929 στη VP1 περιοχή, καθώς η μεταξύ τους ομοπαράθεση είχε πολλές διαφορές.

Τα αστεράκια (*) που βρίσκονται κάτω από τα στοιχισμένα αμινοξέα σημαίνουν ομοιότητα, τα κενά υποδεικνύουν ότι στο συγκεκριμένο σημείο υπάρχει διαφορετικό αμινοξύ, το σύμβολο (:) σημαίνει ότι το αμινοξύ ναι μεν αλλάζει, αλλά αντικαθίσταται από αμινοξύ με παρόμοιες ιδιότητες και το σύμβολο (.) σημαίνει ότι το διαφορετικό αμινοξύ έχει παρόμοιες ιδιότητες αλλά λιγότερες απ' ό,τι του συμβόλου (:).

VP1	
Echo13	GDESAKATVSNLTQPSGPSNSVSVPLMLTAAETGHTSQAVPSDTIQTRCVVNQHKRSESSVE 60
85929	GDKASEVTVSDTQPSGPSNSVSIPLMLTAAETGHTSQAVPSDTIQTRCVLNRHKRSESSIE 60
	:::..:
Echo13	NFLCRSACVY Y TTYDTHGDAADAKYASWTITTRKAAQLRRKLEMFTYLRFDLEVTFVITS 120
85929	NFLCRSACVY Y TTYDTHGDAADAKYASWTITTRKVAQLRRKLEMFTYLRFDLEVTFVITS 120
	*****.******.******.******.******.******.******.******.******:
Echo13	AQVTSTNKRQGAPVLTHQVMYVPPGGAVPASVDDYAWQTSTNPSIFWTEGNAPARMSIPF 180
85929	AQVTSTNQSDAPVLTHQVMYIIPGGAVPASVDDYAWQTSTNPSIFWTEGNAPARMSIPF 180
	*****.*.******.******.******.******.******.******.******:
Echo13	ISVGNAYSSFYDGSNFTQNGVYGFNTLNNMGKLYVRHVNGASPGPVKSTIRFYMKPKHV 240
85929	ISVGNAYSSFYDGSNFTQNGVYGFNTLNNMGKLYVRHVNGASPGPVKSTIRIYMKPKHV 240
	*****.******.******.******.******.******.******.******.******:
Echo13	KAWIPRPPRLCEYEKSGNVNFKPKGVTESTRSISIKLEKPNPASKLMNH 287
85929	KAWIPRPPRLCEYEKSGNVNFKPKGVTEARPSIKLEKPNPSTGGRLVTK 287
	*****.*.******.******.******.******.******.******.******:

Εικόνα 13: Αμινοξική ομοπαράθεση της VP1 γενωμικής περιοχής ανάμεσα στο στέλεχος 85929 και στο πρότυπο Echo 13. Με πορτοκαλί φαίνονται οι αντιγονικές θέσεις με βάση το CAV9, ενώ με γκρι φόντο αυτές με βάση τον poliovirus, ορότυποι 1,2 και 3 (site1, site2a και site 3a).

VP1	
Echo30	NDPEGALNKAVGRVADTIASGPVNTEQIPAL T AVETGHTSQVVPSDTMQTRHVVNFHTRS 60
85929	----GDKASEVT-VSDTQPSGPSNSVSIPLMLTAAETGHTSQAVPSDTIQTRCVLNRHKRS 55
	* . * *:* .** * : .** **.******.******.*** *:* * .**
Echo30	ESSLENFMGRAACAYIAHYTTEKANDDLDRYTNWEITTRQVAQLRRKLEMFTYMRFDLEI 120
85929	ESSIENFLCRSACVY Y TTYDTHGDAADAK-YASWTITTRKVAQLRRKLEMFTYLRFDLEV 114
	.:*:*:*.* : * * . * . * :.* *****.******.******.******:
Echo30	TFVITSSQRTSNRYASDSPPLTHQIMYVPPGGPIPKGYEDFAWQTSTNPSVFWTEGNAPP 180
85929	TFVITSAQVTSTNQSDAPVLTHQVMYIIPGGAVPASVDDYAWQTSTNPSIFWTEGNAPA 174
	*****.* **.. :.*:* *****.*:******.* : . :.******.******.*
Echo30	RMSIPFMSVGNAYCNFYDGSWHSFSQSGVYGYTTLNNMGHLYFRHVNKSTAYPVNSVARVY 240
85929	RMSIPFISVGNAYSSFYDGSNFTQNGVYGFNTLNNMGKLYVRHVNGASPGPVKSTIRIY 234
	*****.******.******.*:*.******.******.***.***.* :. **:* . *:
Echo30	FKPKHVKA W VPRAPRLCPYLYAKNVNFDVQGVTESRGKITLDRSTHNPVLT- 292
---	---

Εικόνα 14: Αμινοξική ομοπαράθεση της VP1 γενωμικής περιοχής ανάμεσα στο στέλεχος 85929 και στο πρότυπο Echo 30. Με πορτοκαλί φαίνονται οι αντιγονικές θέσεις με βάση το CAV9, ενώ με γκρι φόντο αυτές με βάση τον poliovirus, ορότυποι 1,2 και 3 (site1, site2a και site 3a).

VP2	
Echo13 85929	PSVEECGFSDRVRISITLGNSTITTTQECANVVAAYGEWPSYLDKTEATAEDQPTQPDVATC 60 PSVEECGFSDRVRISITLGNSTITTTQECANVVAAYGEWPSYLDKSEATSEADQPTQPDVATC 60 *****:***:*****
Echo13 85929	RFYTTLESVEWQSSAGWWKFFPEALKDMGLFGQNMHYHYLGRAGYTIHVQCNASKFHQGC 120 RFYTTLESVEWQSSAGWWKFFPEALKDMGLFGQNMHYHYLGRAGYTIHVQCNASKFHQGC 120 *****
Echo13 85929	LLVVCVPEAEMGCSNIDRVVTASALTSGERASTFQAQANINQNDVQNVVHNAAMGVGVGN 180 LLVVCVPEAEMGCSNIDKVVVTASALTSGERASTFQATINNNQNDVQNVVHNAAMGVGVGN 180 *****:***** *.:*****
Echo13 85929	LTIFPHQWINLRTNNSATIVMPYINSVPMDNMFRHYNFTLMIIPFAKLEYVSGASSVVI 240 LTIFHHQWINLRTNNSATIVMPYINSVPMDNMFRHYNFTLMIIPFAKLEYVSGASSVVI 240 **** *****
Echo13 85929	TVTIAPMSAEYNGLRRLGSVQ 260 TVTIAPMTAEYNGLRRLGSVQ 260 *****:*****

Εικόνα 15: Αμινοξική ομοπαράθεση της VP2 γενωμικής περιοχής ανάμεσα στο στέλεχος 85929 και στο πρότυπο Echo 13. Με πορτοκαλί φαίνεται η αντιγονική θέση με βάση το CAV9, ενώ με γκρι φόντο αυτή με βάση τον poliovirus, ορότυποι 1 και 3 (site2b).

VP2	
Echo30 85929	PTVEECGYSDRVRISITLGNSTITTTQECANVVVGYGWVPTYLSDHEATAVDQPTQPDVATC 60 PSVEECGFSDRVRISITLGNSTITTTQECANVVAAYGEWPSYLDKSEATSEADQPTQPDVATC 60 *.:*****:*****. ** **.:**.* ***: *****
Echo30 85929	RFYTTLESVKWESSAGWWKFFPEALSDMGLFGQNMQYHYLGRAGYTIHVQCNASKFHQGC 120 RFYTTLESVEWQSSAGWWKFFPEALKDMGLFGQNMHYHYLGRAGYTIHVQCNASKFHQGC 120 *****:*.: *****.*****:*****
Echo30 85929	LLVVCVPEAEMGAATTDHAMNHTKLSNIGQAMEFSAGKSTDQTGPQITAVHNAGMGVAVGN 180 LLVVCVPEAEMGCSNIDKVVVTASALTSGERASTFQATINNNQNDVQNVVHNAAMGVGVGN 180 *****.:. *.:.. : *.: * * * ..:.. *..****.***.***
Echo30 85929	LTIIYPHQWINLRTNNSATIVMPYINSVPMDNMYRHYNFTLMIIPFAKLEHSPQASTYVVI 240 LTIFHHQWINLRTNNSATIVMPYINSVPMDNMFRHYNFTLMIIPFAKLEYVSGASSVVI 240 ***: *****:*****:*****: . ** : **
Echo30 85929	TVTVAPMCAEYNGLRRLAGHQ 260 TVTIAPMTAEYNGLRRLGSVQ 260 ***:*** *****.. *

Εικόνα 16: Αμινοξική ομοπαράθεση της VP2 γενωμικής περιοχής ανάμεσα στο στέλεχος 85929 και στο πρότυπο Echo 30. Με πορτοκαλί φαίνεται η αντιγονική θέση με βάση το CAV9, ενώ με γκρι φόντο αυτή με βάση τον poliovirus, ορότυποι 1 και 3 (site2b).

VP3	
Echo13 85929	GLPTMNTPGSTQFLTSDDFQSPSAMPQFDVTPEMHIPGEVRLMEIAEVDSVVPVNN TAA 60 GLPTMNTPGSTQFLTSDDFQSPSAMPQFDVTPEMHIPGEVRLMEIAEVDSVVPVNN TDA 60 *****
Echo13 85929	NVNNMDAYRIPVQVSKVGEQVFGFQLEPGSGSVLCRLLGEILNYYTHWSGSIKLTFMFC 120 NVNGMDAYRIPVQVSKVGEQVFGFQLEPGSGSVLCRLLGEILNYYTHWSGSIKLTFMFC 120 ***.*****
Echo13 85929	GSAMATGKFLISYAPPGAGFPENRKDAMLGTHVVDVGLQSSCVLCIPWISQTHYRFVQH 180 GSAMATGKFLISYAPPGAGFPENRKDAMLGTHVVDVGLQSSCVLCIPWISQTHYRFVQH 180 *****:*****:*****
Echo13 85929	DVYTDAGYITCWYQTSLVVPAETPQQCTILCFVSACNDFSVRLKDTPFVQKNNFFQ 237 DVYTDAGYITCWYQTSLVVPAETPQQCTILCFVSACNDFSVRLKDTPFVQKNNFFQ 237 *****.*****.*****

Εικόνα 17: Αμινοξική ομοπαράθεση της VP3 γενωμικής περιοχής ανάμεσα στο στέλεχος 85929 και στο πρότυπο Echo 13. Με πορτοκαλί φαίνονται οι αντιγονικές θέσεις με βάση το CAV9, ενώ με γκρι φόντο αυτές με βάση τον rotavirus, ορότυποι 1 και 3 (site3b).

VP3	
Echo30 85929	GLPTMNTPGSTQFLTSDDFQSPSAMPQFDVTP EQIPGQVRNLMEIAEVDSVVPVDNTEE 60 GLPTMNTPGSTQFLTSDDFQSPSAMPQFDVTP EMHIPGEVRLMEIAEVDSVVPVNNTDA 60 *****:***:*****:***:
Echo30 85929	HVNSIEAYRIPVVRPQ TS GEQVFGFQ LQ PGYD SVLKH TLLGEILNYYANWSGSMKLT FM Y 120 NVNGMDAYRIPVQ-VSKVGEQVFGFQLEPGSGSVLCRLLGEILNYYTHWSGSIKLTFM F 119 :*.:::*****: : : *****:***.***:*****:***:*****:
Echo30 85929	CGAAMATGKFLIAYSPPGAGVPGSRKDAMLGTHVVDVGLQSSCVLCVPWISQTNRYRYVT 180 CGSAMATGKFLISYAPPGAGFPENRKDAMLGTHVVDVGLQSSCVLCIPWISQTHYRFVQ 179 **:*****:***:*****.*.***:*****:*****:***:***:
Echo30 85929	RDAYTDAGYITCWYQTSIVTPPDIPTTSTILCFVSACNDFSVRLLRDTPFITQQALYQ 238 HDVYTDAGYITCWYQTSLVVPAETPQQCTILCFVSACNDFSVRLKDTPFVQKNNFFQ 237 :*.*****:*.*. : * .*****:*****:***:***: :*:

Εικόνα 18: Αμινοξική ομοπαράθεση της VP3 γενωμικής περιοχής ανάμεσα στο στέλεχος 85929 και στο πρότυπο Echo 30. Με πορτοκαλί φαίνονται οι αντιγονικές θέσεις με βάση το CAV9, ενώ με γκρι φόντο αυτές με βάση τον rotavirus, ορότυποι 1 και 3 (site3b).

Στους πίνακες 7-9 παρουσιάζονται οι αμινοξικές αλλαγές του στελέχους 85929 σε σχέση με του προτύπου Echo 13 και ποιες από αυτές εντοπίζονται σε πιθανές αντιγονικές θέσεις. Επίσης οι αμινοξικές αυτές αλλαγές τοποθετήθηκαν σε τρισδιάστατη απεικόνιση του καψιδίου του Echo 11 (Εικόνα 19), όπου και επισημαίνονται οι πιθανοί αντιγονικοί επίτοποι με βάση αυτούς των CAV9 και rotavirus.

VP1

ΑΡΙΘΜΟΣ A/A	Echo 13 → 85929	ΑΡΙΘΜΟΣ A/A	Echo 13 → 85929	ΑΡΙΘΜΟΣ A/A	Echo 13 → 85929
3	E → K	59	V → I	279	N → S
4	S → A	95	A → V	280	P → T
5	A → S	128	K → Q	281	A → G
6	K → E	129	R → S	282	S → G
7	A → V	131	G → D	283	K → R
11	N → D	142	V → I	285	M → V
23	V → I	233	F → I	286	N → T
49	V → L	269	S → A	287	H → K
51	Q → R	271	T → P		

Πίνακας 7: Αμινοξικές αλλαγές στη VP1 καψιδιακή περιοχή μεταξύ του πρότυπου στελέχους Echo 13 και του 85929 στις αντίστοιχες θέσεις. Σε κύκλο είναι τα αμινοξέα που βρίσκονται στις αντίστοιχες αντιγονικές θέσεις του CAV9.

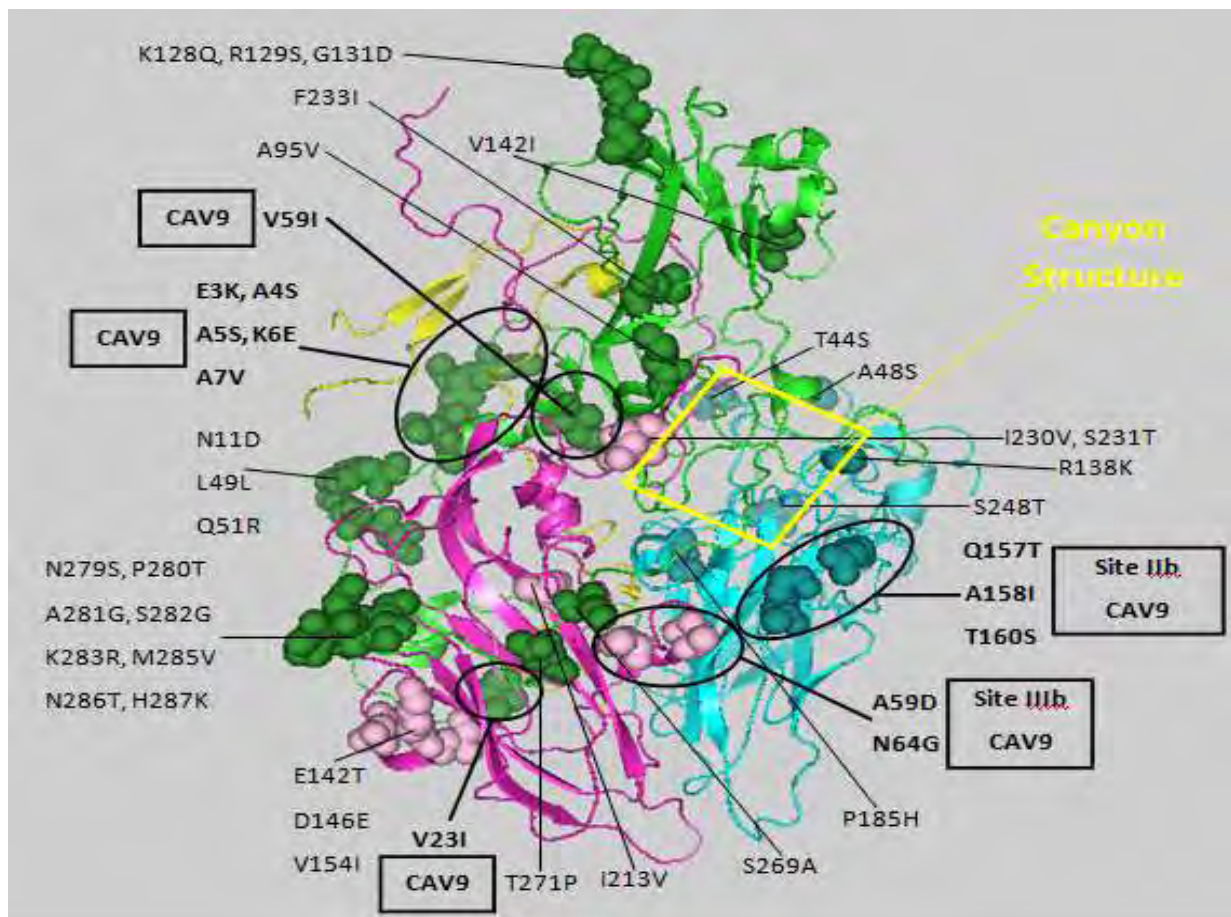
VP2

ΑΡΙΘΜΟΣ A/A	Echo 13 → 85929	ΑΡΙΘΜΟΣ A/A	Echo 13 → 85929	ΑΡΙΘΜΟΣ A/A	Echo 13 → 85929
44	T → S	157	Q → T	185	P → H
48	A → S	158	A → I	248	S → T
138	R → K	160	T → N		

Πίνακας 8: Αμινοξικές αλλαγές στη VP2 καψιδιακή περιοχή μεταξύ του πρότυπου στελέχους Echo 13 και του 85929 στις αντίστοιχες θέσεις. Σε κύκλο είναι τα αμινοξέα που βρίσκονται στις αντίστοιχες αντιγονικές θέσεις του CAV9, ενώ σε παραλληλόγραμμο το αμινοξύ που βρίσκεται στην αντίστοιχη αντιγονική θέση του ροιονίριους (ορότυποι 1 και 3).

VP3					
ΑΡΙΘΜΟΣ A/A	Echo 13 → 85929	ΑΡΙΘΜΟΣ A/A	Echo 13 → 85929	ΑΡΙΘΜΟΣ A/A	Echo 13 → 85929
59	A → D	146	D → E	230	I → V
64	N → G	154	V → I	231	S → T
142	E → T	213	I → V		

Πίνακας 9 : Αμινοξικές αλλαγές στη VP3 καψιδιακή περιοχή μεταξύ του πρότυπου στελέχους Echo 13 και του 85929 στις αντίστοιχες θέσεις. Σε κύκλο είναι τα αμινοξέα που βρίσκονται στις αντίστοιχες αντιγονικές θέσεις του CAV9, ενώ σε παραλληλόγραμμο το αμινοξύ που βρίσκεται στην αντίστοιχη αντιγονική θέση του poliovirus (ορότυποι 1 και 3).



Εικόνα 19: Εντοπισμός των αμινοξικών αλλαγών (σφαίρες) μεταξύ των στελεχών 85929 και Del Carmen στο καψίδιο, επάνω στη δομή του Echo 11 (Protein Data Bank number 1h8t). Οι VP1, VP2, VP3 και VP4 φαίνονται αντίστοιχα με πράσινο, κυανό, ροζ και κίτρινο. Αναγράφεται πρώτα το αμινοξύ του στελέχους Del Carmen, η θέση του αμινοξέως στο γονίδιο και τέλος το αμινοξύ του στελέχους 85929 (η θέση ταυτίζεται και στα δύο στελέχη). Σε κύκλο βρίσκονται οι αντιγονικές θέσεις των poliovirus και coxsackievirus A9.

3 Φυλογενετικά δέντρα της VP1 περιοχής

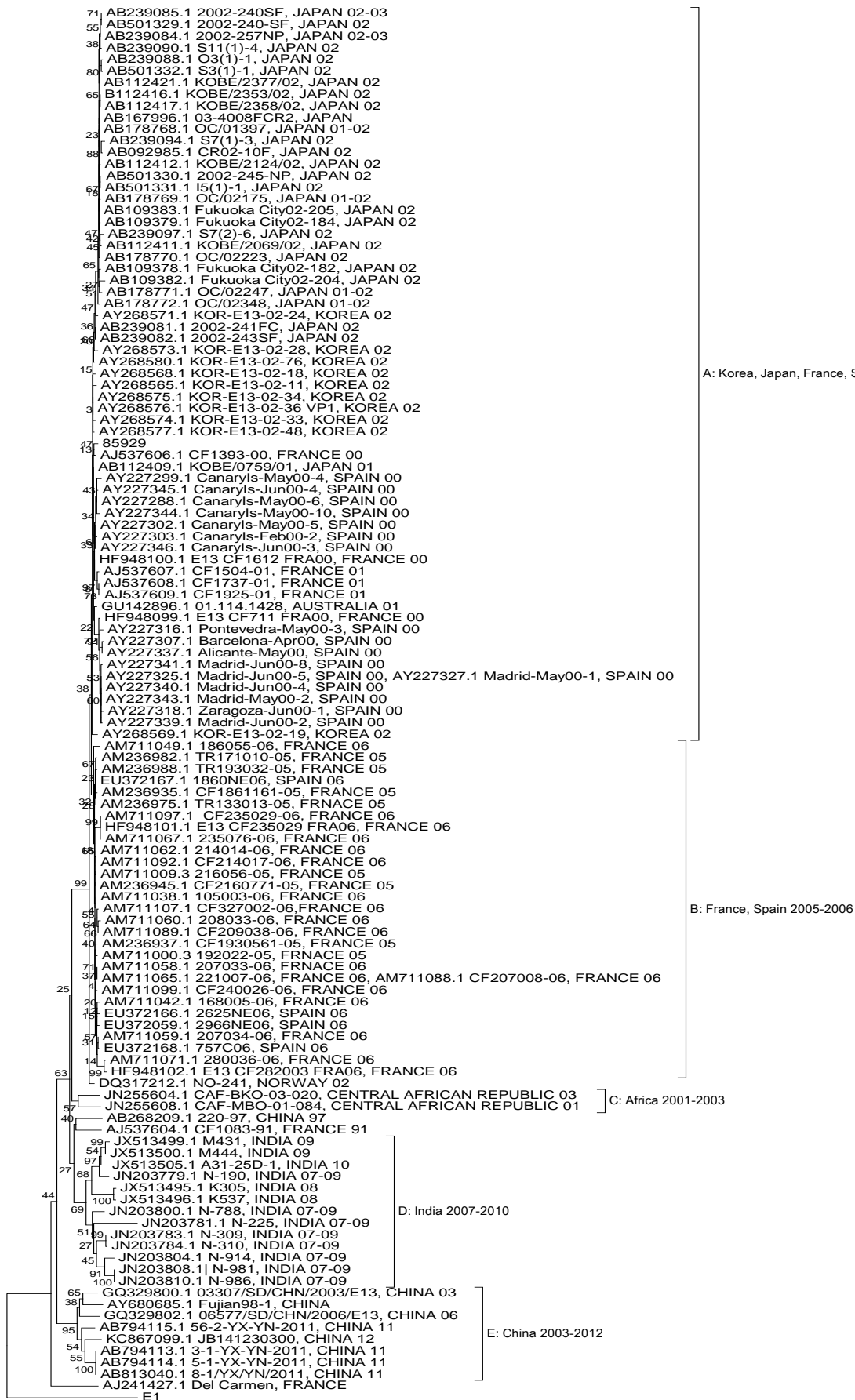
Για την επιδημιολογική μελέτη του στελέχους 85929 κατασκευάστηκαν δύο φυλογενετικά δέντρα με τμήματα της VP1 περιοχής κοινά με διάφορες κατατεθειμένες αλληλουχίες Echo 13 στελεχών στη GeneBank. Στην εικόνα 20 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο σε τμήμα 490nt (1-490nt της VP1) και στην εικόνα 21 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο σε τμήμα μεγέθους 370nt της VP1 (439-809nt). Το στέλεχος Echo 1 χρησιμοποιήθηκε ως ρίζα των δέντρων.

Το στέλεχος 85929 ταξινομείται φυλογενετικά με τα στελέχη του κλάδου A της περιόδου 2000-2002 και φαίνεται να κυκλοφόρησε παγκόσμια.

Αν και διακρίνονται πέντε κλάδοι με χρονική συσχέτιση, στην Ινδία φαίνεται να κυκλοφόρησαν ταυτόχρονα (2007-2009) δύο διαφορετικά στελέχη Echo 13, ενώ στελέχη της Κίνας που κυκλοφόρησαν την περίοδο 2003-2012 ομαδοποιούνται στον τελευταίο κλάδο.



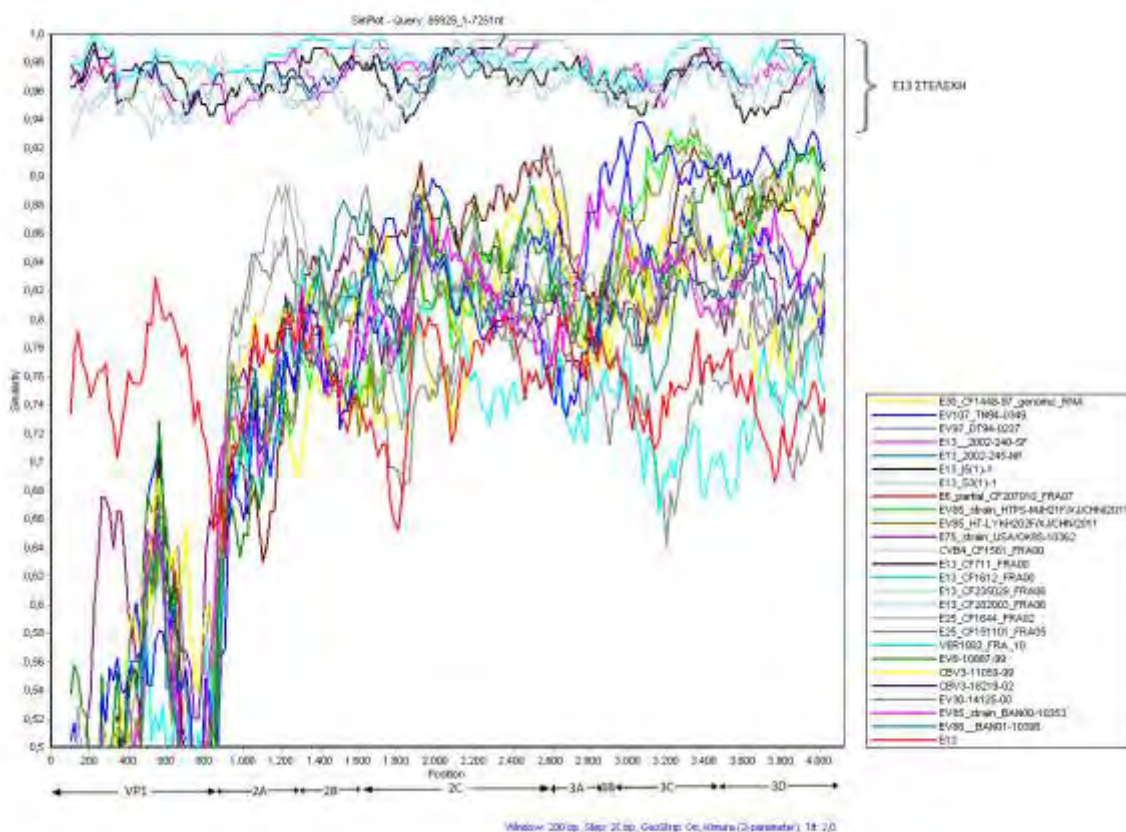
Εικόνα 20: Φυλογενετικό δέντρο της VP1 γενωμικής περιοχής από το νουκλεοτίδιο 1 μέχρι το 490.



Εικόνα 21: Φυλογενετικό δέντρο της VP1 γενωμικής περιοχής από το νουκλεοτίδιο 439 μέχρι το 809.

4 Έλεγχος για ανασυνδυασμό

Το στέλεχος 85929 μελετήθηκε σε ολόκληρο το γονιδιώμα του για την παρουσία ανασυνδυασμών. Λόγω έλλειψης αλληλουχιών από ολόκληρο το γονιδίωμα στελεχών εντεροϊών η μελέτη επικεντρώθηκε στην VP1 έως 3D γενωμική περιοχή. Στην εικόνα 22 φαίνεται η ανάλυση SimPlot που πραγματοποιήθηκε στην περιοχή VP1 έως 3D του γονιδιώματος του στελέχους 85929. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 26 στελέχη εκ των οποίων τα 8 είναι Echo 13, πιο συγκεκριμένα: 4 αλληλουχημένα σε ολόκληρο το μήκος του γονιδιώματος, τα 2002-240SF (Ιαπωνία, 2002, από ENY), 2002-245-NP (Ιαπωνία, 2002, από ρινοφαρυγγικό επίχρισμα), 15(1)-1 (Ιαπωνία, 2002, από νερό ποταμού) και S3(1)-1 (Ιαπωνία, 2002, από νερό ποταμού) και 4 στη γενωμική περιοχή VP1-3D, τα E13_CF711_FRA00 (Γαλλία, 2000, από κόπρανα), E13_CF1612_FRA00 (Γαλλία 2000, από ENY), E13_CF235029_FRA06 (Γαλλία, 2006, απ' το λαιμό) και E13_CF282003_FRA00 (Γαλλία, 2006, απ' το λαιμό). Τα στελέχη συγκρίθηκαν στην ίδια περιοχή, με το blast να δείχνει σχετικά αυξημένη ομοιότητα μεταξύ αυτών. Το στέλεχος 85929 δε φαίνεται να είναι ανασυνδυασμένο, καθώς το ποσοστό ομοιότητας με τα άλλα Echo 13 δεν παρουσιάζει έντονες διακυμάνσεις για τη γενωμική περιοχή VP1-3D.



Εικόνα 22: SimPlot ανάλυση της VP1-3D γενωμικής περιοχής του στελέχους 58929.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1 Μελέτη γονιδιώματος στελέχους 85929

Το στέλεχος 85929 απομονώθηκε από ασθενή με άσηπτη μηνιγγίτιδα το 2001 και αναλύθηκε σχεδόν σε όλο το μήκος του γονιδιώματός του (7251nt). Σύμφωνα με την αλληλούχηση της VP1 γενωμικής περιοχής του κατατάσσεται ως ένας Echo 13 ιός. Ο ορότυπος αυτός ήταν ένας από τους πιο συχνά απομονωμένους οροτύπους εντεροϊών που προκάλεσαν άσηπτη μηνιγγίτιδα το 2001, μεταξύ των Echo 6 και Echo 30 (*Siafakas et al., 2004*). Το στέλεχος 85929 εμφάνισε 78,40% νουκλεοτιδική και 90,94% αμινοξική ομοιότητα με το πρότυπο στέλεχος Del Carmen.

Εξετάστηκαν και συγκρίθηκαν οι πιθανές αντιγονικές θέσεις του στελέχους 85929 καθώς οροτυπικά ταυτοποιήθηκε ως ένας Echo 30 ιός. Οι αντιγονικές θέσεις και η κρυσταλλική δομή του Echo 13 ιού δεν έχουν καθοριστεί. Συνεπώς χρησιμοποιήθηκαν οι αντιγονικές θέσεις των rotavirus (ορότυποι 1-3) και coxsackievirus A9 και προβλήθηκαν στη δομή του Echo 11.

Αρχικά παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις πρωτεΐνες η νουκλεοτιδική και αμινοξική ομοιότητα μεταξύ του στελέχους 85929 και του προτύπου Echo 13 ήταν πάνω από 75% και 85% αντίστοιχα, ενώ μεταξύ του στελέχους 85929 και του προτύπου Echo 30 ήταν κάτω από αυτά τα ποσοστά (65,16% και 62,2% αντίστοιχα). Για να καταλήξουμε στην οροτυπική ταυτοποίηση ενός εντεροϊού, θα πρέπει η νουκλεοτιδική ομοιότητα της αλληλουχίας της VP1 περιοχής να είναι >75% μεταξύ ενός δείγματος και του πρότυπου στελέχους (*Oberste et al., 1999*). Η προϋπόθεση είναι ότι δεν θα πρέπει να υπάρχει άλλο πρότυπο στέλεχος με ομοιότητα που να ξεπερνά το 70%. Εάν η νουκλεοτιδική ομοιότητα είναι <70%, τότε αναφερόμαστε σε νέο ορότυπο (*Oberste et al., 2004*). Βάση αυτού και του κανόνα για την ταυτοποίηση ενός οροτύπου το στέλεχος 85929 ταυτοποιήθηκε ως Echo 13. Εντοπίστηκαν τα αμινοξέα που διέφεραν μεταξύ του στελέχους 85929 και του προτύπου Echo 13, ενώ ήταν ίδια με το πρότυπο Echo 30 και αναφέρονται παρακάτω ανάλογα με την πρωτεΐνη που ανήκουν.

VP1: Τα αμινοξέα 7V και 23I του στελέχους 85929 διέφεραν αλλά είχαν παρόμοιες ιδιότητες με τα αντίστοιχα του προτύπου Echo 13, 7A και 23V, ενώ ήταν ίδια με αυτά του προτύπου Echo 30 και βρίσκονται στις αντιγονικές θέσεις του CAV9.

VP3: Το αμινοξύ 59D του στελέχους 85929 διέφερε με αυτό του προτύπου Echo 13 59A, αλλά είχε παρόμοιες ιδιότητες με αυτό του προτύπου Echo 30 59E και ανήκει σε αντιγονική θέση και των δύο ιών.

Οι αμινοξικές διαφορές στις θέσεις 157, 158 και 160 της VP2 και στις 59 και 64 της VP3, εντοπίζονται στις αντιγονικές θέσεις του CAV9 σε περιοχές με δομή θηλιάς (ruff region) και δομή κόμπου (knob structure) αντίστοιχα οι οποίες σε κάποιους εντεροϊούς έχει βρεθεί να

συμβάλλουν στην πρόσδεση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα (*Buttinelli et al., 2003*). Επιπλέον βρέθηκαν πολλές αμινοξικές διαφορές μεταξύ του στελέχους 85929 και Del Carmen στη VP1 περιοχή, συγκεκριμένα στο N και C τελικό άκρο, όπου έχουν αναγνωρισθεί επίτοποι διαφόρων εντεροϊών (*Pulli et al., 1998, Shin et al., 2003*)

Οι περισσότερες αμινοξικές διαφορές μεταξύ των στελεχών 85929 και Del Carmen που κυρίως παρατηρούνται στη VP1 είναι συγκεντρωμένες στη καρβοξυτελική περιοχή που οριοθετεί νότια την αύλακα. Επειδή τα καρβοξυτελικά άκρα των VP1 και VP3 περιπλέκονται μεταξύ τους (*Rossmann et al., 1985*), το S231T που παρατηρείται στο καρβοξυτελικό άκρο της VP3, η οποία μερικώς οριοθετεί το νότιο τμήμα της αύλακας, ίσως σχετίζεται με τις αλλαγές του καρβοξυτελικού άκρου της VP1. Επιπλέον οι αλλαγές των αμινοξέων μεταξύ των δύο στελεχών ίσως επηρεάζουν όχι μόνο την αντιγονικότητά τους, αλλά και τις ιδιότητες της πρόσδεσης των υποδοχέων και συνεπώς να μεταβάλλουν την ικανότητα μόλυνσης των ιών, όπως επίσης και την εξειδίκευση του κυττάρου-ξενιστή (*Iwai et al., 2010*).

Για την επιδημιολογική μελέτη του στελέχους 85929 χρησιμοποιήθηκαν δύο τμήματα της VP1 γενωμικής περιοχής κοινά για στελέχη Echo 13. Λόγω του μικρού αριθμού κατατεθειμένων αλληλουχιών ολόκληρης της VP1 περιοχής και την ύπαρξη κάποιων τμημάτων της στην Genbank, ήταν αδύνατη η κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου με ολόκληρη τη VP1 γενωμική περιοχή. Έτσι κατασκευάστηκαν δύο φυλογενετικά δέντρα ένα για το 5' άκρο της VP1 γενωμικής περιοχής και ένα για το 3' άκρο. Μεταξύ των δύο δέντρων δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ 5' και 3' άκρου της VP1. Στα φυλογενετικά δέντρα για τις δύο περιοχές τα Echo 13 στελέχη παρουσιάζουν χρονική συσχέτιση και διαχωρίζονται σε 4 κλάδους 2000-2002, 2005-2006, 2001-2003 και 2007-2010, με εξαίρεση τα στελέχη της Κίνας (2003-2012). Υπάρχει συμφωνία με δημοσιεύσεις που αφορούν Echo 13 ιούς σε αυτές τις χρονολογίες, δηλαδή την κυκλοφορία διαφόρων στελεχών στις αντίστοιχες ημερομηνίες και τη δημιουργία κλάδων. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει η δημιουργία κλάδου στελεχών της περιόδου 2000-2002, στις χώρες της Ιαπωνίας, Κορέας, Αυστραλίας, Γερμανίας και Βελγίου (*Mullins et al., 2003*). Επίσης σε μελέτη αναφέρεται η ύπαρξη ενός γενότυπου την περίοδο 2000-2003, καθώς και η δημιουργία κλάδου της Ινδίας την περίοδο 2007-2008 (*Maan et al., 2013*). Τα κορεάτικα στελέχη του 2002 ήταν κοντά με τα στελέχη της Ιαπωνίας και Γερμανίας της ίδιας περιόδου (*Cheon et al., 2004*). Επίσης στελέχη της Ισπανίας, Ιαπωνίας και Γερμανίας, το 2000-2001, είναι φυλογενετικά κοντά (*Avellon et al., 2003*). Τέλος έχει αναφερθεί ότι ο ορότυπος Echo 13 εμφανιζόταν σπάνια παγκοσμίως μέχρι πριν το 2000, ενώ μετά φάνηκε να έχει παγκόσμια εξάπλωση. Μάλιστα ο Echo 13 αναφέρεται ως ένας ορότυπος με υψηλή γενετική ποικιλία η οποία όμως μπορεί να οφείλεται σε συνεχή κυκλοφορία του σε ιδιαίτερα υψηλής πυκνότητας πληθυσμούς κυρίως της κεντρικής και νότιας Ασίας (*Maan et al., 2013, Mullins et al., 2003, Iwai et al., 2006, Archimbaud et al., 2003*).

Από τα φυλογενετικά δέντρα συμπεραίνουμε ότι ο ιός κυκλοφορούσε σε Ασία και Ευρώπη από το 2000 μέχρι το 2002, στη συνέχεια περιορίστηκε στην Ευρώπη (2005-2006) και τέλος

εμφανίστηκε τελευταία στην Ινδία από 2007 μέχρι το 2010. Στην Κίνα συγκεκριμένο στέλεχος φαίνεται να κυκλοφόρησε για μεγάλο χρονικό διάστημα, 2003-2012, ίσως λόγω του μεγάλου αριθμού του πληθυσμού της ή των ανοσολογικά ευαίσθητων ομάδων της.

Στον έλεγχο ανασυνδυασμού με SimPlot που έγινε στη VP1-3D γενωμική περιοχή του στελέχους 85929 (Εικόνα 22) δε φαίνεται να υπάρχει κάποιος ανασυνδυασμός καθώς το ποσοστό ομοιότητάς του με τα άλλα Echo 13 δεν παρουσίαζε έντονες διακυμάνσεις. Δεν έχει αναφερθεί σε βιβλιογραφία η ύπαρξη ανασυνδυασμού στο συγκεκριμένο στέλεχος. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος ορότυπος δεν είναι επιρρεπής για κάποιο λόγο στον ανασυνδυασμό ή ότι δεν κυκλοφορεί συχνά. Βέβαια το συμπέρασμα αυτό είναι δύσκολο να επιβεβαιωθεί λόγω του πολύ μικρού αριθμού κατατεθειμένων αλληλουχιών ολόκληρων γονιδιωμάτων όχι μόνο Echo 13 αλλά και άλλων οροτύπων.

Το γένος των ενεροϊών αποτελείται από πολλά παθογόνα στελέχη και προκαλεί πληθώρα ασθενειών και μεγάλες επιδημίες. Είναι σημαντικό να μελετάμε την κυκλοφορία των στελεχών των εντεροϊών στο πληθυσμό, και τον τρόπο που εξελίσσονται μέσα στο χρόνο. Η μελέτη της εξέλιξης των εντεροϊών, συμβάλλει στη αναγνώριση πολύ-ανασυνδυασμένων στελεχών τα οποία σε συνδυασμό με τη συνεχή συσσώρευση μεταλλάξεων μπορούν να οδηγήσουν σε στελέχη επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andersson, S.O., Bjorksten, B. and Burman, L.A. (1975). A comparative study of meningoencephalitis epidemics caused by echovirus type 7 and coxsackievirus type B5. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **7**, 233–237.

Archimbaud C, Bailly JL, Chambon M, Tournilhac O, Travade P, Peigue-Lafeuille H. (2003) Molecular Evidence of Persistent Echovirus 13 Meningoencephalitis in a Patient with Relapsed Lymphoma after an Outbreak of Meningitis in 2000 *J Clin Microbiol.* 2003 Oct;41(10):4605-10.

Avellón A, Casas I, Trallero G, Pérez C, Tenorio A, Palacios G. (2003) Molecular Analysis of Echovirus 13 Isolates and Aseptic Meningitis, Spain *Emerg Infect Dis.* 2003 Aug;9(8):934-41.

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, E.J. and Grist, N.R. (1970). Echovirus, carditis and acute pleurodynia. *The Lancet*, **295**(7642), 326–328.

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

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.

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

Bolonaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorichis 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 Katsorichis 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.

Borrego B., Carra E., García-Ranea J.A., Brocchi E. 2000 Characterization of neutralization sites on the circulating variant of swine vesicular disease virus (SVDV): a newsite is shared by SVDV and the related coxsackie B5 virus. *J Gen Virol.* 2002 Jan;83(Pt 1):35-44.

Buttinelli G., V. Donati, F. M. Ruggeri, P. Joki-Korpela, T. Hyypia, and LFiore. 2003. Antigenic sites of coxsackie A9 virus inducing neutralizing monoclonal antibodies protective in mice. *Virology* **312**:74–83.

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

Cheon DS, Lee J, Lee K, Lee S, Park K, Ahn J, Jee Y, Yoon J, Cho H. (2004) Isolation and Molecular Identification of Echovirus 13 Isolated From Patients of Aseptic Meningitis in Korea, 2002 *J Med Virol.* 2004 Jul;73(3):439-42

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

Denise Egger, Natalya Teterina, Ellie Ehrenfeld, and Kurt Bienz, (2000). Formation of the Poliovirus Replication Complex Requires Coupled Viral Translation, Vesicle Production, and Viral RNA Synthesis *J Virol.* 2000 July; 74(14): 6570–6580.

Diaz-Horta, O., Bello, M., Cabrera-Rode, E., Suarez, J., Mas, P., Garcia, I., Abalos, I., Jofre, R., Molina, G., Diaz-Diaz, O. and Dimario, U. (2001) Echovirus 4 and type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*, **34**(4), 275–281.

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
Figlerowicz M, Alejska M, Kurzynska-Kokorniak A, et al. Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Medicinal Res Reviews* 2003

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.

- 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
- 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**: 8958 – 8965
- Grimwood, K., Huang, Q.S., Sadleir, L.G., Nix, W.A., Kilpatrick, D.R., Oberste, M.S. and Pallansch, M.A. (2003).** Acute flaccid paralysis from echovirus type 33 infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **4**(5), 2230–2232.
- Gromeier M., Alexander L., and Wimmer E. (1996)** Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *PNAS.* **93**(6): 2370 – 2375
- Sadia Halim and Arlene I. Ramsingh (2000)** A Point Mutation in VP1 of Coxsackievirus B4 Alters Antigenicity *Virology.* 2000 Mar 30;269(1):86-94.
- 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
- Inge, T., Philippe, L., Van Der Donck, I., Beuselinck, K., Lindberg, A.M. and Van Ranst, M. (2003).** Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *Journal of Medical Virology*, **70**(3), 420–429.
- Iwai M., H. Yoshida, M. Obara, E. Horimoto, K. Nakamura, T. Takizawa, T. Kurata, M. Mizuguchi, T. Daikoku, and K. Shiraki (2010).** Widespread Circulation of Echovirus Type 13 Demonstrated by Increased Seroprevalence in Toyama, Japan, between 2000 and 2003. *Clin Vaccine Immunol.* 2010 May; **17**(5): 764–770
- Iwai Masae, Hiromu Yoshida, Kumiko Matsuura, Tsuguto Fujimoto, Hiroyuki Shimizu, Takenori Takizawa, and Yoshiyuki Nagai (2006)** Molecular Epidemiology of Echoviruses 11 and 13, Based on an Environmental Surveillance Conducted in Toyama Prefecture, 2002-2003, *Appl Environ Microbiol.* 2006 Sep;72(9):6381-7.

Jorba J., R. Campagnoli, L. De, and O. Kew. 2008. Calibration of multiple poliovirus molecular clocks covering an extended evolutionary range. *J. Virol.* **82**:4429–4440.

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

Kazi, N.J., Cepeda, E.E. and Budev, H. (1988) Fatal echovirus type 7 in a premature infant. *American Journal of Perinatology*, 5(3), 236–238.

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

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

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

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

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. [Epub ahead of print]

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

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.

Maan HS, Chowdhary R, Shakya AK, Dhole TN. (2013) Genetic Variants of Echovirus 13, Northern India, 2010 *Emerg Infect Dis.* 2013 Feb;19(2):293-6

Mandell, G.L. (2000) *Principles and Practice of Infectious Diseases.* Churchill Livingstone

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

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

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

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

Minor P. D., M. Ferguson, D. M. Evans, J. W. Almond, and J. P. Icenogle. 1986. Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J. Gen. Virol.* 67:1283–1291.

Minor, P. D., M. Ferguson, K. Katrak, D. Wood, A. John, J. Howlett, G. Dunn, K. Burke, and J. W. Almond. 1991. Antigenic structure of chimeras of type 1 and type 3 polioviruses involving antigenic sites 2, 3 and 4. *J. Gen. Virol.* 72:2475–2481.

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

Mullins JA, Khetsuriani N, Nix WA, Oberste MS, LaMonte A, Kilpatrick DR, Dunn J, Langer J, McMinn P, Huang QS, Grimwood K, Huang C, Pallansch MA. (2003) Emergence of Echovirus Type 13 as a Prominent Enterovirus. *Clin Infect Dis.* 2004 Jan 1;38(1):70-7. Epub 2003 Dec 8.

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

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., 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., 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 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). Enterovirus 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., Junntila N., Uddin M., Chomel J. J., Lau C. S., Ridha W., al-Busaidy S., Norder H., Magnius 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, 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, 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.

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.

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.

- Page G. S., A. G. Mosser, J. M. Hogle, D. J. Filman, R. R. Rueckert, and M. Chow.** 1988. Three-dimensional structure of poliovirus serotype 1 neutralizing determinants. *J. Virol.* **62**:1781–1794.
- 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
- Patel V., M. Ferguson, and P. D. Minor.** 1993. Antigenic sites on type 2 poliovirus. *Virology* **192**:361–364.
- 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
- 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.
- 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
- Pulli T., H. Lankinen, M. Roivainen, and T. Hyypia”. 1998.** Antigenic sites of coxsackievirus A9. *Virology* **240**:202–212.
- 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
- 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
- Romero JR. (1999).** Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med.* 1999 Dec;123(12):1161-9.

Rossmann M. G., E. Arnold, J. W. Erickson, E. A. Frankenger, J. P. Griffith, H. J. Hecht, J. E. Johnson, G. Kamer, M. Luo, A. G. Mosser, R. R. Rueckert, B. Sherry, and G. Vriend. 1985. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature* 317:145-153.

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

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;32:2590–2592.4

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

Shin S. Y., K. S. Kim, Y. S. Lee, Y. S. Chung, K. S. Park, D. S. Cheon, B. K. Na, Y. Kang, H. M. Cheong, Y. Moon, J. H. Choi, H. E. Cho, N. Y. Min, J. S. Son, Y. H. Park, Y. Jee, J. D. Yoon, C. Y. Song, and K. H. Lee. 2003. Identification of enteroviruses by using monoclonal antibodies against a putative common epitope. *J. Clin. Microbiol.* 41:3028–3034.

Shingler KL, Yoder JL, Carnegie MS, Ashley RE, Makhov AM, Conway JF, Hafenstein S. (2013) The enterovirus 71 A-particle forms a gateway to allow genome release: a cryoEM study of picornavirus uncoating. *PLoS Pathog.*

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.

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., and Levidiotou-Stefanou S. (2004) Molecular identification of enteroviruses responsible for an outbreak of aseptic meningitis; implications in clinical practice and epidemiology. *Mol. Cell. Probes.* 18:389-98.

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

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

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.

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

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

W G Brodbeck, L Kuttner-Kondo, C Mold, and M E Medof. (2000) Structure/function studies of human decay-accelerating factor. *Immunology.* 2000 September; 101(1): 104–111.

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

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

World Health Organization: Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. <http://www.who.int/vaccinesdocuments/DocsPDF03/www737pdf>. Accessed 3 Mar 2003

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.

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.