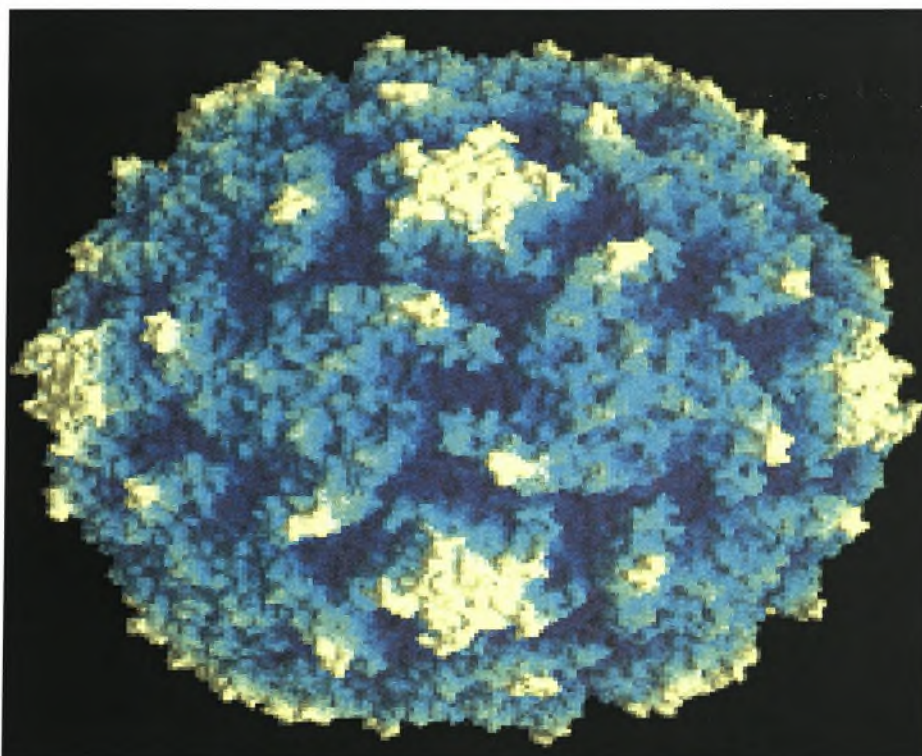


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΔΥΟ ΦΑΣΕΩΝ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ ΜΕ SEMI-NESTED PCR
ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ**



ΜΑΝΤΖΙΑΡΑ ΧΡΥΣΑΥΓΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2009



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

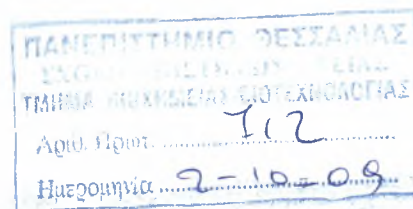
Αριθ. Εισ.: 7656/1
Ημερ. Εισ.: 09-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΜΑΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087171

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ



ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών Μικροοργανισμών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αισθάνομαι την υποχρέωση να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή μου κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την ανάθεση σε εμένα του ενδιαφέροντος αυτού θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας προπτυχιακής διατριβής και την κριτική διόρθωση του κειμένου. Επίσης ένα θερμό ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη και στο Λέκτορα Δημήτριο Καρπούζα που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή. Ακόμη ευχαριστώ τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για το φιλικό περιβάλλον στο χώρο εργασίας και ιδιαίτερος ευχαριστώ την κ. Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου για την υπομονή, την καθοδήγηση και τη βοήθειά της η οποία υπήρξε σημαντική για μένα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εντεροϊοί είναι το σημαντικότερο γένος της οικογένειας των Picorna ιών και οι 65 ορότυποι τους ταξινομούνται σε πέντε υποομάδες. Οι εντεροϊοί φέρουν καψίδιο το οποίο δεν περιβάλλεται από λιπιδικό έλυτρο και εμπεριέχει ένα μόριο RNA θετικής πολικότητας. Το γένωμά τους περιλαμβάνει τρεις κύριες περιοχές: την 5'μη κωδική περιοχή (5'-UTR), το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) και την 3'μη κωδική περιοχή (3'-UTR). Η κωδική περιοχή του RNA (ORF) μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία περιέχει πληροφορίες για τις τέσσερις δομικές (VR1-VR4) και τις επτά λειτουργικές (2A-2C και 3A-3D) πρωτεΐνες του ιού.

Οι εντεροϊοί έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη δημόσια υγεία, δεδομένου ότι σχετίζονται με επιδημίες γαστρεντερίτιδας από την κατανάλωση μολυσμένου νερού. Οι ιοί αυτοί μπορούν να απομονωθούν σε μεγάλες ποσότητες από κόπρανα ανθρώπινης προέλευσης, καθώς και από λύματα και μολυσμένα νερά. Η μη κατάλληλη επεξεργασία λυμάτων έχει ως αποτέλεσμα τη μόλυνση του υδάτινου περιβάλλοντος με επιπτώσεις στη δημόσια υγεία. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των εντερικών ιών στο υδάτινο περιβάλλον είναι η θερμοκρασία, το pH, το φως, η ακτινοβολία και η προσρόφηση τους στις επιφάνειες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση εντεροϊών από ακατέργαστα λύματα τα οποία ελήφθησαν κατά την είσοδό τους σε σταθμούς βιολογικού καθαρισμού (Λάρισα, Τρίκαλα, Ιωάννινα). Συνολικά συλλέχθηκαν 24 δείγματα ακατέργαστων λυμάτων κατά την περίοδο Ιούλιος 2005-Αύγουστος 2007. Η μεθοδολογία αφορούσε στη συγκέντρωση των δειγμάτων, πριν την ανίχνευση των ιών, με την μέθοδο των δύο φάσεων ακολουθούμενη από RT-semi nested PCR, προκειμένου να επιτευχθεί αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης των ιών. Το αποτέλεσμα της μελέτης ήταν η ανίχνευση 5 θετικών δειγμάτων εντεροϊού από τα 24 συνολικά δείγματα που μελετήθηκαν.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
1.Εισαγωγή.....	6
1.1 Ταξινόμηση των Εντεροϊών.....	6
1.2 Φυσιολογία των Εντεροϊών.....	8
1.2.1 Δομή.....	8
1.2.1.1 Καψίδιο.....	8
1.2.1.1.1 Δομικές πρωτεΐνες.....	10
1.2.1.1.2 Λειτουργικές πρωτεΐνες.....	10
1.2.2 Το γένωμα των εντεροϊών.....	11
1.2.2.1 5'UTR.....	11
1.2.2.2 ORF.....	17
1.2.2.3 3'UTR.....	17
1.2.3 Υποδοχείς εντεροϊών.....	18
1.2.4 Κύκλος ζωής των εντεροϊών.....	20
1.2.4.1 Αντιγραφή.....	20
1.2.4.2 Μετάφραση.....	21
1.2.4.3 Καψιδίωση και απελευθέρωση ιϊκών σωματιδίων.....	23
1.3 Εξέλιξη των εντεροϊών.....	24
1.4 Εντεροϊοί στο υδάτινο περιβάλλον.....	25
1.4.1 Ιοί εντερικής προέλευσης στα λύματα.....	27
1.4.1.1 Λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μη επεξεργασμένων επιφανειακών υδάτων.....	28
1.4.1.2 Λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων μη επεξεργασμένων υπόγειων υδάτων.....	28
1.4.1.3 Λοιμώξεις από την κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού.....	29
1.4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των ιών στο περιβάλλον.....	29
1.4.2.1 Θερμοκρασία.....	29
1.4.2.2 Φώς –ακτινοβολία.....	30
1.4.2.3 pH.....	30
1.4.2.4 Προσρόφηση ιών σε επιφάνειες.....	31
1.4.2.5 Παρουσία άλλων μικροοργανισμών.....	32
1.5 Μέθοδοι απομόνωσης ιών εντερικής προέλευσης.....	33
1.6 Επιδημιολογία.....	34
2 Πειραματική διαδικασία.....	37
2.1 Σκοπός της μελέτης.....	38
2.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	38
2.2.1 Συγκέντρωση περιβαλλοντικών δειγμάτων.....	38
2.2.2 Μέθοδοι διαχωρισμού δύο Φάσεων.....	38
2.2.3 Εκχύλιση ιϊκού RNA.....	39
2.2.4 Αντίστροφη μεταγραφή.....	39
2.2.5 Εκκηνιτικά μόρια.....	40
2.2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	40
2.2.7 Semi-nested –Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	41
2.2.8 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR.....	41
2.3 Αποτελέσματα.....	42
3 Συζήτηση.....	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	45

1 Εισαγωγή

1.1 Ταξινόμηση των Εντεροϊών

Οι Picorna ιοί (Pico:μικρός +RNA), αποτελούν μια ευρεία οικογένεια μικρών, μη ελυτροφόρων RNA-ιών θετικής πολικότητας, στην οποία περιλαμβάνονται αρκετά παθογόνα για τον άνθρωπο και για άλλα είδη θηλαστικών στελέχη και περιλαμβάνει 230 οροτύπους που ομαδοποιούνται σε εννέα γένη ιών (Pringle, 1999). Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται τόσο στα αντιγονικά τους χαρακτηριστικά όσο και στους ξενιστές και τα όργανα τα οποία προσβάλλουν καθώς και στις φυσικοχημικές ιδιότητες τους. Σύμφωνα, λοιπόν, με αυτές τις διαφοροποιήσεις, διακρίνονται τα γένη των Εντεροϊών (Enterovirus), των Ρινοϊών (Rhinovirus), των ιών της Ηπατίτιδας Α (Hepatovirus), των Καρδιοϊών (Cardiovirus), των Παρεκοϊών (Parechovirus) και των Κομπουϊών (Kobuvirus), τα οποία παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια καθώς και τα τρία γένη των Ερμποϊών (Erbovirus), των Αφθοϊών (Aphthovirus) και των Τεσκοϊών (Teschovirus), τα οποία δεν παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Επίσης σε ξεχωριστή κατηγορία κατατάσσονται τα γένη των μη ταξινομημένων Picorna ιών (King et al., 2000).

Οι εντεροϊοί είναι το σημαντικότερο γένος της οικογένειας των Picorna ιών ως προς την παθογένεια των μελών του αναφορικά με τον άνθρωπο.

Αρχικά το γένος των εντεροϊών χωρίστηκε σε τέσσερις κατηγορίες : (i) στους πολιοϊούς (PV1-3), (ii) στους coxsackie A ιούς (CAV), (iii) στους coxsackie B ιούς (CBV) και (iv) στους echo-ιοίς (Melnick J.L., 1996). Μετέπειτα, όμως με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, η γενωμική ανάλυση διαδέχτηκε την οροταυτοποίηση, ως μέσο ανίχνευσης και ταξινόμησης των εντεροϊών. Το 1999, η αναταξινόμηση των εντεροϊών με βάση την πρωτοταγή τους οργάνωση (νουκλεοτιδική και αμινοξική) έγινε αποδεκτή από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV). Σύμφωνα, λοιπόν, με τα σύγχρονα μοριακά δεδομένα, το γένος των εντεροϊών χωρίζεται σήμερα σε 5 είδη που παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια (King et al., 2000). Βάσει αναλύσεων της πρωτοταγούς τους δομής και της VP1 περιοχής τους οι 65 ορότυποι, που αποτελούν το σύνολο των ανθρώπινων εντεροϊών, κατανέμονται : (α) στους πολιοϊούς που περιλαμβάνουν τους PV1-3 (β) στους ανθρώπινους εντεροϊούς Α (HEV-A) στους οποίους ανήκουν οι

CAV2-8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16, EV71, (c) στους ανθρώπινους εντεροϊούς B (HEV-B) στους οποίους ανήκουν οι CAV9, CBV1-6, E1-7, E9, E11-21, E24-27, E29-33, EV69, EV73, (d) στους ανθρώπινους εντεροϊούς C (HEV-C) στους οποίους ανήκουν οι CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17-22, CAV24, (e) και στους ανθρώπινους εντεροϊούς D (HEV-D) στους οποίους ανήκουν οι EV68 και EV70.

Αργότερα ανακαλύφθηκαν νέοι εντεροϊοί όπως ο EV73, ο οποίος ανήκει στους HEVB, ο EV74 και ο EV75 οι οποίοι ανήκουν στους HEVB, οι EV77, EV78 οι οποίοι κατατάσσονται στους HEVB, οι EV76, EV89, EV90, EV91 οι οποίοι ομαδοποιούνται στους HEVA και τέλος οι EV79-88, EV97, EV100-101 οι οποίοι κατατάσσονται στους HEVB.

Γενικότερα η ταξινόμηση των εντεροϊών συνεχώς αναβαθμίζεται εξαιτίας της συνεχούς εύρεσης νέων οροτύπων, ενώ ακόμη και σήμερα, υπάρχει ένας αριθμός στελεχών, τα οποία φέρουν τον τίτλο «μη ταυτοποιημένα».

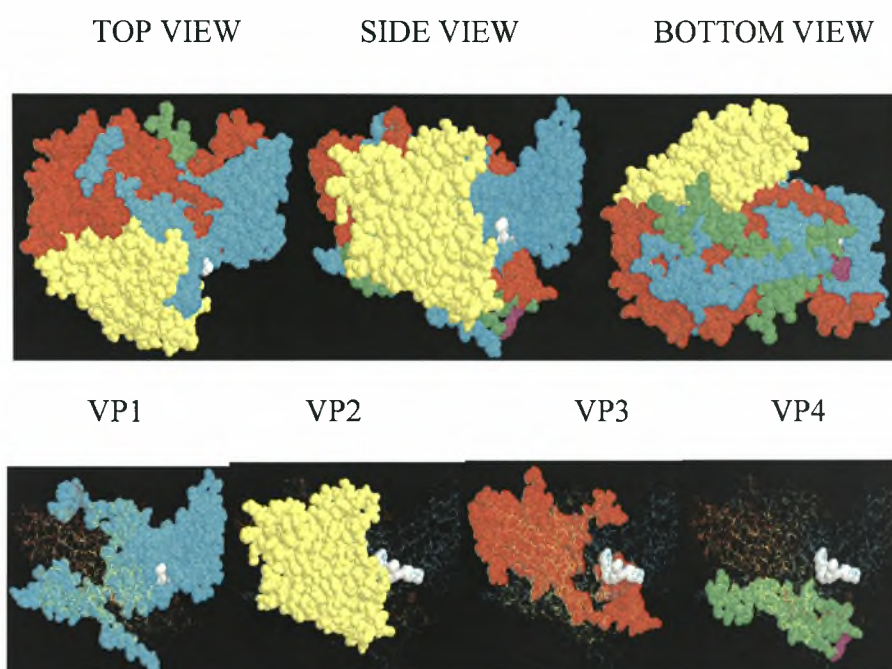
ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ		
Ομάδα I	πολιοϊούς	PV1-3.
Ομάδα II	εντεροϊούς A (HEV-A)	CAV2 έως CAV8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16, EV71, EV76, EV89, EV90, EV91.
Ομάδα III	εντεροϊούς B (HEV-B)	CAV9, CBV1 έως CBV6, E1 έως E7, E9, E11 έως E21, E24 έως E27, E29 έως E33, EV69, EV73, EV77, EV78, EV79 έως EV88, EV97, EV100 και EV101.
Ομάδα IV	εντεροϊούς C (HEV-C)	CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17 έως CAV22 και CAV24.
Ομάδα V	εντεροϊούς D (HEV-D)	EV68 και EV70.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση του γένους των Εντεροϊών.

1.2 Φυσιολογία των Εντεροϊών

1.2.1 Δομή

Οι εντεροϊοί, όπως και όλοι οι Picorna ιοί είναι RNA ιοί ,θετικής πολικότητας, οι οποίοι περιβάλλονται από ένα μη ελυτροφόρο καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας (Rueckert, 1985). Οι Picorna ιοί έχουν ένα σχετικά μικρό γενετικό υλικό και επομένως μπορούν να μελετηθούν άμεσα σε μοριακό επίπεδο. Η δυνατότητα κρυσταλλοποίησης και η εφαρμογή της κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X οδήγησε στην μεγαλύτερη κατανόηση της δομής τους.



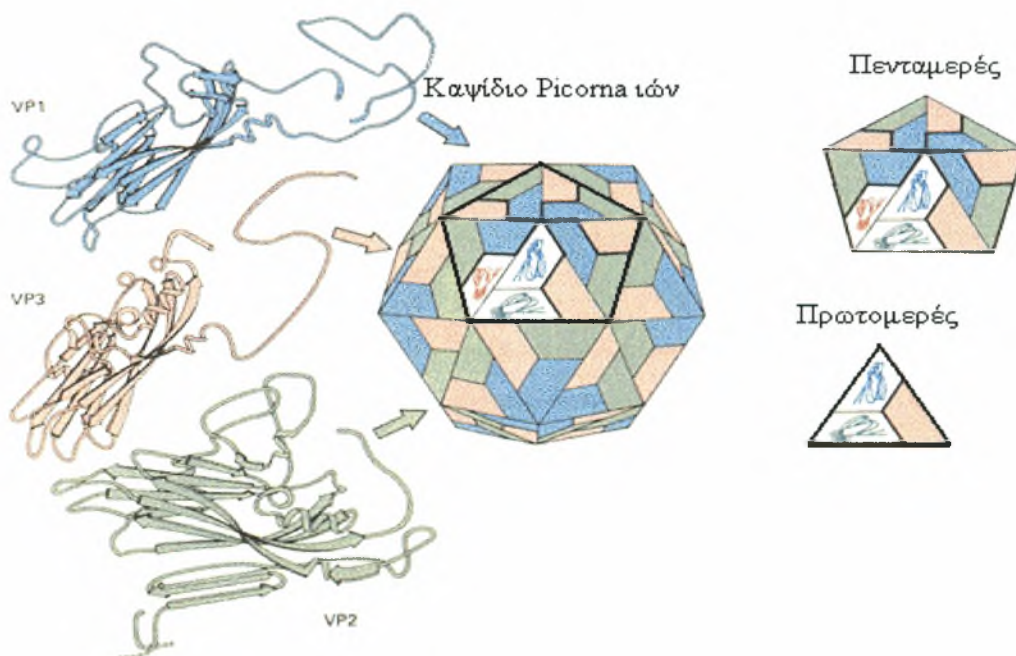
Εικόνα 1: Κρυσταλλογραφική δομή με ακτίνες X του Coxsackie A9 <http://www.rcsb.org/pdb/>.

1.2.1.1 Καψίδιο

Η θεμελιώδης δομή του καψιδίου είναι η ίδια για όλα τα μέλη της οικογένειας Picornaviridae. Οι εντεροϊοί δεν περιβάλλονται από λιπιδικό έλυτρο και το καψίδιο τους είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας, διαμέτρου 30 nm περίπου. Το καψίδιο τους αποτελείται από 60 αντίγραφα των πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4 (Rueckert R.R., 1985). Το ώριμο καψίδιο σχηματίζεται από τα πρωτομερή τα οποία αποτελούνται από αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης της VP0 η οποία διασπάται στις VP4 και VP2. Πέντε πρωτομερή συσσωματώνονται και

δίνουν ένα πενταμερές . Στη συνέχεια 12 πενταμερή σχηματίζουν το ώριμο καψίδιο (Σχήμα 1). Οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 αποτελούν την εξωτερική στοιβάδα του καψιδίου ενώ η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου. Το κάθε πενταμερές σταθεροποιείται από ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του καρβοξυτελικού και αμινικού άκρου των VP1 και VP3 μαζί με τη VP4. Τα γειτονικά πενταμερή συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τμημάτων των VP1 και VP3 και η σχετική αδυναμία αυτών των αλληλεπιδράσεων ίσως είναι σημαντική για την αποδιάταξη του ιϊκού καψιδίου και την απελευθέρωση του γενετικού υλικού.

Τέλος υπάρχει μια βαθειά «αυλάκωση» που βρίσκεται σε σταθερή ακτίνα γύρω από τον άξονα πενταπλούς συμμετρίας και στα πλάγια της βρίσκονται τμήματα των VP1 και VP3. Οι διαστάσεις της είναι βάθος 1.2 nm και πλάτος 1.5nm και έχει προταθεί ότι αυτή η αυλάκωση εμπλέκεται στην προσκόλληση του ιού σε υποδοχείς των κυττάρων- ξενιστών. Η πρόταση αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι η αύλακα είναι αρκετά μικρή ώστε να αποφύγει την προσκόλληση στο εσωτερικό της , των ογκωδών για αυτήν αντισωμάτων. Στο εσωτερικό της, όμως, βρίσκονται οι κατάλληλες περιοχές που μπορούν να ενωθούν με μικρά τμήματα συγκεκριμένων υποδοχέων , επιτρέποντας έτσι την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο- ξενιστή.



Σχήμα 1: Δομή των Picorna ιών.

1.2.1.1.1 Δομικές πρωτεΐνες

Οι δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου κωδικοποιούνται προς το 5' άκρο του γονιδιώματος των εντεροϊών (Σχήμα 2). Οι 3 από αυτές (VP1, VP2, VP3) έχουν παρόμοιο μέγεθος (200-300 αμινοξέα) σε διαφορετικούς picorna ιούς και σχηματίζουν το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου ενώ η VP4 είναι σημαντικά μικρότερη σε μήκος (68-85 αμινοξέα σε όλα τα γένη των picorna ιών εκτός από αυτό των ιών της ηπατίτιδας Α) και βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου (Stanway G., 1990). Οι καψιδικές πρωτεΐνες είναι ποικιλόμορφες και οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ορότυπων είναι ως επί το πλείστον συγκεντρωμένες σε συγκεκριμένα σημεία των τριών κυρίων πρωτεϊνών, συχνά σε υδρόφιλες περιοχές.

Ο πρωταρχικός ρόλος αυτών των πρωτεϊνών έγκειται στο να προσδίδουν στους εντεροϊούς τις αντιγονικές αλλά και άλλες ιδιότητές τους, όπως π.χ. ιδιότητες, που αφορούν στον τρόπο προσκόλλησης στους υποδοχείς των κυττάρων ξενιστών (Stanway, 1990). Πιστεύεται, ότι η VP4, μέσω λειτουργικής τροποποίησης, που περιλαμβάνει σύνδεση με το μυριστικό οξύ στο αμινοτελικό της άκρο (Chow et al., 1987) και δυνατότητα φωσφορυλίωσης από κινάσες (Ratka et al., 1989), συμβάλλει στην προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, στην αποδιάταξη του καψιδίου και στην απελευθέρωση του ιού στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Επίσης, η VP4 παίζει λειτουργικό ρόλο και κατά τη συγκρότηση του καψιδίου των νεοσχηματισθέντων ιών (Chow et al., 1987).

1.2.1.1.2 Λειτουργικές πρωτεΐνες

Οι λειτουργικές πρωτεΐνες των Picorna ιών κωδικοποιούνται από το 3' μισό του γονιδιώματός τους και είναι επτά, οι 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D, αν και σε μερικές περιπτώσεις, φαίνεται ότι και κάποια πρόδρομα μόρια αυτών είναι λειτουργικά. Έτσι, έχειδειχθεί ότι στους πολιοϊούς η πρόδρομος πρωτεΐνη 3 CD^{pro} συμμετέχει στην επεξεργασία των πρόδρομων μορίων των πρωτεϊνών του καψιδίου (Yrma-Wong et al., 1988a). Οι λειτουργικές πρωτεΐνες διαφόρων εντεροϊών είναι πιο συντηρημένες σε σχέση με τις δομικές πρωτεΐνες, γεγονός που εκφράζει, πιθανότατα, έλλειψη ανοσολογικής πίεσης και ανάγκη διατήρησης αμετάβλητων ορισμένων τμημάτων με σημαντική λειτουργία, όπως είναι τα ενεργά κέντρα των ενζύμων.

Οι λειτουργικές πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού RNA, σχετίζονται με διάφορες μεταβολές στον μεταβολικό κύκλο και στην μορφολογία του κυττάρου ξενιστή (Porter, 1993). Ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνονται η αναστολή της μεταγραφής και της μετάφρασης, που εξαρτάται από το σύμπλοκο cap (cap-dependent translation), η διαταραχή της επικοινωνίας μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος και η αναστολή - αναδιαμόρφωση του κυστιδιακού συστήματος μεταφοράς (vesicular transport system). Οι παραπάνω αλλαγές εξυπηρετούν την δημιουργία κατάλληλων συνθηκών για την πραγματοποίηση του ιϊκού πολλαπλασιασμού.

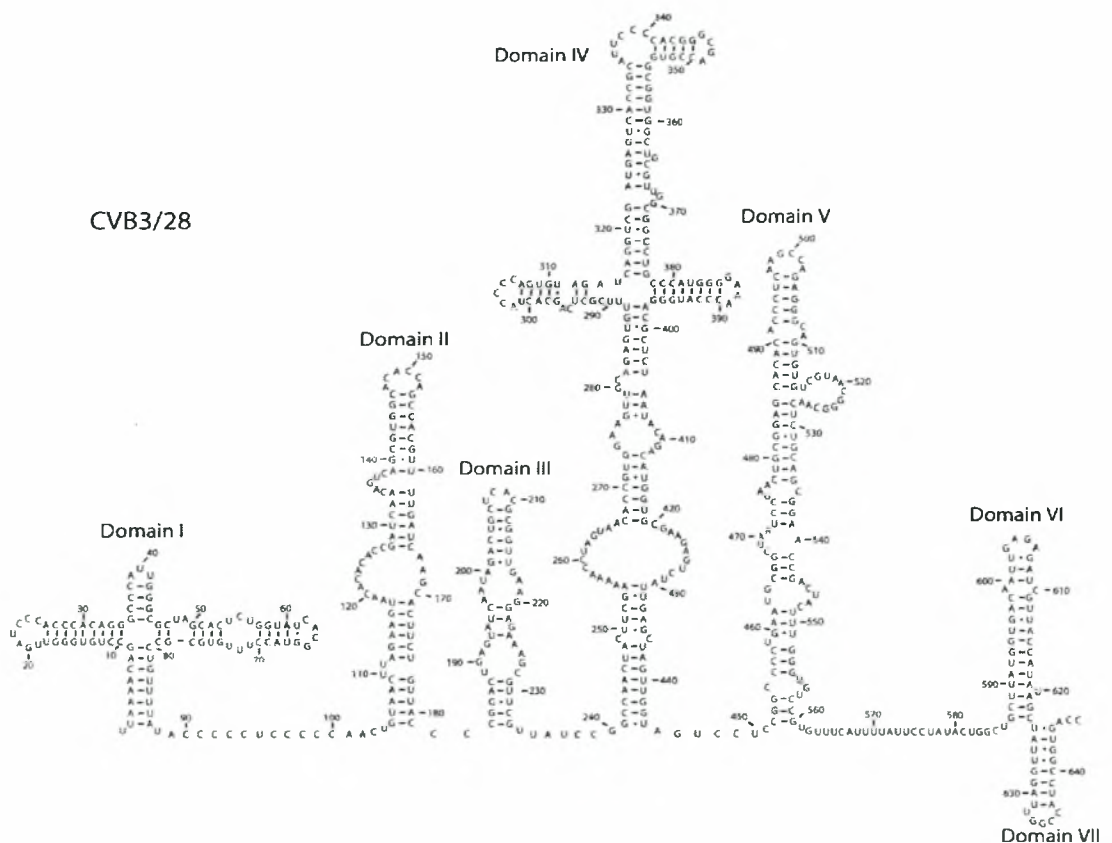
1.2.2 Το γένωμα των εντεροϊών

Το γένωμα των Picorna ιών, στους οποίους ανήκουν και οι εντεροϊοί, εσωκλείει ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA μήκους 7500 νουκλεοτιδίων. Αποτελείται από μια μακριά μη μεταφρασμένη ή μη κωδικοποιούσα περιοχή (UTR ή NCR) στο 5' τελικό άκρο, η οποία είναι απαραίτητη για τη μετάφραση και ενσωμάτωση του RNA στο ιϊκό σωματίδιο και η οποία ακολουθείται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) το οποίο περιέχει τις πληροφορίες για τις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Υπάρχει και μια μικρότερη στην 3' μη μεταφρασμένη περιοχή (50-100 nt) απαραίτητη για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας κατά τη διάρκεια της αντιγραφής . Όμως και τα δύο άκρα του γενώματος είναι τροποποιημένα, το 5' από μια μικρή βασική πρωτεΐνη την VPg (23 αμινοξέα) ενώ το 3' είναι πολυαδενυλιωμένο.

1.2.2.1 5' UTR

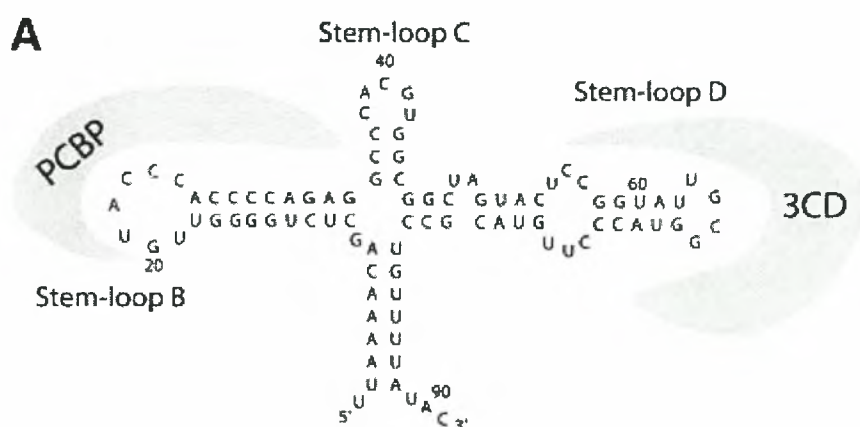
Η 5'-UTR των εντεροϊών και γενικά των picorna ιών είναι αρκετά μεγάλη σε μήκος σε σύγκριση με πολλές αντίστοιχες 5'-UTR κυττάρων ή άλλων ιών. Αποτελεί το 8 με 12 % του γενώματος των picorna ιών και μεταξύ κοντινών φυλογενετικά ιών παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία των βάσεων. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των εντεροϊών και όλων των picorna ιών είναι το ότι η σύνθεση της 5'-UTR αποτελείται από ένα σημαντικά υψηλότερο ποσοστό νουκλεοτιδίων με αζωτούχες βάσεις τη γουανίνη και κυτοσίνη σε σύγκριση με το υπόλοιπο γένωμα. Η μεγαλύτερη αυτή περιεκτικότητα στις αζωτούχες βάσεις, γουανίνη και κυτοσίνη προδίδει την ύπαρξη δευτεροταγούς δομής η οποία διαδραματίζει ένα σημαντικό

ρόλο στη λειτουργία της 5'-UTR. Η 5'-UTR των εντεροϊών περιέχει σημαντικά στοιχεία τα οποία συμμετέχουν στην αντιγραφή, μετάφραση και μολυσματικότητα των ιών αυτών. Το μέγεθός της είναι 750 νουκλεοτίδια εκ των οποίων τα πρώτα 88 σχηματίζουν μια δομή σχήματος τριφυλλιού ενώ τα άλλα 127 έως 608 νουκλεοτίδια αναδιπλώνονται σχηματίζοντας ένα στοιχείο IRES (Internal Ribosome Entry) το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μετάφραση του ιού όπως και για τη μολυσματικότητα του. Συνδυάζοντας τις βιοχημικές μελέτες, την αρχή ελαχίστης ενέργειας και συγκρίνοντας με άλλες αναλύσεις αλληλουχιών, μπορούν να προκύψουν μοντέλα που να παρουσιάζουν τον τρόπο αναδίπλωσης της 5' μη κωδικής περιοχής (Skinner et al., 1989). Το μοντέλο για τον CBV3 (Εικόνα 2) παρουσιάζει επτά δομικές περιοχές (domain I-VII) που χαρακτηρίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων (Zell et al., 1997). Μεταξύ αυτών των περιοχών υπάρχουν συνδετικά τμήματα που ποικίλουν σε μήκος, από 2 μέχρι 25 νουκλεοτίδια. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι δομικές περιοχές II μέχρι VI αποτελούν το στοιχείο IRES των εντεροϊών, ενώ οι ελάχιστες απαιτήσεις για τη λειτουργία του στοιχείου αυτού είναι οι δομικές περιοχές II, IV και V (Haller et al., 1993)



Εικόνα 2: Δευτεροταγής δομή της 5'-NTR του CBV3.

Η δομική περιοχή I 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). Αυτή η δομή είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των εντεροϊών και των ρινοϊών, ενώ περιέχει τέσσερις περιοχές: τις A, B, C, και D (εικόνα 3). Στην περιοχή B συνδέονται οι κυτταρικές πρωτεΐνες PCBP (poly(rc)-binding proteins), ενώ η περιοχή D αναγνωρίζεται από την ιϊκή πρωτεΐνη 3C που είναι μια πρωτεάση ή από την πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD. Το σύμπλοκο μεταξύ του 5'-άκρου-PCBP-3CD θεωρείται ότι περιλαμβάνει έναν διακόπτη για το αν το ιϊκό αυτό RNA θα χρησιμοποιηθεί σαν mRNA κατά τη μεταγραφή ή αν θα χρησιμοποιηθεί για την αντιγραφή του ιού.



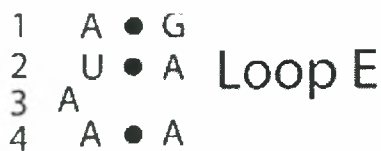
Εικόνα 3: Μοντέλο αναδίπλωσης της δομικής περιοχής I του εντεροϊού CBV3

Ανάλογα με τη θέση του κωδικονίου έναρξης σε σχέση με τα στοιχεία IRES (Internal Ribosome Entry Site) τα στοιχεία αυτά μπορούν να διαχωριστούν σε τρία είδη: στο είδος I που περιλαμβάνει τους εντεροϊούς και ρινοϊούς, στο είδος II που περιλαμβάνει τους καρδιο-ιούς και αφθοϊούς και το είδος III που περιλαμβάνει τον ιό της ηπατίτιδας A (Sunnie et al., 2003). Τα στοιχεία IRES τύπου II και III περιέχουν το κωδικόνιο έναρξης (AUG), ενώ για τη μετάφραση του RNA των ιών που περιέχουν στοιχείο IRES τύπου I τα ριβοσώματα χρησιμοποιούν ένα κωδικόνιο έναρξης που βρίσκεται σε απόσταση 30-150 νουκλεοτίδια μετά από το στοιχείο IRES. Γι' αυτό το λόγο η έναρξη της μεταγραφής στους ιούς που περιέχουν στοιχείο IRES τύπου I περιλαμβάνει σύνδεση της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας στο στοιχείο IRES και σάρωσης μέχρι να αναγνωριστεί το κωδικόνιο έναρξης.

Για τη σωστή λειτουργία του στοιχείου IRES, έχει βρεθεί ότι χρησιμοποιούνται εκτός από τις δομικές περιοχές II μέχρι VI και τα συνδετικά τμήματα μεταξύ των δομικών περιοχών V-VI (Bailey et al., 2007). Το τμήμα που συνδέει τις δομικές περιοχές I και II, είναι πλούσιο σε πυριμιδίνες και παράλληλα περιέχει αρκετά συντηρημένα νουκλεοτίδια, με αποτέλεσμα να υποπτευόμαστε ότι αυτή η περιοχή συμμετέχει σε κάποιου είδους αλληλεπιδράσεις.

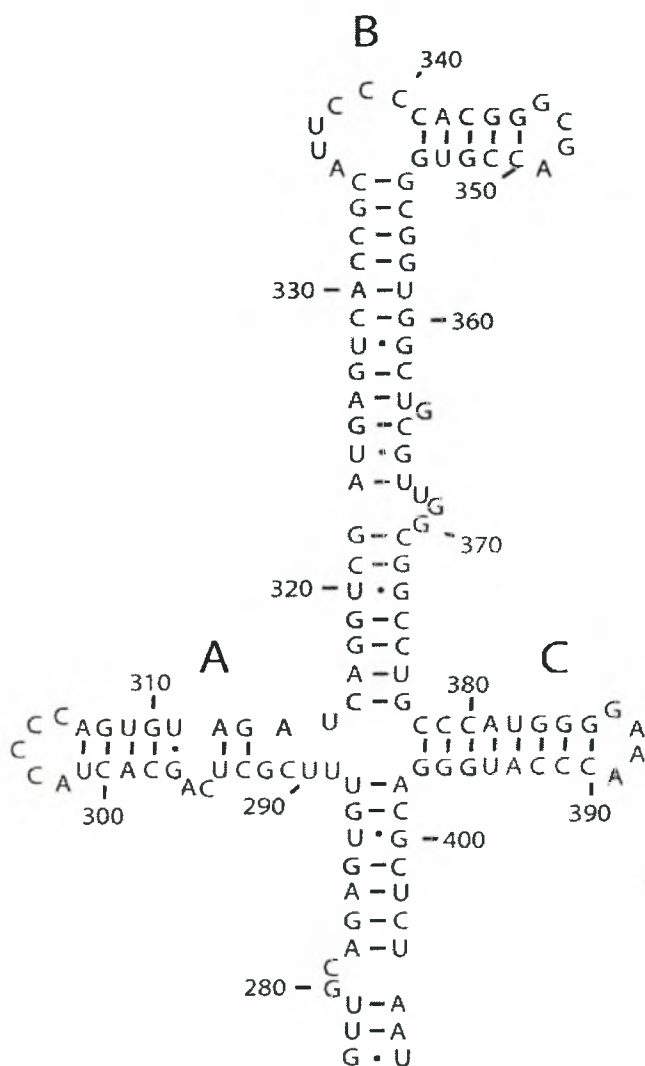
Τα νουκλεοτίδια στη βάση της δομής II (100-130), πιθανόν να συνδέονται με την πολυπυριμιδική περιοχή στο 3'-άκρο του IRES (δηλαδή στην περιοχή μεταξύ των δομών V και VI) και να μην σχηματίζουν τη δομή έλικας που φαίνεται στη δευτεροταγή δομή. Αυτή η υπόθεση φέρνει κοντά τις δομές II και V και στηρίζεται σε πειραματικά δεδομένα που περιγράφουν τις δομές αυτές ως πολύ σημαντικές για την μολυσματικότητα των ιών.

Η δομική περιοχή III είναι σχετικά πολυμορφική μεταξύ των IRES τύπου I και πιθανόν σε αυτή την περιοχή να οφείλεται η βιολογική διαφορά των ιών με IRES τύπου I (Bailey et al., 2007). Περιέχει τουλάχιστον ένα μοτίβο loop E και σε πολλές περιπτώσεις υπάρχουν δύο μοτίβα αυτού του είδους. Το μοτίβο loop E (Εικόνα 4) είναι ένα ελικοειδές στοιχείο που αποτελείται από τρία μη κανονικά ζευγαρώματα βάσεων, οι οποίες περικλείουν μια αζευγάρωτη πουρίνη. Αυτό το μοτίβο είχε βρεθεί αρχικά στην loop E περιοχή του 5S RNA και από τότε έχει εντοπιστεί σε πολλά μόρια RNA, όπου περιέχει ένα στοιχείο αναγνώρισης για την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών και RNA. Τα ζεύγη βάσεων που σχηματίζονται είναι διαφορετικά από αυτά που πρότειναν οι Watson και Crick με αποτέλεσμα, σε αυτό το μοτίβο να σχηματίζεται μια χαρακτηριστική τεταρτοταγής δομή που περιέχει ένα σημαντικό στοιχείο αναγνώρισης (recognition feature) γνωστό ως S στροφή (S turn). Στα rRNA, το μοτίβο loop E παρέχει μια βασική δομή για σύνθετες αλληλεπιδράσεις με μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεΐνες που φέρουν δακτύλους Zn. Η loop E δομή στην δομική περιοχή III των εντεροϊών στην 5'-NTR πιθανόν να παίζει κάποιον παρόμοιο ρόλο.



Εικόνα 4: το μοτίβο Loop E (Bailey et al., 2007)

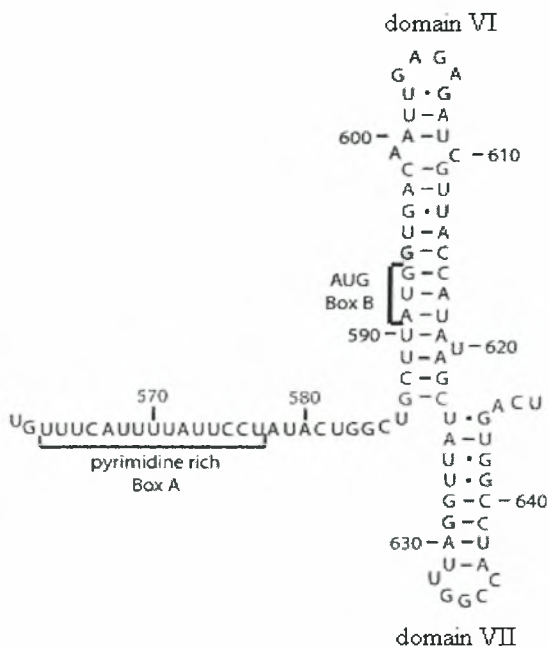
Τρία στοιχεία στην δομική περιοχή IV: η θηλιά που είναι πλούσια σε κυτοσίνη στον βρόγχο A, το εξόγκωμα που δημιουργείται στον βρόγχο B και το εξόγκωμα στην θέση 370, αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη PCBP (Gamarnik et al., 2000). Αυτή είναι μια βασική αλληλεπίδραση στο στοιχείο IRES για τη ρύθμιση αν θα πραγματοποιηθεί αντιγραφή ή μετάφραση.



Εικόνα 5: Δομική περιοχή IV της 5'-NTR του εντεροϊού CBV3 (Bailey et al., 2007)

Στη δομική περιοχή V έχει δοθεί πολύ προσοχή λόγω του ότι σε αυτή την περιοχή οφείλεται η εξασθένιση των εμβολιακών στελεχών των πολιοϊών. Η δομή που υπάρχει κοντά στη θέση 520 είναι συντηρημένη και από αυτήν εξαρτάται η μολυσματικότητα των πολιοϊών ενώ περιέχει και δύο μοτίβα GNRA. Τα μοτίβα αυτά περιλαμβάνουν δομικά στοιχεία τα οποία οργανώνουν τη δομή του RNA, ενώ είναι γνωστό ότι κρατάνε αυτή τη χαρακτηριστική δομή ακόμη και αν βρίσκονται σε μεγαλύτερες θηλιές (Bhattacharyya et al., 2006).

Τέλος το συνδεδετικό τμήμα μεταξύ των περιοχών V και VI περιλαμβάνει περιοχές οι οποίες είναι σημαντικές για την έναρξη της μετάφρασης. Μια σημαντική περιοχή (Box A), είναι μια εκτεταμένη αλληλουχία πλούσια σε πυριμιδίνες, η οποία είναι συμπληρωματική με το 18S rRNA και εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις τύπου Shine-Dalgarno (Yang et al., 2003). Επίσης έχει προταθεί ότι αυτή η πλούσια σε πυριμιδίνες περιοχή πιθανόν να αλληλεπιδρά με τα νουκλεοτίδια της δομικής περιοχής II, φέρνοντας κοντά, με αυτόν τον τρόπο τις δομικές περιοχές II και V (Bailey et al., 2007). Η δεύτερη είναι το κωδικόνιο έναρξης AUG (Box B), το οποίο υπολογίζεται να είναι μέρος μιας δομής στη δομική περιοχή VI.



Εικόνα 6: Συνδεδετική περιοχή μεταξύ της δομικής περιοχής V και VI και η δομική περιοχή VI της 5'-NTR του CBV3 (Bailey et al., 2007)

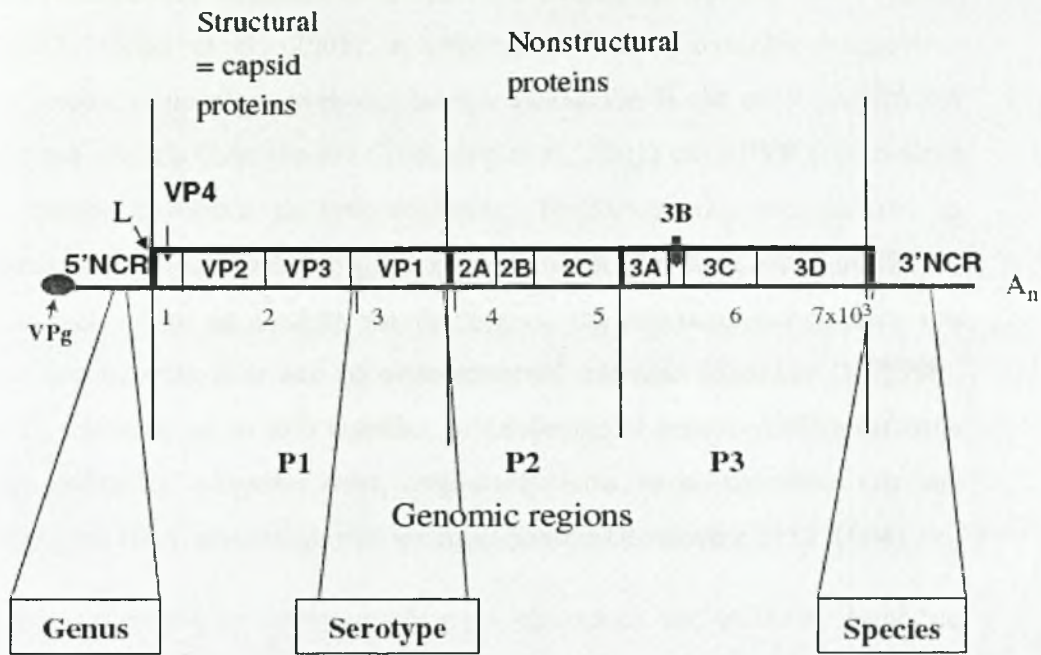
1.2.2.2 ORF

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) είναι μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη η οποία διασπάται αυτοκαταλυτικά από δύο κύριες ιϊκές πρωτεΐνάσες. Αυτές οι πρωτεΐνάσες είναι η 2Α_{pro} η οποία κόβει μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου της VP1 και του δικού της αμινοτελικού άκρου, ξεχωρίζοντας έτσι τις δομικές από τις μη δομικές πρωτεΐνες και την πρωτεάση 3C ή την πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD. Οι τέσσερις καψιδιακές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4 κωδικοποιούνται προς το 5'- άκρο του ORF. Τρεις από αυτές τις πρωτεΐνες (VP1, VP2, VP3) έχουν παρόμοιο μέγεθος σε διαφορετικούς ρινοϊούς, ενώ η VP4 είναι σημαντικά μικρότερη με μήκος 68-85 αμινοξέων σε όλα τα γένη των ρινοϊών εκτός από τον ιό της ηπατίτιδας Α, όπου έχει μήκος 17 αμινοξέων. Οι γενετικές πληροφορίες για την παραγωγή των μη δομικών πρωτεϊνών των εντεροϊών βρίσκονται προς το 3'- άκρο του γενετικού υλικού. Υπάρχουν 7 λειτουργικές πρωτεΐνες, οι 2Α, 2Β, 2C, 3Α, 3Β, 3C και 3D ενώ σε πολλές περιπτώσεις απαιτούνται πρόδρομα μόρια αυτών, όπως για παράδειγμα η πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD. Συγκρίσεις μεταξύ μη- δομικών πρωτεϊνών από διαφορετικούς ρινοϊούς δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές διατηρούνται φυλογενετικά περισσότερο από τις καψιδικές πρωτεΐνες.

1.2.2.3 3'UTR

Η 3'- μη κωδική περιοχή των εντεροϊών, αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιϊκού RNA. Το 3'-άκρο του γενώματος των ρινοϊών διαφέρει σε μήκος μεταξύ διαφορετικών εκπροσώπων της οικογένειας αυτής. Ποικίλλει από 40 νουκλεοτίδια στους ρινοϊούς έως 126 νουκλεοτίδια στους καρδιοϊούς.

Σήμερα, ολόκληρο το γονιδίωμα όλων των προτύπων ιών Εντεροϊών έχει προσδιοριστεί και διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο, μέσω των διεθνών τραπεζών δεδομένων, ενώ επιπρόσθετα, διατίθεται η πλήρης ή η μερική αλληλουχία πολλών κλινικών στελεχών.



Εικόνα 7: Το γονιδίωμα των εντεροϊών. Διακρίνονται από το 5' προς το 3' άκρο η 5' αμετάφραστη περιοχή (5' NCR), το δομικό (P1) και το λειτουργικό (P2& P3) γονιδίωμα και η 3' αμετάφραστη περιοχή (3' NCR), με την πολυ -A απόληξη (Baxter et al., 2006).

1.2.3 Υποδοχείς εντεροϊών

Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και γλυκολιπίδια. Πολλές φορές, οι ιοί εισέρχονται στο κύτταρο ξενιστή, μέσω της σύνδεσής τους σε κάποιο μόριο υποδοχέα, αλλά αποτυγχάνουν να ξεκινήσουν τον κύκλο ζωής τους (Evans et al., 1998). Επιτυχημένη μόλυνση προκύπτει μόνο όταν ένας υποδοχέας μπορεί να ξεκινήσει ολόκληρο τον κύκλο ζωής του ιού, από την αναγνώρισή του μέχρι την απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κυτταρόπλασμα. Ένα μόνο μόριο υποδοχέα μπορεί να συμμετέχει σε αυτή τη διαδικασία ή μπορεί να χρειάζονται και άλλα βοηθητικά μόρια για τα διάφορα στάδια.

Συνήθως, στους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στην σχηματιζόμενη αυλάκωση (Rossmann et al., 1985). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν παρόμοια δομή και περιέχουν μια σειρά από περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών. Πιο συγκεκριμένα οι υποδοχείς οι οποίοι έχουν δομές όμοιες των ανοσοσφαιρινών και χρησιμοποιούνται από τους εντεροϊούς είναι

οι : ICAM-I (Intracellular adhesion molecule-1), ο οποίος έχει βρεθεί ότι συνδέεται με τον CAV21 (Xiao et al., 2001), ο υποδοχέας CAR (Coxsackie-Adenovirus Receptor) ο οποίος συμμετέχει στην είσοδο των Coxsackie B ιών στον ξενιστή και στην έναρξη του κύκλου ζωής του ιού (Yongning et al., 2001) και ο PVR (Polio-virus receptor) ο οποίος συνδέεται με τους πολιοϊούς. Το βασικό πλεονέκτημα από τη χρήση της αυλάκωσης για τη σύνδεση του ιού στον υποδοχέα, είναι ότι με αυτόν τον τρόπο εξουδετερώνονται τα ογκώδη για το μέγεθος της αύλακας, αντισώματα του οργανισμού, ξεφεύγοντας έτσι από το ανοσοποιητικό σύστημα (Stanway G., 1990). Εκτός από τη σύνδεση με το ιϊκό καψίδιο, οι υποδοχείς οι οποίοι συνδέονται στην περιοχή της αύλακας, οδηγούν στην αναδιάταξη του ιϊκού καψιδίου και την απελευθέρωση του ιϊκού γενώματος στο κύτταρο ξενιστή (Rossmann M.G, 1994).

Υπάρχουν και υποδοχείς οι οποίοι συνδέονται εξωτερικά της αύλακας όπως για παράδειγμα ο DAF (decay-acceleration factor, cd55), ο οποίος αναγνωρίζει ορισμένους echo- και coxsackie B ιούς (Bergelson et al., 1994). Αυτοί οι υποδοχείς δεν έχουν περιοχές όμοιες με αυτές της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών και αντίθετα με τους υποδοχείς που συνδέονται στην περιοχή της αύλακας, δεν αποσταθεροποιούν το ιϊκό καψίδιο.

Τα διάφορα μόρια της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών που δρουν ως υποδοχείς για τους Picorna ιούς, είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες των οποίων η εξωτερική πλευρά περιέχει από δύο έως πέντε δομές όμοιες των ανοσοσφαιρινών.

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο και η απελευθέρωση του γενετικού υλικού ξεκινάει όταν ο κατάλληλος υποδοχέας συνδεθεί με τον αντίστοιχο ιό. Σε πολλές περιπτώσεις, οι υποδοχείς μετατρέπουν τα μολυσματικά καψίδια σε σωμάτια 'A', τα οποία έχουν χάσει την πρωτεΐνη VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 βρίσκεται εξωτερικά (Huang et al., 2000).

Μετά την πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς, το ιϊκό καψίδιο πρέπει να αποδομηθεί προκειμένου να απελευθερώσει το RNA το οποίο στη συνέχεια θα εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, όπου θα ακολουθήσει ο πολλαπλασιασμός του ιού. Για κάποιους picorna-ιούς, η αλληλεπίδραση με τον κυτταρικό υποδοχέα εξυπηρετεί μόνο τη συγκέντρωση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια. Η απελευθέρωση του γενώματος του ιού είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου

συνυποδοχέα. Για άλλους *picorna*-ιούς, ο κυτταρικός υποδοχέας επάγει την έναρξη δομικών αλλαγών προκειμένου να απελευθερωθεί το γένωμα του ιού.

1.2.4 Κύκλος ζωής των εντεροϊών

Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών αρχίζει με την προσκόλληση του καψιδίου στους κατάλληλους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή. Η προσκόλληση αυτή δίνει τα ερεθίσματα για αλλαγές στη χωροδιάταξη του καψιδίου, οδηγώντας στο σχηματισμό των σωματιδίων A (τα οποία προέρχονται από το καψίδιο έχοντας χάσει την πρωτεΐνη VP4). Το γενετικό υλικό των εντεροϊών δρα ως mRNA και η μετάφραση του οδηγεί στη δημιουργία της πολυπρωτεΐνης η οποία διασπάται πρωτεολυτικά δίνοντας τις δομικές και τις μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού. Μετά την μετάφραση του ιϊκού γενώματος ξεκινάει η αντιγραφή του. Το πρώτο στάδιο της αντιγραφής είναι η δημιουργία του αρνητικού κλώνου ο οποίος χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη σύνθεση του θετικού κλώνου. Στη συνέχεια ακολουθεί ο εγκλεισμός του γενετικού υλικού σε πρώιμη μορφή ιϊκού σωματιδίου το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3. Όταν πραγματοποιηθεί ο εγκλεισμός αυτός του γενώματος, η VP0 διασπάται στις VP2 και VP4 δίνοντας ένα ώριμο ιϊκό σωματίδιο. Τέλος λόγω της αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης από τη μόλυνση του ιού, το κύτταρο-ξενιστής λύεται, επιτρέποντας την απελευθέρωση των ιών.

1.2.4.1 Αντιγραφή

Η αντιγραφή του γενώματος αρχίζει πρώτα με τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και ξεκινάει όταν το RNA του ιού απελευθερωθεί από τα ριβοσώματα. Στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών τόσο του κυττάρου όσο και του ιού και ρυθμιστικά στοιχεία πάνω στο RNA τα οποία δρουν *in cis*.

Τα *cis*-δραστικά στοιχεία που ρυθμίζουν την αντιγραφή είναι:

- Η 3'NTR και η πολυαδενυλιωμένη ουρά
- Η δομή τριφυλλίου που βρίσκεται στο 5'άκρο της 5'NTR επηρεάζει τη σταθερότητα, τη μεταγραφή και την αντιγραφή των εντεροϊών.
- Μια δομή φουρκέτας, που βρίσκεται στην περιοχή 2C του γενώματος είναι απαραίτητη για τη σύνθεση της VPgpUpU η οποία χρησιμοποιείται στην αντιγραφή του κλώνου θετικής πολικότητας.

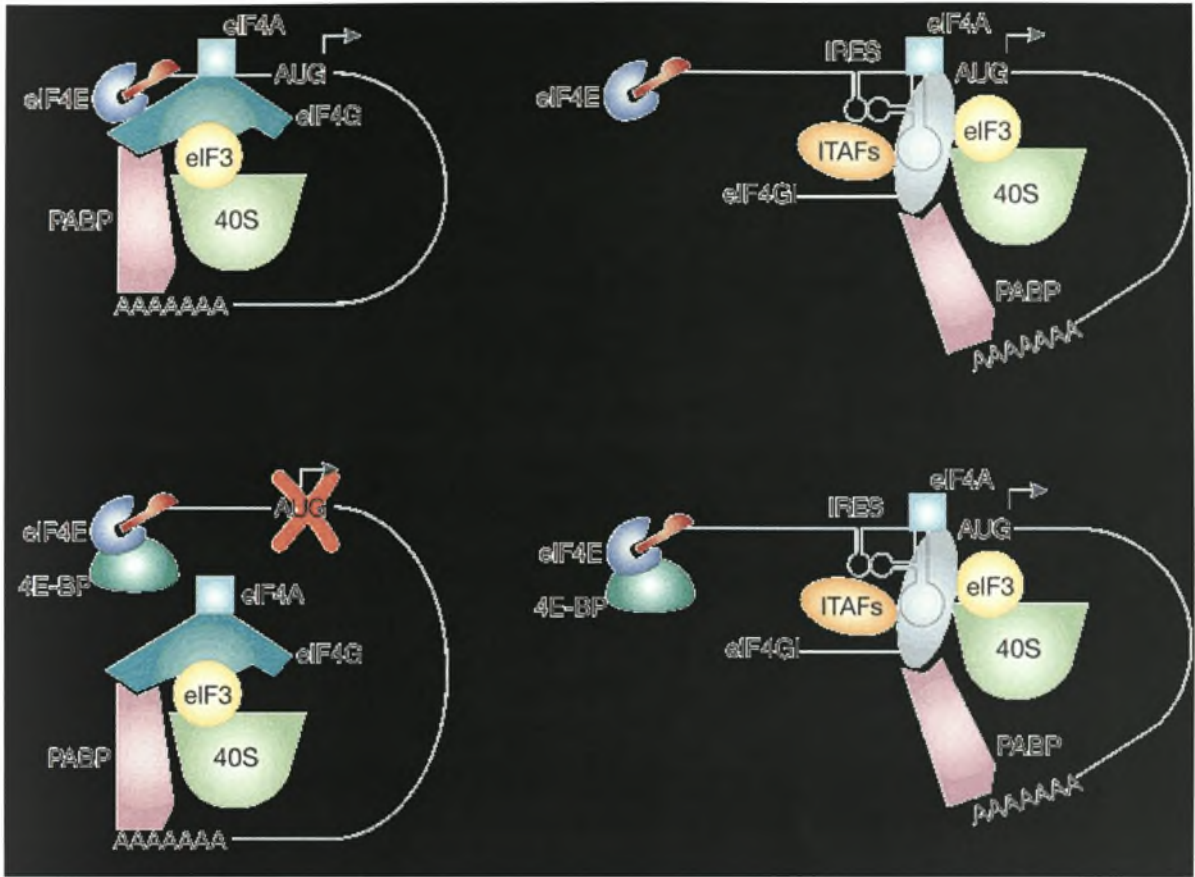
Ο σχηματισμός της VPg είναι ένα από τα πρώτα βήματα για την έναρξη της αντιγραφής και χρησιμοποιείται σαν εκκινητής από την ιϊκή πολυμεράση. Υπάρχουν δύο μοντέλα που περιγράφουν το σχηματισμό της ουριδιλιωμένης VPg. Κατά το πρώτο η VPg ουριδιλιώνεται στην πολυαδενυλιωμένη ουρά όπου και δρά σαν εκκινητής για την έναρξη της αντιγραφής του αρνητικού κλώνου. Κατά το δεύτερο μοντέλο η VPg ουριδιλιώνεται στη φουρκέτα *cre* (2C), με αποτέλεσμα να παράγονται αρκετά μόρια VPgpUpU τα οποία χρησιμοποιούνται ως εκκινητικά μόρια για την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας, αναγνωρίζοντας, τις δύο αδενίνες που βρίσκονται στο 3' άκρο του αρνητικής πολικότητας κλώνου (Sharma et al., 2005). Κατά την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος υπάρχει μια ασυμμετρία όσον αφορά την αντιγραφή του κλώνου θετικής πολικότητας σε σχέση με τον κλώνο αρνητικής πολικότητας. Η ύπαρξη των δύο αυτών διαφορετικών μηχανισμών για τη δημιουργία των εκκινητικών μορίων (ουριδιλίωση της VPg στην 3' πολυαδενυλιωμένη ουρά και στην φουρκέτα *cre*(2C)) μπορεί να εξηγήσει το λόγο για τον οποίο παρατηρείται απότομη αύξηση των κλώνων θετικής πολικότητας (Morasco et al., 2003).

1.2.4.2 Μετάφραση

Στη μετάφραση του ευκαρυωτικού mRNA εμπλέκεται ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το 43s προεναρκτήριο σύμπλοκο (Wells et al., 1998). Στη δομή αυτή αλληλεπιδρά το 5' άκρο, με την καλύπτρα του, με το πολυαδενυλιωμένο 3' άκρο. Στο ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο συμμετέχουν διάφοροι παράγοντες έναρξης της αντιγραφής. Πιο συγκεκριμένα συμμετέχει ο παράγοντας eIF4E, ο οποίος αλληλεπιδρά με το 5'-κάλυμα του mRNA και με τον παράγοντα eIF4G. Στη συνέχεια ο παράγοντας eIF4G συνδέεται με την πρωτεΐνη PABP (Poly(A)-BindingProtein) (Gallie D.G., 1991) καθώς και με μια ελικάση, τον παράγοντα eIF4A, και μέσω του παράγοντα eIF3 με τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος έχοντας ένα ρόλο «πρωτεΐνης σκαλωσιάς» (“Scaffold protein”). Η έναρξη της μετάφρασης του ιϊκού γενώματος σηματοδοτεί και μια σειρά αλλαγών μέσα στο κύτταρο του ξενιστή όπως η τροποποίηση των κανονικών μεταφραστικών παραγόντων. Μετά από μόλυνση με εντεροϊό παρατηρείται κόψιμο των παραγόντων eIF4GI και eIF4GII, παράγοντας έτσι ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυτελικό τμήμα. Από τα δύο αυτά τμήματα, το ένα αλληλεπιδρά με τον παράγοντα eIF4E και συνεπώς με το 5'-κάλυμα, ενώ το άλλο

τιμήμα αλληλεπιδρά με την ελικάση (eIF4A), την PABP και τον παράγοντα eIF3 μέσω του οποίου γίνεται η σύνδεση με τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (Camphear et al., 1995). Σε αντίθεση με τον παράγοντα eIF4G, η PABP κόβεται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Οι αλλαγές αυτές στο μολυσμένο κύτταρο εμποδίζουν την εξαρτώμενη, από το 5'-κάλυμα, μετάφραση του mRNA ευνοώντας τη μετάφραση μέσω των στοιχείων IRES.

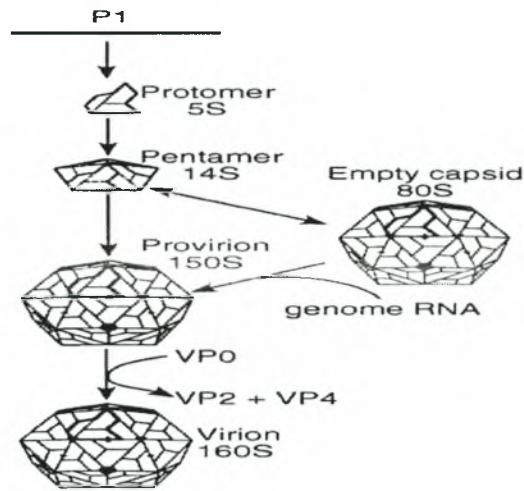
Κατά τη μετάφραση του γενώματος των εντεροϊών, ο παράγοντας eIF4G συνδέεται στο στοιχείο IRES μέσω του παράγοντα eIF4B, οδηγώντας έτσι το ιϊκό mRNA στο ριβόσωμα (Ochs et al., 1999). Η σύνδεση του παράγοντα eIF4B στο στοιχείο IRES πραγματοποιείται στη δομική περιοχή V ενώ οι αλληλουχίες της δομικής περιοχής VI συμμετέχουν στη σύνδεση αυτή χωρίς όμως να είναι απολύτως απαραίτητες για τη μετάφραση το ιϊκού γενώματος. Εκτός από τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης υπάρχουν και άλλοι παράγοντες οι οποίοι συνδέονται στο στοιχείο IRES και προάγουν τη μετάφραση ή διαμορφώνουν την ισορροπία μεταξύ της μετάφρασης και της αντιγραφής του ιϊκού RNA. Τέτοιοι παράγοντες είναι η πρωτεΐνη των 57 KDa η οποία προσδένεται στην πολυπυριμιδική περιοχή PTB (Polypyrimidine Tract-Binding protein), η πρωτεΐνη La των 52 KDa (La ayto antigen) και η poly(rC) πρωτεΐνη PCBP (poly(rC) Binding Protein) (Ochs et al., 2002). Τέλος το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης βρίσκεται σε απόσταση 30-150 νουκλεοτίδια μετά από το στοιχείο IRES και αναγνωρίζεται μέσω της διαδικασίας της σάρωσης.



Εικόνα 8 : Μοντέλο της μετάφρασης του γενώματος των εντεροϊών.

1.2.4.3 Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων

Ο σχηματισμός των νέων ιικών σωματιδίων ή καψιδίωση φαίνεται πως είναι συζευγμένη με την αντιγραφή του RNA εφόσον και τα δύο γεγονότα συμβαίνουν στην επιφάνεια μεμβρανικών κυστιδίων που επάγονται από τον ιό και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (Ansardi et al. 1996). Στο πρώτο στάδιο της καψιδίωσης, το μυριστιλιωμένο P1 πολυπεπίδιο τεμαχίζεται από την 3CD^{P10} και δίνει τις VP0, VP3 και VP1 οι οποίες τότε συσσωματώνονται ώστε να σχηματίσουν ένα πρωτομερές. Πέντε πρωτομερή συνδυάζονται ώστε να σχηματίσουν ένα πενταμερές και τελικά 12 πενταμερή συνδέονται μεταξύ τους και δίνουν το προκαψίδιο (Pfister et al. 1999). Υπάρχουν δύο μοντέλα όσον αφορά το σχηματισμό του ιικού σωματιδίου: i) το ιικό RNA εισέρχεται στο προκαψίδιο μέσω ενός πόρου, ii) τα πενταμερή συσσωματώνονται γύρω από το ιικό RNA. Κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου της καψιδίωσης, η VP0 τεμαχίζεται στις VP2 και VP4 (πιθανόν αυτοκαταλυτικά) δίνοντας έτσι το ώριμο ιικό σωματίδιο (Basavappa et al. 1994).



Εικόνα 9: Μορφογένεση των picorna-ίων. Ανατύπωση από Melnick, 1996

1.3 Εξέλιξη των εντεροϊών

Κατά την εξέλιξη τους οι εντεροϊοί παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και προσαρμοστικότητα, λόγω των υψηλών ρυθμών ανάπτυξής τους. Αυτή η ποικιλομορφία οφείλεται σε δυο μηχανισμούς, τη μεταλλαξιγένεση και τον γενετικό ανασυνδιασμό (Domingo E. and Holland J.J. 1997).

A. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ: Η δημιουργία μεγάλου αριθμού σημειακών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό των εντεροϊών οφείλεται στο υψηλό ποσοστό λάθους της ιϊκής RNA πολυμεράσης, λόγω της απουσίας μηχανισμού ελέγχου της πιστότητας της αντιγραφής (μηχανισμός proof-reading). Η συχνότητα λάθους ανά κύκλο αντιγραφής υπολογίστηκε περίπου 10^{-4} έως 10^{-5} ανά βάση (Ward et al., 1992), ενώ η αντίστοιχη πιθανότητα λάθους για τις DNA πολυμεράσες είναι μεταξύ 10^{-8} και 10^{-11} (Parvin et al., 1986). Η μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων οδηγεί στην δημιουργία μεγάλων πληθυσμών ιών με διαφορετικούς γονοτύπους και στην ανάγκη εισαγωγής του όρου quasi-species (σχεδόν είδος). Ένα άγριο στέλεχος ορίζεται σαν quasi-species όταν ο πληθυσμός του δεν έχει μια μοναδική αλληλουχία αλλά έχει μια κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων (Domingo et al., 1985). Υπάρχουν κυρίως δυο μηχανισμοί για την επικράτηση των μεταλλάξεων, η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή (Gavrillin et

al., 2000). Μια μετάλλαξη μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει τα επίπεδα της ικανότητας του ιού για τον ιδιαίτερο οικολογικό του θώκο ή να τον αφήσει ανεπηρέαστο.

Οι μεταλλάξεις κυρίως εντοπίζονται στις κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3, καθώς και στη 5'-μη κωδική περιοχή. Αυτές οι μεταλλάξεις πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνες για την μολυσματικότητα και τη μεταστροφή των εμβολιακών στελεχών σε παθογόνους ιούς (Georgescu et al., 1997; Friedrich, 2000; Martin and Minor, 2002). Από τις δομικές πρωτεΐνες, η VP1 είναι αυτή που εμφανίζει τις περισσότερες μεταλλάξεις. Αυτό μάλλον συμβαίνει, διότι το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζει τις περισσότερες αντιγονικές θέσεις του ιού, έναντι των οποίων εξασκείται η ανοσολογική πίεση του ξενιστή.

B. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΟΣ : Ο γενετικός ανασυνδυασμός είναι το κυριότερο εργαλείο του εξελικτικού μηχανισμού γενικά όλων των ιών. Με τον ανασυνδυασμό οι ιοί επιτυγχάνουν να αποκτήσουν νέα χαρακτηριστικά (από τους προγονικούς τους δότες), που τους προσδίδουν εξελικτικό πλεονέκτημα. Οι ανασυνδυασμοί κυρίως παρουσιάζονται στις περιοχές των λειτουργικών πρωτεϊνών, και συγκεκριμένα πιο συχνά στις κωδικές περιοχές 2C και 3D (Georgoroulou, A. and Markoulatos, P., 2001).

1.4 Εντεροϊοί στο υδάτινο περιβάλλον

Η πιο μελετημένη ομάδα ιών εντερικής προέλευσης είναι οι εντεροϊοί (που περιλαμβάνουν τους Polio-ιούς 1-2-3, τους coxsackie-ιούς A-B και τους εντεροϊούς 68-71). Άλλοι ιοί εντερικής προέλευσης είναι ο ιός της ηπατίτιδας A, οι Ρεο ιοί, οι Αδενοϊοί, οι Ρότα-ιοί, οι Άστρ-ιοί και οι Νόρο-ιοί οι οποίοι υπάρχουν στα κόπρανα, έχουν ανιχνευθεί στα λύματα και είναι υπεύθυνοι για πάρα πολλές ασθένειες στον άνθρωπο, όπως και οι εντεροϊοί. Κάθε χρόνο 5-18 εκατομμύρια άνθρωποι στον κόσμο πάσχουν από γαστρεντερίτιδα, ενώ πάνω από ένα εκατομμύριο παιδιά πεθαίνουν από διάρροια οφειλόμενη σε εντερικούς ιούς.

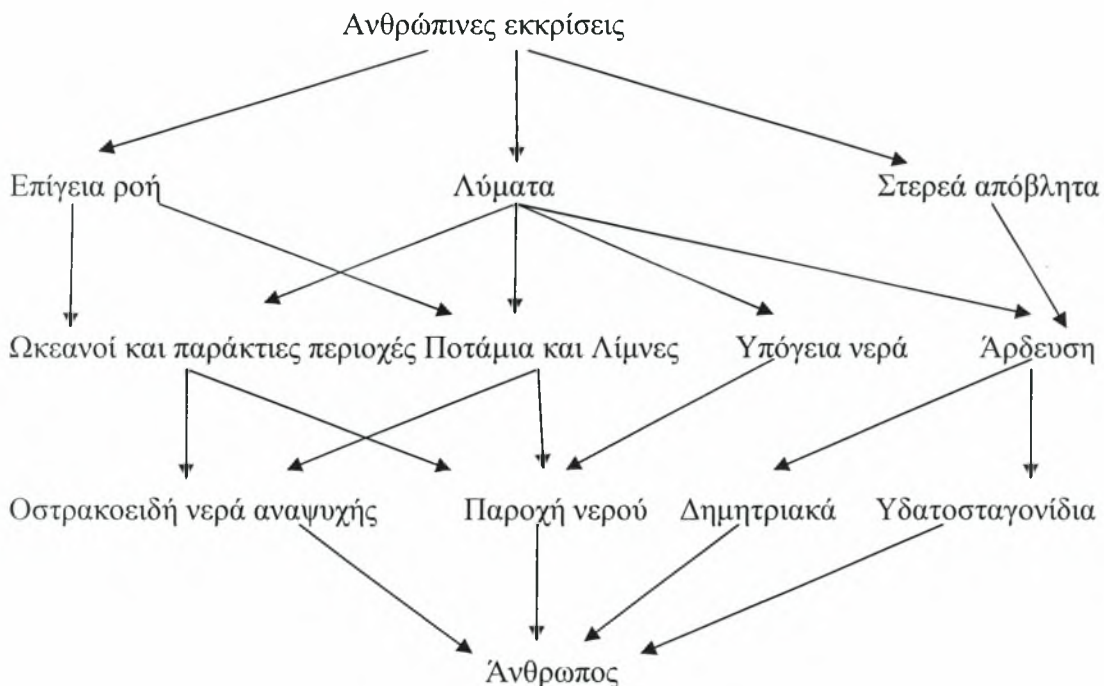
Οι ιοί εντερικής προέλευσης που περιέχονται στις ανθρώπινες εκκρίσεις ακολουθούν διάφορες πορείες στο περιβάλλον (Σχήμα 2). Υδατογενής μόλυνση μπορεί να προκληθεί αν μεγάλες ποσότητες μολυσμένων λυμάτων με εντερικούς ιούς αναμιχθεί με νερό το οποίο στη συνέχεια, είτε χωρίς επεξεργασία καταλήγει στη θάλασσα, είτε είναι ανεπαρκώς επεξεργασμένο και χρησιμοποιείται για άρδευση ή πόση.

Η υδατογενής μετάδοση των εντεροϊών είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για την ευρεία εξάπλωση ασθενειών σε μεγάλο τμήμα του πληθυσμού. Οι εντεροϊοί μπορούν να εισέλθουν στο υδάτινο περιβάλλον μέσω των κοπράνων μολυσμένων ατόμων και εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της στοματικής οδού όπου πολλαπλασιάζονται και τελικά αποβάλλονται κυρίως από τα κόπρανα σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Οι εντεροϊοί μπορούν να επιβιώσουν στο νερό ή τα λύματα ακόμη και μετά από επεξεργασία των λυμάτων. Εκείνοι οι εντεροϊοί που περιέχονται στις ανθρώπινες εκκρίσεις ακολουθούν διάφορες πορείες στο περιβάλλον. Ο άνθρωπος είναι δυνατόν να έρθει σε επαφή με τους εντεροϊούς ως εξής :

I. Με την κατανάλωση πόσιμου νερού που προέρχεται από επιφανειακά και υπόγεια ύδατα που περιέχουν προσμίξεις κοπράνων ή ανεπαρκώς επεξεργασμένα λύματα.

II. Με την κολύμβηση σε νερά όπου διοχετεύονται μη επεξεργασμένα λύματα

III. Με την κατανάλωση οστρακοειδών που καλλιεργούνται σε μολυσμένα νερά



Σχήμα 2: Πορεία των ιών εντερικής προέλευσης στο υδάτινο περιβάλλον με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο.

1.4.1 Ιοί εντερικής προέλευσης στα λύματα

Στα κόπρανα έχει βρεθεί ότι περιέχονται πάνω από 140 διαφορετικά είδη ιών εντερικής προέλευσης . Σε ένα γραμμάριο κοπράνων ασθενούς μπορούν να ανιχνευθούν 10^6 ιικά σωματίδια, ενώ και στα λύματα έχουν μετρηθεί συγκεντρώσεις της τάξης των 500.000 μολυσματικών μονάδων\λίτρο. Οι εντεροϊοί περιέχονται στα κόπρανα σε συγκέντρωση 10^6 - 10^8 ιικών σωματιδίων\γραμμάριο κοπράνων και αποβάλλονται από τον ασθενή για 7 περίπου εβδομάδες . Οι Ρότα-ιοί εκκρίνονται σε ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (10^{10} - 10^{12} ιικών σωματιδίων\γραμμάριο κοπράνων) ενώ οι Νόρο-ιοί σε μικρότερες συγκεντρώσεις (10^4 - 10^6 ιικά σωματίδια\γραμμάριο κοπράνων). Ο αριθμός εντεροϊών που υπάρχουν στα κόπρανα φορέων και αποβάλλονται στα λύματα κυμαίνεται από 10³-10⁶ μολυσματικές μονάδες\λίτρο. Η συχνότητα και ο αριθμός των ιικών σωματιδίων που μπορούν να ανιχνευθούν στα λύματα εξαρτάται από τη συχνότητα των μολύνσεων, τον αριθμό των φορέων στην κοινότητα, τον αριθμό των εμβολιασμένων στον εξασθενημένο ιό της πολυομυελίτιδας (OPV) καθώς και την ευαισθησία της μεθόδου απομόνωσης και ανίχνευσης .

Στις εύκρατες περιοχές η απομόνωση ιών εντερικής προέλευσης από τα λύματα παρατηρείται προς το τέλος της άνοιξης και τις αρχές του φθινοπώρου. Η παρουσία των ιών ποικίλλει ανάλογα με την εποχή του έτους . Για παράδειγμα οι αδενοϊοί , οι άστρο-ιοί και οι ρότα-ιοί απομονώνονται συχνότερα κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου, του χειμώνα και στην αρχή της άνοιξης ενώ οι εντεροϊοί το καλοκαίρι.

Μελέτες που έγιναν σε δείγματα λυμάτων βρέθηκε ότι το 79% των δειγμάτων περιείχε παθογόνους ιούς για τον άνθρωπο και το 78% από αυτούς ήταν Reo-ιοί , ενώ το 22% ήταν εντεροϊοί. Σε πιο πρόσφατες μελέτες διαπιστώθηκε ότι στα λύματα είναι συχνή η παρουσία κυρίως αδενοϊών , εντεροϊών , Norwalk-ιών και του ιού της ηπατίτιδας A σε ένα ποσοστό 10-100%.

Επίσης έχει μελετηθεί και η γεωγραφική κατανομή που εμφανίζουν τα διάφορα είδη ιών εντερικής προέλευσης. Βέβαια η συχνότητα εμφάνισης των ιών εντερικής προέλευσης αυξάνεται στις υποανάπτυκτες χώρες λόγω της έλλειψης των συστημάτων ύδρευσης και αποχέτευσης , τις κατάλληλες συνθήκες υγιεινής και του υπερπληθυσμού. Έπειτα όμως από πρόσφατες έρευνες που αναφέρουν την παρουσία

του ιού της ηπατίτιδας Α και στις χώρες της Ευρώπης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει περιορισμός στην ύπαρξη ιών εντερικής προέλευσης ακόμη και στις αναπτυγμένες χώρες. Αυτό το γεγονός συμβαίνει λόγω της μετακίνησης των πληθυσμών κυρίως από τις υποανάπτυκτες χώρες προς τις αναπτυγμένες.

Η ύπαρξη ιών εντερικής προέλευσης στα λύματα απαιτεί την κατάλληλη επεξεργασία και εξουδετέρωσή τους με τεχνικές του βιολογικού καθαρισμού ώστε να αποφευχθούν υδατογενείς επιδημίες. Η ανεπαρκής επεξεργασία και απολύμανση των λυμάτων οδηγεί σε λοιμώξεις οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε α) χρήση μολυσμένων μη επεξεργασμένων επιφανειακών υδάτων β) χρήση μη επεξεργασμένων υπόγειων υδάτων και γ) κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού.

1.4.1.1 Λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων μη επεξεργασμένων επιφανειακών υδάτων.

Τα επιφανειακά νερά των ποταμών και των λιμνών που δέχονται λύματα είναι πιθανόν να περιέχουν ιούς εντερικής προέλευσης οι οποίοι όμως δεν είναι δυνατόν να είναι πάντα ανιχνεύσιμοι. Η μη δυνατή ανίχνευσή τους μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι, είτε βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις είτε είναι αναμεμιγμένοι με διαλυμένα συστατικά και επικάθονται στο ίζημα. Ο αριθμός των ιών εντερικής προέλευσης που μπορεί να απομονωθεί από τα επιφανειακά νερά ποικίλλει εποχιακά και εξαρτάται από τον όγκο των διοχετευόμενων λυμάτων και από τις κλιματολογικές συνθήκες. Η ύπαρξη ιών εντερικής προέλευσης στα επιφανειακά νερά έχει τεκμηριωθεί από μελέτες του Koorman (1982) και του Pavlov και των συνεργατών του (2005).

1.4.1.2 Λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων μη επεξεργασμένων υπόγειων υδάτων.

Οι ιοί στα υπόγεια νερά μπορούν να προέρχονται είτε από την επίγεια διάθεση της λάσπης των λυμάτων ή από τη βαθειά εναποθήκευσή τους. Οι ιοί ταξιδεύουν σε μεγάλη απόσταση στο χώμα και τα υπόγεια νερά και λόγω του μικρού τους μεγέθους (23-38 nm) μεταφέρονται ταχύτερα σε σχέση με τα βακτήρια και τα πρωτόζωα. Στις Ηνωμένες Πολιτείες έχουν αναφερθεί περιστατικά υδατογενών λοιμώξεων τα οποία σε ποσοστό 58% σχετίζονται με μόλυνση υπόγειων υδάτων από ιούς εντερικής προέλευσης.

1.4.1.3 Λοιμώξεις από την κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού.

Όταν, μολυσμένα με κοπρανώδεις προσμίξεις, επιφανειακά ή υπόγεια νερά αναμιχθούν με πόσιμο νερό πρέπει να υποστούν επεξεργασία προκειμένου να αδρανοποιηθούν οι ιοί εντερικής προέλευσης έτσι ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση λοιμώξεων. Η μολυσματική δόση των ιών δεν είναι ακόμη γνωστή για πολλούς από αυτούς αλλά θεωρείται ότι είναι 1-10 μολυσματικές μονάδες (PFU). Πολλές μελέτες αναφέρουν την παρουσία ιών εντερικής προέλευσης σε δείγματα πόσιμου νερού και την πρόκληση υδατογενών επιδημιών από την κατανάλωσή τους (Kukkula et al., 1997).

1.4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των ιών στο περιβάλλον.

Η μελέτη των συνθηκών επιβίωσης των ιών και γενικότερα όλων των παθογόνων μικροοργανισμών που υπάρχουν στα λύματα είναι απαραίτητη για τη δημιουργία κατάλληλων μονάδων επεξεργασίας (βιολογικός καθαρισμός) με σκοπό την προστασία της Δημόσιας Υγείας και την επαναχρησιμοποίηση των επεξεργασμένων αποβλήτων.

Η επιβίωση των ιών εντερικής προέλευσης στο περιβάλλον επηρεάζεται από διάφορους φυσικούς, χημικούς, και βιολογικούς παράγοντες. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των ιών στο περιβάλλον και πιο συγκεκριμένα στο νερό και το έδαφος είναι α) η θερμοκρασία, β) το PH, γ) το φως, δ) η προσρόφησή τους στο έδαφος και ε) η παρουσία άλλων μικροοργανισμών. Η επίδραση των παραγόντων αυτών στην επιβίωση των ιών εντερικής προέλευσης εξαρτάται από την επίδραση που έχουν στο γενετικό υλικό και τις πρωτεΐνες του καψιδίου των ιών (το γενετικό υλικό τους είναι RNA με εξαίρεση τους αδενοϊούς που είναι DNA και διαθέτουν ένα πρωτεϊνικό περίβλημα, το καψίδιο).

1.4.2.1 Θερμοκρασία

Αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα επιβίωσης των ιών στο νερό και το έδαφος. Οι μεταβολές της θερμοκρασίας επηρεάζουν δυσμενώς τη διάρκεια ζωής των ιών. Μελέτες έδειξαν ότι σε υψηλές θερμοκρασίες καταστρέφεται το καψίδιο των ιών λόγω μετουσίωσης των πρωτεϊνών του, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες αδρανοποιείται το γενετικό υλικό των ιών. Όσο η θερμοκρασία αυξάνεται τόσο

μειώνεται ο χρόνος ζωής των ιών. Διάφορες εργαστηριακές μελέτες έδειξαν πως οι ιοί είναι περισσότερο ανθεκτικοί στις χαμηλές θερμοκρασίες (-20 °C- 1°C) παρά στις υψηλές (πάνω από 22 °C).

1.4.2.2 Φώς-Ακτινοβολία

Το φώς επιδρά άμεσα ή έμμεσα στην επιβίωση των ιών στο νερό. Η άμεση επίδραση εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να απενεργοποιήσει τους ιούς ως αποτέλεσμα του σχηματισμού διμερών θυμίνης και της αποδιάταξης των πρωτεϊνών του καψιδίου. Γι' αυτό το λόγο συνίσταται η χρήση της υπεριώδους ακτινοβολίας για την απομόλυνση των ιών στα λύματα και το θαλασσινό νερό (Wilhelm et al., 2002). Η έμμεση επίδραση του φωτός αφορά την ενεργοποίηση χημικών ουσιών που είναι τοξικές για τους ιούς. Τέλος προστασία από την επίδραση του φωτός , παρέχεται στους ιούς όταν είναι προσροφημένοι σε σωματίδια αργίλου (Bitton et al., 1979).

1.4.2.3 pH

Όπως το φώς έτσι και το pH επιδρά άμεσα και έμμεσα στην επιβίωση των ιών. Άμεσα το pH προκαλεί την αποδιάταξη των πρωτεϊνών του καψιδίου και έμμεσα εμποδίζει την προσρόφηση των ιών σε διάφορες επιφάνειες , η οποία ευνοεί την επιβίωσή τους (Fujioka et al., 1975, Mandel et al., 1971 και Bitton et al., 1980. Οι περισσότεροι ιοί εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα σε τιμές pH από 5 έως 9. Ο Ρολιοϊός για παράδειγμα παραμένει ενεργός για πολλές εβδομάδες σε pH από 3.8 έως 8.5 (Pollard et al., 1949). Επίσης έπειτα από μελέτες διαπιστώθηκε και η επίδραση χημικών ουσιών στην επιβίωση των ιών που εξαρτώνται από το pH. Για παράδειγμα η αμμωνία σε pH 8.5-9.5 προκαλεί αποδιάταξη του πρωτεϊνικού περιβλήματος των ιών.

1.4.2.4 Προσρόφηση ιών σε επιφάνειες

Οι ιοί στα λύματα βρίσκονται συνήθως συγκεντρωμένοι με άλλους ιούς δημιουργώντας συσσωματώματα. Έχει διαπιστωθεί ότι η απορρόφηση των ιών από το έδαφος και η προσκόλληση τους σε ιζήματα ενισχύει την επιβίωση τους. Ωστόσο η προσρόφηση των ιών στο έδαφος και κατά συνέπεια και η επιβίωση τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι η υγρασία , το ποσό της οργανικής ύλης , η σύσταση του εδάφους , το pH και η παρουσία κατιόντων (Πίνακας 2). Μελέτες σε λύματα επιβεβαίωσαν ότι η προσρόφηση του Ρολιο-ιού σε σωματίδια ενεργού λάσπης (σε 1 γραμμάριο λάσπης προσρόφηση 10^8 σωματιδίων Ρολιο-ιών) έχει ως αποτέλεσμα ενίσχυση της ενεργότητάς του για διάστημα μεγαλύτερο των 28 ημερών, προστατεύοντάς τον παράλληλα από τις μεταβολές της θερμοκρασίας (Nagajima et al., 2003). Οι ιοί εμφανίζουν σταθερότητα σε ουδέτερες τιμές pH (6,5-7,5), ενώ η απορρόφησή τους ενισχύεται σε τιμές όξινου pH (Gerba et al., 1975 και England et al., 1982). Επιπλέον η παρουσία κατιόντων και διαλυμένων αλάτων σε συνδυασμό με το pH φαίνεται να ενισχύουν την απορρόφηση των ιών από το έδαφος (Sobsey et al., 1975 και Gerba et al., 1984). Πρωταρχικό ρόλο στην ενεργοποίηση των ιών στο έδαφος έχει η ικανότητα συγκράτησης νερού από το έδαφος δηλαδή η υγρασία του. Σε συνθήκες υγρασίας κάτω από 10% οδηγεί σε αδρανοποίηση των ιών και αναστολή της μετακίνησής τους στην επιφάνεια του εδάφους και την εισχώρησή τους στο υπέδαφος. Τα γεγονός αυτό οφείλεται στην αποδιάταξη του περιβλήματος και του γενετικού υλικού των ιών. Συνεπώς η βροχόπτωση σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία ευνοούν σημαντικά την επιβίωση των ιών στο έδαφος λόγω αύξησης της υγρασίας (Beavers and Gardner 1993).

Παράγοντας	Επίδραση στην επιβίωση των ιών
Θερμοκρασία	Οι ιοί επιβιώνουν περισσότερο σε χαμηλές θερμοκρασίες
Υγρασία	Η αύξηση της υγρασίας ευνοεί την επιβίωση
pH	Οι περισσότεροι ιοί εντερικής προέλευσης είναι σταθεροί σε τιμές pH 3-9
Συγκέντρωση αλάτων και παρουσία κατιόντων	Η παρουσία ορισμένων κατιόντων προστατεύει τους ιούς και εμποδίζει την απενεργοποίησή τους
Ποσό οργανικής ύλης	Η αύξηση του ποσού της οργανικής ύλης συνήθως ενισχύει την επιβίωση των ιών
Χαρακτηριστικά του εδάφους	Η ικανότητα συγκράτησης του νερού από το έδαφος καθορίζει την προσρόφηση των ιών
Τύπος του ιού	Ανάλογα με τον τύπο του ιού έχει παρατηρηθεί διαφορετική επίδραση των διαφόρων παραγόντων
Συσσωμάτωση των ιών	Ευνοεί την επιβίωσή τους

Πίνακας 2: Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των ιών που είναι προσροφημένοι στο έδαφος (Yates and Yates 1988)

1.4.2.5 Παρουσία άλλων μικροοργανισμών

Τα βακτήρια και άλλοι μικροοργανισμοί παράγοντας πρωτεολυτικά και άλλα ένζυμα καταστρέφουν τους ιούς που υπάρχουν στα επιφανειακά νερά, τα λύματα και το έδαφος. Διάφορες μελέτες που έγιναν για την επίδραση που έχει η παρουσία μικροοργανισμών στα λύματα κατέληξαν στην ευρεία χρήση μικροοργανισμών στα διάφορα στάδια επεξεργασίας των λυμάτων ώστε να απενεργοποιηθούν οι ιοί.

1.5 Μέθοδοι απομόνωσης ιών εντερικής προέλευσης

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση ιών εντερικής προέλευσης χωρίζονται σε 2 κατηγορίες :

1. Τις καλλιεργητικές τεχνικές με τη χρήση κυτταρικών σειρών ανάλογα με το είδος του ιού

2. Τις μοριακές τεχνικές όπως είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR που απαιτεί τη απομόνωση του DNA ή RNA ανάλογα με το είδος του ιού

Οι μοριακές τεχνικές είναι ταχύτερες , πιο ευαίσθητες και πιο ακριβείς σε σχέση με τις καλλιεργητικές. Επίσης με τη χρήση μοριακών τεχνικών είναι δυνατόν να ανιχνευθούν ιοί που εξαιτίας της αργής ανάπτυξής τους είναι δύσκολο και μερικές φορές αδύνατον να καλλιεργηθούν.

Με βάση μελέτες που έγιναν σε διάφορα εργαστήρια για την ανίχνευση ιών σε λύματα χρησιμοποιώντας καλλιεργητικές και μοριακές τεχνικές οδήγησαν σε δύο παρατηρήσεις : α) μόνο μικρό ποσοστό σωματιδίων των ιών που υπάρχουν στα λύματα μπορούν να ανιχνευθούν με καλλιεργητικές τεχνικές και β) οι μοριακές τεχνικές παρά τα πλεονεκτήματα που εμφανίζουν έναντι των καλλιεργητικών τεχνικών είναι δύσκολο να εφαρμοστούν με επιτυχία λόγω αναστολέων που υπάρχουν στα λύματα.

Πολύ πριν την καθιέρωση των μοριακών τεχνικών η τυποποίηση των ιών βασιζόταν στη χρήση αντισωμάτων με τα οποία διακρίνονταν οι αντιγονικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων τύπων ιών. Το πρόβλημα ήταν ότι κάποια είδη δεν μπορούσαν να τυποποιηθούν με τη χρήση αντισωμάτων γιατί δεν εμφάνιζαν αντιγονικές διαφορές. Η ανάγκη για τυποποίηση ιών που εμφάνιζαν κοινά αντιγονικά χαρακτηριστικά οδήγησε στην ανάπτυξη μοριακών τεχνικών (Car et al., 2001). Οι μοριακές τεχνικές τυποποίησης στηρίζονται στις διαφορές του γονιδιώματος των ιών που προκύπτουν λόγω μεταλλάξεων καθώς το γονιδίωμα ενός ιού μπορεί να εμφανίζει διαφορές στο επίπεδο νουκλεοτιδίων αλλά αυτό δεν επηρεάζει την έκφραση των πρωτεϊνών και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του.

Η τυποποίηση των ιών έχει μεγάλη επιδημιολογική σημασία. Οι μοριακές τεχνικές μπορούν να συμβάλλουν στην τυποποίηση παθογόνων μικροβίων (ιών , βακτηρίων)

που προκαλούν τις διάφορες επιδημίες καθώς και στην εξακρίβωση του τρόπου μετάδοσης τους. Επίσης η τυποποίηση των επιδημιολογικών στοιχείων μπορεί να οδηγήσει στη λήψη μέτρων για την αντιμετώπιση επιδημιών σε διάφορες περιοχές (ανακάλυψη εμβολίου).

Η μοριακή τυποποίηση των ιών μπορεί να πραγματοποιηθεί με τις ακόλουθες μοριακές τεχνικές:

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

Οι παραπάνω τεχνικές έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία 20 και έχουν αποδειχθεί χρήσιμες στην προσπάθεια των ερευνητών να τυποποιήσουν τους ιούς που απομονώνονται είτε με μοριακές είτε με καλλιεργητικές μεθόδους. Η μοριακή τυποποίηση των ιών βρίσκεται σε εξέλιξη και γίνεται μια προσπάθεια βελτίωσης των μεθόδων τυποποίησης, ώστε να είναι εύκολη η εφαρμογή τους στα ερευνητικά εργαστήρια.

1.6 Επιδημιολογία

Οι εντεροϊοί έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη δημόσια υγεία, δεδομένου ότι σχετίζονται με επιδημίες γαστρεντερίτιδας από την κατανάλωση μολυσμένου νερού. Οι ιοί αυτοί μπορούν να απομονωθούν σε μεγάλες ποσότητες από κόπρανα ανθρώπινης προέλευσης όπως και από λύματα και μολυσμένα νερά. Επομένως η μικροβιολογική ποιότητα του νερού και η ανθρώπινη υγεία επηρεάζονται σημαντικά από την παρουσία μικροοργανισμών εντερικής προέλευσης, οι οποίοι προέρχονται

από λύματα που καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον. Πολλές επιδημίες από ιούς εντερικής προέλευσης έχουν συνδυαστεί με το νερό. Τέτοιου είδους επιδημίες εξαπλώνονται στον πληθυσμό από κατανάλωση μολυσμένου νερού και κολύμβηση σε ακατάλληλα νερά.

Οι εντεροϊοί μεταδίδονται ευρέως και απαντώνται σε παγκόσμια κλίμακα. Οι άνθρωποι αποτελούν φυσικούς ξενιστές των εντεροϊών. Ο τρόπος μετάδοσης είναι μέσω της κοπρανοστοματικής και αναπνευστικής οδού και προκαλεί διάφορα νοσήματα όπως παράλυση , μηνιγγίτιδα , αναπνευστικές παθήσεις και οξεία γαστρεντερίτιδα.

Τα παιδιά αποτελούν τους κύριους στόχους για τους εντεροϊούς και λειτουργούν ως η κύρια πηγή μόλυνσης. Επειδή η οδός μετάδοσης είναι η κοπρανοστοματική, οι άσχημες συνθήκες υγιεινής και ο υπερπληθυσμός ευνοούν τη μετάδοση των ιών.

Η πολυομυελίτιδα έχει παγκόσμια κατανομή και οι μολύνσεις με Polio-ιούς είναι ασυμπτωματικές. Υπάρχουν τρεις τύποι Polio-ιών που έχουν τυποποιηθεί αλλά ο τύπος I είναι αυτός που οδηγεί κυρίως στην παράλυση. Η ασθένεια εμφανίζεται σε όλες τις ηλικίες με ιδιαίτερη προτίμηση στα παιδιά τα οποία είναι πιο ευπαθή από τους ενήλικες λόγω επίκτητης ανοσίας που εμφανίζει ο ενήλικος πληθυσμός. Σε μη αναπτυγμένες χώρες όπου οι συνθήκες υγιεινής δεν είναι ευνοϊκές η εξάπλωση του ιού είναι πιο εύκολη και αποτελεί σοβαρή βρεφική και παιδική λοίμωξη.

Οι coxsackie-ιοί που ανήκουν στους εντεροϊούς χωρίζονται σε 2 ομάδες, την Α και τη Β και εμφανίζουν διάφορες παθολογικές ιδιότητες. Σε μια οικογένεια αν κάποιος μέλος προσβληθεί από coxsackie-ιό τότε όλα τα άτομα θα μολυνθούν, έστω και αν δεν εκδηλώσουν κλινικά συμπτώματα.

Οι Echo-ιοί οι οποίοι ανήκουν και αυτοί στους εντεροϊούς εμφανίζουν παγκόσμια κατανομή και η επιδημιολογία τους μοιάζει με αυτή των εντεροϊών. Οι εντεροϊοί δημιουργούν παροδικές λοιμώξεις σε αντίθεση με τα εντεροβακτήρια. Ανιχνεύονται κυρίως σε νεαρά άτομα και κυρίως σε περιοχές όπου οι συνθήκες υγιεινής είναι χαμηλού επιπέδου.

Τέλος στους εντεροϊούς ανήκουν και άλλοι 4 τύποι ιών (68, 69, 70 και 71) από τους οποίους τρεις (68,70 και 71) προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο. Ο εντεροϊός 68

απομονώθηκε από την αναπνευστική οδό παιδιών με πνευμονία ενώ ο εντεροϊός 70 είναι η κύρια αιτία της οξείας αιμορραγικής επιπεφυκίτιδας και εξαπλώνεται κάτω από κακές υγειονομικές συνθήκες. Ο εντεροϊός 71 απομονώθηκε από ασθενείς με μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα και παράλυση και είναι μια από τις κύριες αιτίες παράλυσης του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Ιοί εντερικής προέλευσης	Τύποι	Μέγεθος σε nm	Τύπος νουκλεϊκού οξέος	Κλινικά Σύνδρομα
Εντεροϊοί Polio-ιοί Echo-ιοί	1,2,3 1-9,11-27 29-34	20-30 20-30	RNA RNA	Παράλυση-μηνιγγίτιδα- πυρετός Μηνιγγίτιδα- αναπνευστικές παθήσεις- ερύθρημα-διάρροια
Coxsackie-ιοί A B	1-22,24 1-6	20-30 20-30	RNA RNA	Κυνάγχη-μηνιγγίτιδα- αναπνευστικές παθήσεις Πλευροδυνία- Περικαρδίτιδα- μηνιγγίτιδα-μυοκαρδίτιδα
Adeno-ιοί	47	68-75	DNA	Διάρροια-αναπνευστικές παθήσει -μολύνσεις ματιών
Noro-ιοί	2	27	RNA	Γαστρεντερίτιδα
Ιός της ηπατίτιδας A	1	27	RNA	Ηπατίτιδα-Ίκτερος

Πίνακας 3: Ιοί εντερικής προέλευσης (τύποι, χαρακτηριστικά τους και κλινικά σύνδρομα που προκαλούν)

2. Πειραματική Διαδικασία

Κατά τη διάρκεια της μελέτης συλλέχτηκαν 24 περιβαλλοντικά δείγματα για την ανίχνευση εντεροϊών. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από τον Ιούλιο του 2005 μέχρι τον Αύγουστο του 2007 από τις εξής περιοχές: Α. Λάρισα, Β. Τρίκαλα και Γ. Ιωάννινα

Δείγμα	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Προέλευση	Βιολογικό υλικό
LR1	14/07/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR2	8/09/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR3	6/10/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR5	25/05/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR6	16/06/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR7	4/07/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR8	13/07/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR9	19/07/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR10	2/08/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR11	18/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR12	5/02/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR13	14/02/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR14	24/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR15	26/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR16	1/08/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LRB1	26/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Βοθρολύματα
LRB2	1/08/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Βοθρολύματα
TR1	15/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
TR2	28/11/2006	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
TR3	18/01/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
TR4	18/04/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
TR5	3/06/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
GN1	21/09/2006	Βιολ. Καθαρ. Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	Λύματα
GN2	14/09/2006	Βιολ. Καθαρ. Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	Λύματα

Πίνακας 4: Περιβαλλοντικά δείγματα

2.1 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση εντεροϊών από περιβαλλοντικά δείγματα, που συλλέξαμε από μονάδες βιολογικού καθαρισμού των περιοχών Λάρισας, Τρικάλων και από το Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ιωαννίνων, με την ανάπτυξη και εφαρμογή της μοριακής μεθόδου snPCR.

2.2 Υλικά και μέθοδοι

Συλλέξαμε συνολικά 24 δείγματα μη επεξεργασμένων λυμάτων από μονάδες βιολογικού καθαρισμού των περιοχών Λάρισας, Τρικάλων καθώς και δείγματα από το πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ιωαννίνων. Συγκεκριμένα συλλέξαμε 17 δείγματα από το βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας, 5 δείγματα από το βιολογικό καθαρισμό των Τρικάλων και 2 δείγματα από το πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ιωαννίνων και τα επεξεργαστήκαμε με τις ακόλουθες μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση εντεροϊών.

2.2.1 Συγκέντρωση περιβαλλοντικών δειγμάτων

Στα δείγματα που συλλέξαμε, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης ιών, εφαρμόσαμε τη μέθοδο συγκέντρωσης τους πριν την απομόνωση των ιών. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε είναι η μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων. Για να αποκλειστεί η παρουσία αναστολέων και τοξικότητας κάθε περιβαλλοντικό δείγμα ενοφθαλμίστηκε με γνωστή συγκέντρωση Sabin 2.

2.2.2 Μέθοδος διαχωρισμού δύο Φάσεων

Φυγοκεντρούνται 500 ml δείγματος στις 1000 g για 10 min και το ίζημα που προκύπτει φυλάσσεται στους 4 °C. Το pH του υπερκειμένου ρυθμίζεται στο 7-7.5 και στα 500 ml του προστίθενται 39.5 ml 22% (w/v) dextran, 287 ml 29% (w/v) PEG6000 και 35 ml Nacl 5 M Sigma, USA). Στη συνέχεια το μίγμα αναδεύεται για 1 h στους 4 °C και εισάγεται σε φιάλη διαχωρισμού όπου και επωάζεται στους 4 °C για 48 h. Τα ιϊκά σωματίδια συγκεντρώνονται στην κάτω φάση, η οποία συλλέγεται και προστίθεται στο ίζημα που φυλάχθηκε από τη φυγοκέντρωση. Στο μίγμα που προκύπτει προστίθεται χλωροφόρμιο 20% v/v, αναδεύεται ισχυρά και φυγοκεντρείται στις 15000 g για 20 min. Τέλος η πάνω φάση συλλέγεται σε πλαστικό σωλήνα όπου και προστίθενται πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε τελικές συγκεντρώσεις 100units/ml και 100μg/ml αντίστοιχα (WHO 2003).

2.2.3 Εκχύλιση ιϊκού RNA

Αρχικά από κάθε δείγμα έγινε μια αραιώση 1/5 σε τελικό όγκο 1000 μl όπου χρησιμοποιήθηκαν 200 μl δείγματος και 800 μl θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια το αραιωμένο δείγμα υπέστη 10 εκχυλίσεις .

Η απομόνωση του ιϊκού RNA έγινε με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης. Από το αραιωμένο δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100 μl /tube, τα οποία επωάσαμε για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου με 300 μl διαλύματος Lysis Buffer (GuSCN) και 10 μl γλυκογόνου (100mg/ml) με στόχο τη λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης η οποία φυλάσσεται στους -20°C . Ακολούθησε vortex των δειγμάτων τα οποία έμειναν στον πάγο για 20min και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 10min στις 14000 rcf στους $+4^{\circ}\text{C}$. Η ισοπροπανόλη απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 500 μl παγωμένης αιθανόλης 70%. Φυγοκεντρήσαμε ξανά στις ίδιες συνθήκες . Η αιθανόλη απομακρύνθηκε και το ολικό κυτταρικό και ιϊκό RNA επαναδιαλύθηκε σε 100 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, ελεύθερου νουκλεασών και φυλάχθηκε στους -20°C .

2.2.4 Αντίστροφη μεταγραφή

Η σύνθεση cDNA από το προϊόν της εκχύλισης του RNA, πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής . Αρχικά 5 μl από το RNA επωάστηκαν με μείγμα αποτελούμενο από: 1 μl τυχαίων εκκινήτων (random primers) d(N(9) (Takara Biomedical group, Shiga, Japan), 1 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10 mM dNTPs και 5 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου, ελεύθερου νουκλεασών, νερού στους 65°C για 5 min. Ακολούθως τα δείγματα μεταφέρθηκαν στον πάγο και προστέθηκε σε αυτά μείγμα αποτελούμενο από: 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x (MML-V reaction buffer), 2 μl 0.1M DTT, 100 μονάδες αντίστροφης μεταγραφάσης MML-V και 20 μονάδες αναστολέα ριβονουκλεασών RNase . Στο τέλος προστέθηκε , απεσταγμένο και αποστειρωμένο , ελεύθερο νουκλεασών , νερό. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 50 min και στη συνέχεια απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης με επώαση στους 70°C για 15 min.

2.2.5 Εκκινητικά μόρια

Τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση των εντεροϊών, η αλληλουχία τους, η θέση που αναγνωρίζουν πάνω στο γονιδίωμα και η πολικότητά τους εμφανίζονται στον πίνακα 5.

Επίσης στον πίνακα 6 οι εκκινητές που στοχεύουν το 16s RNA της *Escherichia coli* οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της παρουσίας αναστολέων της PCR σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα.

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

Πίνακας 5: Εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση των εντεροϊών. Η θέση βασίζεται στο πρότυπο στέλεχος CBV1

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

Πίνακας 6: Εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση *Escherichia coli*. Η θέση αναφέρεται στο 16sRNA της *Escherichia coli*

2.2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Στη συνέχεια από τα cDNA που δημιουργήθηκαν ενισχύθηκε ένα τμήμα που αντιστοιχεί σε ένα μέρος της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής. Το μείγμα που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση αποτελούνταν από 3 μl cDNA, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Pag buffer – Stratagene), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs) 10mM, 2 μl εκκινητικών μορίων 25pmol, 0,5 μl (2.5 units) Παq DNA πολυμεράσης (Stratagene) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο, ελεύθερο νουκλεασών νερό, σε τελικό όγκο 50 μl. Ακολουθήθηκε αποδιάταξη του cDNA στους 95° C για 2 min και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν οι ακόλουθες συνθήκες :

Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης :

Θερμοκρασία αποδιάταξης	95° C για 20 min	} 25 κύκλοι
Θερμοκρασία υβριδοποίησης	54° C για 20min	
Θερμοκρασία επιμήκυνσης	72° C για 30 min	

Τα ζεύγη εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα: TS1-TS3

Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72° C για 5 min.

2.2.7 Semi nested-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Τα προϊόντα της PCR με τα εκκινητικά μόρια TS1-TS3 χρησιμοποιήθηκαν στη semi nested PCR με σκοπό να ενισχυθεί ένα μικρότερο τμήμα τους στο οποίο πιθανόν να υπήρχε η αλληλουχία κάποιου εντεροϊού. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από 3 μl προϊόντος της PCR, 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10X(Paq Buffer-Stratagene), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs) 10mM, 2μl εκκινητικών μορίων 25pmol, 0.5μl (2.5 unit) Paq DNA πολυμεράσης (Stratagene) και αποσταγμένο και αποστειρωμένο, ελεύθερο νουκλεασών νερό, έως τελικού όγκου 50μl. Όπως και στην PCR έτσι και εδώ ακολούθησε αποδιάταξη του PCR προϊόντος στους 95° C για 2 min και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν οι ίδιες συνθήκες με την PCR με τη διαφορά ότι η θερμοκρασία υβριδοποίησης ήταν στους 40° C και η αντίδραση έγινε για 40 κύκλους με εκκινητικά μόρια TS1/HEV-C-9.

2.2.8 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της snPCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2%. Αναλυτικότερα 1,2 gr αγαρόζης (Invitrogen, UK) και 60 ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) προστίθενται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη και αφήνεται να κρυώσει (περίπου 40°C). Προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂), ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Ύστερα από καλή ανάδευση το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει και να πολυμεριστεί η αγαρόζη.

Από το προϊόν της PCR 10 μl αναμιγνύονται με 2 μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης) και μεταφέρονται στο πήκτωμα αγαρόζης. Για τον προσδιορισμό του μήκους των RT-PCR προϊόντων χρησιμοποιείται μάρτυρας μοριακού βάρους, στη συγκεκριμένη περίπτωση ο ΦΧ174 HaeIII (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 Volts, 50 mA για περίπου 1 h. Στη συνέχεια, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται πάνω από τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne, Hartland WI), όπου ελέγχεται και φωτογραφίζεται με Olympus digital camera.

2.3 Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν 24 δείγματα μη επεξεργασμένων λυμάτων. Τα λύματα προέρχονταν από 3 σταθμούς δειγματοληψίας ένας από το νομό Λάρισας, ένας από το νομό Τρικάλων και ένας από το νομό Ιωαννίνων. Τα δείγματα αφού συγκεντρώθηκαν αρχικά επεξεργάστηκαν με τη χρήση μοριακών τεχνικών (RT-semiNested PCR) για την παρουσία εντεροϊών. Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται τα περιβαλλοντικά δείγματα, η ημερομηνία συλλογής τους, η προέλευσή τους και τα αποτελέσματα της τεχνικής semiNested PCR.

Δείγμα	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Προέλευση	Βιολογικό υλικό	Αποτελέσματα (με snPCR)
LR1	14/07/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	+
LR2	8/09/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR3	6/10/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	+
LR5	25/05/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR6	16/06/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	+
LR7	4/07/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	+
LR8	13/07/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR9	19/07/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR10	2/08/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR11	18/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR12	5/02/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR13	14/02/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	
LR14	24/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	+
LR15	26/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LR16	1/08/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	-
LRB1	26/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Βοθρολύματα	-
LRB2	1/08/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Βοθρολύματα	-
TR1	15/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα	-
TR2	28/11/2006	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα	-
TR3	18/01/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα	-
TR4	18/04/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα	-
TR5	3/06/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα	-
GN1	21/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	Λύματα	-
GN2	14/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	Λύματα	-

Πίνακας 7: Αποτελέσματα snPCR στα περιβαλλοντικά δείγματα

Στον παραπάνω πίνακα 7 φαίνονται με συν (+)τα δείγματα των μη επεξεργασμένων λυμάτων τα οποία βρέθηκαν θετικά στην παρουσία εντεροϊών. Από τα 24 δείγματα που επεξεργαστήκαμε θετικά σε εντεροϊό βρέθηκαν 5 δείγματα.

3 Συζήτηση

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανίχνευση εντεροϊών σε μη επεξεργασμένα λύματα με τη μέθοδο της semiNested PCR. Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 5 παρατηρήθηκε ένα μικρό ποσοστό θετικών δειγμάτων, 5 θετικά δείγματα από τα 24 συνολικά δείγματα. Τα θετικά δείγματα παρατηρήθηκαν στα δείγματα μη επεξεργασμένων λυμάτων από το βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας.

Όπως ήδη αναφέρθηκε η παρουσία εντεροϊών εξαρτάται από το μήνα του έτους. Οι εντεροϊοί εμφανίζονται κυρίως τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες. Η περίοδος που συλλέξαμε τα δείγματα ήταν από τον Ιούνιο του 2005 μέχρι το Δεκέμβριο του 2007, ένα χρονικό διάστημα το οποίο περιλαμβάνει καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες και η ύπαρξη των θετικών αποτελεσμάτων συμβαδίζει με τη συνήθη περίοδο εμφάνισης εντεροϊών. Τα 4 από τα 5 θετικά αποτελέσματα, όπως φαίνεται στον πίνακα 6, ανήκουν σε δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν κατά τους φθινοπωρινούς και καλοκαιρινούς μήνες οπότε δικαιολογείται το θετικό αποτέλεσμα τους.

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια αρχική μελέτη για την ανάπτυξη και την εφαρμογή μεθοδολογίας για τον έλεγχο μη επεξεργασμένων λυμάτων τα οποία περιέχουν ιούς εντερικής προέλευσης. Η εμφάνιση θετικών αποτελεσμάτων στην παρούσα μελέτη, υποδηλώνει την παρουσία εντεροϊών σε μη επεξεργασμένα λύματα και καθιστά αναγκαία την εφαρμογή όλων των σταδίων επεξεργασίας στις μονάδες βιολογικού καθαρισμού, ώστε η ποιότητα των επεξεργασμένων λυμάτων να είναι τέτοια ώστε να είναι απαλλαγμένη ιών ελαχιστοποιώντας τον κίνδυνο λοιμώξεων από την υδατογενή διασπορά των εντεροϊών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Abbaszadegan M., Lechevallier M. and Gerba C. 2003.** Occurrence of viruses in US groundwaters .J AWWA 95, 107-120.
2. **Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow. 1996.** Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. Adv. Virus Res. 46:1-68.
3. **Arens M. 1999.** Methods for subtyping and molecular comparison of human viral genomes. Clin Microbiol Rev 12, 612-626.
4. **Ashbolt N.J. 2004.** Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. Toxicology 198, 229-238.
5. **Azadpour-Keeley A, Faulkner B.R. and Chen J.** Movement and longevity of viruses in the subsurface. EPA US Environmental protection agency – Ground water issue.
6. **Bailey M. Jennifer and William E. Tapprich, 2007,** Structure of the 5' Nontranslated Region of the Cocksackievirus B3 Genome: Chemical Modifocation and Comparative Sequence Analysis, J Virol, Vol.81(2), p.650-668
7. **Basavappa R., R. Syed, O. Flore, J. P. Icenogle, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 1994.** Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly:structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 angstrom resolution. Protein Sci. 3:1651-1669
8. **Baxter J. Nicola, Andreas Roetzer, Hans-Dieter Liebig, Svetlana E. Sedenikova, Andrea M. Hounslow, Tim Skern, and Jonathan P. Waltho, 2006,** Structure and Dynamics of Cocksackie B4 2A Proteinase, an Enzyme Involved in the Etiology of Heart Disease, J Virol, Vol.80(3), p.1451-1462
9. **Beavers P.D. and Gardner E.A. 1993.** Prediction of virus transport through soils. Proc. 15th Fed. Conv. AWWA, 530-535
10. **Bergelson J M, M Chan, K R Solomon, N F St John, H Lin, and R W Finberg,** Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses, Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 June 21; Vol.91(13), p.6245–6248
11. **Bhattacharyya Sankar, Saumitra Das, 2006,** An Apical GAGA loop Within 5'UTR of the Cocksackievirus B3 RNA maintains Structural Organization of the IRES Element Required for Efficient Ribosome Entry, RNA Biology, Vol.3(2), p.60-68
12. **Bitton G. 1979.** Effect of solar radiation on poliovirus: preliminary experiments.Water Research 13:225

13. **Bitton G. 1980.** Adsorption of viruses to surfaces: technological and ecological implications. In: Bitton G. & Marshall K.C. eds. Adsorption of Microorganisms to surfaces. New York, NY, John Wiley & Sons, Inc., pp.332.
14. **Bitton, G. 1980.** Introduction to Environmental Virology. Wiley, New York
- Bosch A. 1998.** Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Internatl Microbiol* 1, 191-196.
15. **Bottinger M. and Herrstrom E. 1992.** Isolation of polioviruses from sewage and their characteristics. Experience over two decades in Sweden. *Scand J Infect Dis* 24, 151-155.
16. **Carna R.I., Parashar U.D., Taylor D.N. 1999.** Enteropathogens and other factors associated with severe disease in children with acute watery diarrhea in Lima, Peru. *J Infect Dis* 179, 1139-1144
17. **Caro V., Guillot S., Delpeyroux and Crainic R. 2001.** Molecular strategy for "serotyping" of human enteroviruses. *J Gen Virol* 82, 79-91.
18. **CDC: Center of Disease Contro and Prevention: Respiratory and Enteric Viruses Branch,** http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/enterovirus/non-polio_entero.htm
19. **Chan Kwai Peng, Kee Tai Goh, Chia Yin Chong, Eng Swee Teo, Gilbert Lau, and Ai Ee Ling, 2003,** Epidemic Hand, Foot and Mouth Disease Caused by Human Enterovirus 71, Singapore, *Emerging Infectious Diseases*, Vol.9(1), p78-85
20. **Chow M., Newman J.F., Filman D., Hogle J.M., Rowlands D.J., and Brown F. 1987** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 327:482-486.
21. **Chung H. & Sobsey M.D. 1993.** Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Water Sci. Technol.* 2:425-428.
22. **Clark R.M., Hurst C.J. and Regli S. 1993.** Costs and benefits of pathogen central in drinking water. In *safety of water disinfection : Balancing Chemical and Microbial Risks* (Edited by Craun G.F.), pp.181-1968. ILSI Press, Washington, DC
23. **Craun G.F. & Calderon R. 1996.** Microbial Risks in Groundwater Systems: Epidemiology of Waterborne Outbreaks. Under the Microscope, Examining Microbes in Groundwater. AWWA Res.Fdn.,Denver
24. **Domingo E. and J. J. Holland. 1997.** RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178
25. **Draft OSRAS Rev A. April 2001.** Additional information on pathogen transport and survival

26. **England B.L. 1982.** Detection of viruses on fomites. In: *Methods in Environmental Virology*. New York: Marcel Dekker, Inc. 179-220.
27. **Evans D.J. and J.W. Almond , 1998.** Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell tropism and pathogenesis. *Trends Microbiol.* 6, pp. 198–202
28. **Friedrich F. 2000.** Genomic modifications in oral poliovirus vaccine strains after multiplication in humans and implications for the eradication of poliovirus. *Acta Virol.* 44, 109-117
29. **Fujioka R.S. & Ackermann W.W. 1975.** The inhibitory effects of MgCl₂ on the inactivation kinetics of poliovirus by urea. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148:1063
30. **Gallie, D. R. 1991.** The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* Vol.5, p.2108–2116.
31. **Gamarnik A V, Andino R. 1998,** Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* Vol.12, p.2293–2304
32. **Gamarnik, A. V., and R. Andino. 2000.** Interactions of viral protein 3CD and poly(rC) binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome. *J. Virol.* Vol.74, p.2219-2226
33. **Georgescu M., Balanant J., Ozden S., Crainic R. 1997 .**Random selection a model for poliovirus infection of the central nervous system.*J.Gen.Virol.*78:1819-1828.
34. **Georgopoulou A, Markoulatos P. 2001.** Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(11): 792-799
35. **Gerba C.P. 1984.** Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Advances in Applied Microbiology* 30:133-168.
36. **Gerba C.P 1975.** Fate of wastewater bacteria and viruses in soil. *Journal of the Irrigation and Drainage Division. Proceedings of the American Society of Civil Engineers.* 101(IR3):157-174
37. **Gerba C., Nwachuku N. and Riley K.R. 2003.** Disinfection resistance of waterborne pathogens on the United States environmental protection agency's contaminant candidate list (CCL). *J Water Supply-Aqua* 52, 81-94.
38. **Huang Yan, James M. Hogle, and Marie Chow, 2000 September.** Is the 135S Poliovirus Particle an Intermediate during Cell Entry?, *J Virol.*; 74(18): 8757–8761

39. **King A.M.Q., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypia T., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Palmenberg A.C., Skern T. and Stanway G. 2000.** Picornaviridae. In " Virus Taxonomy, Seventh Report of International Committee for the Taxonomy of Viruses" (M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, C.H. Calisher, E.B. Carsten, M.K Estes, S.M. Lemon, J. Malinoff, M.A Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and P.B. Wickner, Eds), pp 657-673 Academic Press, New York, San Diego
40. **Koopmans J.S., Eckert E.A., Greenberg H.B., Strohm B.C., Isaccson R.E. & Monto A.S. 1982.** Norwalk virus enteric illness acquired by swimming exposure. *American Journal of Epidemiology* . 155. 173-177.
41. **Koivumen J., Heinonen-Tanski H. 2005.** Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Research* 39: 1519-1526
42. **La Belle R.L & Gerba C.P. 1980.** Influence of estuarine sediment on virus survival under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980. 39:749-755.
43. **Melchers J.G. Willem, Jan Loll, Marco Tessari, Denis V. Bakhmutov, Anatoly P. Gmyl, Vadim I. Agol, Hans A. Heus, 2006,** A GCUA tetranucleotide loop found in the poliovirus *oriL* by in vivo SELEX (un)expectedly forms a YNMG-like structure: Extending the YNMG family with GYYA, RNA, Vol.12, p.1671-1682
44. **Melnick J.L., 1990,** Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology*, Second Edition (ed. Fields B.N.) p.549-605
45. **Martin J., E. Samoilovich, G. Dunn, A. Lackenby, E. Feldman, A. Heath, E. Svirchevskaya, G. Cooper, M. Yermalovich, and P. D. Minor. 2002.** Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* 76(21):1092-10928
46. **Nakajima M. 2003.** Adhesion and releasing of Poliovirus to activated sludge of wastewater purifying plants. *Water Sci. Technol.* 47(9):117-121.
47. **Oberste M. Steven, Kaija Maher, Alford J. Williams, Naomi Dybdahl-Sissoko, Betty A. Brown, Michelle S. Gookin, Silvia Panaranda, Nada Mishrik, Moyez Uddin and Mark A. Pallansch, 2006,** Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses, *Journal of General Virology*, Vol.87, p.119-128
48. **Oberste M. Steven, Kaija Maher, William A. Nix, Suzanne M. Michele, Moyez Uddin, Dabid Schnurr, Suleiman al-Busaidy, Chantal Akoua-Koffi, Mark A. Pallansch, 2007,** Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species *Human Enterovirus B*. *Virus Research*, Vol.128, p.34-42

49. **Oberste M.S., Maher K., and Pallansch M.A. 2004c** Evidence for frequent recombination within species Human Enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J. Virol.*, 78:855–867
50. **Oberste M.S., Michele S.M., Maher K., Schnurr D., Cisterna D., Uddin M., Norder H., Lau C.S., Chomel J.J., Magnius L., and Pallansch M.A. 2004a** .Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV 75.. *J. Gen Virol.*, 85:3205-3212
51. **Oberste M.S., Schnurr D., Maher K., Al-Busaidy S., and Pallansch M.A. 2001.** Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J. Gen. Virol.*, 82:409–416.
52. **Ochs Kerstin, Rene C. Rust, and Michael Niermann, 1999,** Translation Initiation Factor eIF4B Interacts with a Picornavirus Internal Ribosome Entry Site in both 48S and 80S Initiation Complexes Independently of Initiator AUG Location, *Journal of Virology*, Vol.73(9), p.7505-7514
53. **Ochs Kerstin, Lanja Saleh, Gergis Bassili, Volker H. Sonntag, Amandus Zeller, Michael Niepmann, 2002,** Interaction of Translation Initiation Factor eIF4B with the Poliovirus Internal Ribosome Entry Site, *J Virol*, Vol.76(5), p.2113-2122
54. **O' Brien R.T & Newman J.S. 1977.** Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:334.
55. **Parvin J.D., Smith F.I., Palese P. 1986.** Rapid RNA sequencing using double-stranded template DNA, SP6 polymerase, and 3'-deoxynucleotide triphosphates. *DNA.* 5(2):167-71
56. **Pavlov D.N., van Zyl W.B., van Heerden J., Grabow W.O.K. and Ehlers M.M. 2005.** Prevalence of vaccinederived polioviruses in sewage and river water in South Africa. *Water Res* (in press)
57. **Pfister T., and Wimmer E., 1999.** Characterization of nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* 274: 6992-7001
58. **Pollard M. & Connolly J. 1949.** pH stability of MME poliomyelitis. *Texas Rept. Biol. Med.* 7:92-95
59. **Ratka M., Lackmann M., Ueckermann C., Karlins U., and Koch G. 1989** Poliovirus-associated protein kinase:destabilization of the virus capsid and stimulation of the phosphorylation reaction by Zn²⁺. *J. Virol.*, 63:3954-3960.
60. **Rossmann M.G., Arnold E., Erickson J.W., Frankenberger E.A., Griffith J.P., Hecht H.J., Johnson J.E., Kamer G., Luo M., and Mosser A.G. 1985** Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, 317:145-153

61. **Rueckert R.R. 1985** Picornaviruses and their replication. In *Virology*, New York, Raven Press (ed. B.N. Fields) 1985:705-738
62. **Siafakas Nikolaos, Panayotis Markoulatos, Glyn Stanway, 2002**, Molecular Classification of Coxsackie A Viruses on the Basis of the 5'-UTR: Structural and Evolutionary Aspects, *J Mol Evol*, Vol.55, p.638-652
63. **Siafakas Nikolaos, Dimitrios Papaventsis, Stamatina Levidiotou-Stefanou, Nicholas C. Vamvakopoulos & Panayotis Markoulatos, 2005**, Classification and Structure of Echovirus 5'-UTR Sequences, *Virus Genes*, Vol.31(3), p.393-306
64. **Sharma Nidhi, Brian J. O'Donnell, and James B. Flanagan, 2005**, 3'-Terminal Sequence in Poliovirus negative-strand templates is the primary *cis*-acting element required for VPgpUpU-primed positive-strand initiation, *J. Virol.*, Vol 79(6), p.3565-3577
65. **Skinner, M., V. Racaniello, G. Dunn, J. Cooper, P. D. Minor, and J. W. Almond. 1989**. New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J. Mol. Biol.* Vol.207, p.379-392
66. **Sobsey M.D., Battigelli D.A., Shin G.A. and Newland S. 1998**. RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Wat Sci Technol* 38, 91-94.
67. **Sobsey M.D. and Meschke J.S. 2003**. Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of faecal or respiratory origin. Draft – August 21, 2003.
68. **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.* Vol.12, p.7859-7875
69. **Stanway G., 1990**, Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.*, Vol.71, p.2483-2501
70. **Sunnie R, Thompson and Peter Sarnow, 2003**, —Enterovirus 71 contains a type I IRES element that functions when eukaryotic initiation factor eIF4G is cleaved, *Virol* Vol.315 p.259-266
71. **Thoelen Inge, Moes Elien, Philippe Lemey, Sara Mostmans, Elke Wollants, A. Michael Lindberg, Anne-Mieke Vandamme, Marc Van Ranst, 2004**, Analysis of the Serotype and genotype Correlation of VP1 and the 5' Noncoding Region in an Epiidiomological Survey of the Human Enterovirus B Species, *J Clin Mic* Vol.42(3) p.963-971

72. **Ward C.D., Flanagan J.B. (1992).** Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J. Virol.* 66(6): 3784-93
73. **Ward R.L. & Ashley C.S. 1979.** Identification of the virucidal agent in wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:314322
74. **Wells, S. E., P. E. Hillner, R. D. Vale, and A. B. Sachs. 1998,** Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* Vol.2, p.135–140
75. **Wilhem SW, Jeffrey WH, Suttle CA, and Mitchell DL. 2002.** Estimation of biologically damaging UV levels in marine surface waters with DNA and viral dosimeters. *Photochem Photobiol.* 76(3):268-273.
76. **Xiao Chuan, Carol M. Bator, Valorie D. Bowman, Elizabeth Rieder, Yongning He, Benoît Hébert, Jordi Bella, Timothy S. Baker, Eckard Wimmer, Richard J. Kuhn, and Michael G. Rossmann, 2001,** Interaction of Coxsackievirus A21 with Its Cellular Receptor, ICAM-1, *Journal of Virology*, Vol. 75(5), p.2444-2451
77. **Yang, D., P. Cheung, Y. Sun, J. Yuan, H. Zhang, C. M. Carthy, D. M. Anderson, L. Bohunek, J. E. Wilson, and B. McManus, 2003,** A Shine-Dalgarno-like sequence mediates in vitro entry and subsequent scanning for translation initiation of coxsackievirus B3 RNA. *Virology* Vol.305, p.31-43
78. **Yates M.V. and Yates S.C. 1988.** Modelling microbial fate in the subsurface environment. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*, 17, No.4. 307-344.
79. **Yongning He, Paul R. Chipman, Jason Howitt, Carol M. Bator, Michael A. Whitt, Timothy S. Baker, Richard J. Kuhn, Carl W. Anderson, Paul Freimuth & Michael G. Rossmann, 2001,** Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor, *Nature Structural Biology* Vol.8, p.874-878
80. **Ypma-Wong M.F., Dewalt P.G., Johnson V.H., Lamb J.G., and Semler B.L. 1988a** Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology*, 166:265-270.
81. **Zell, R., and A. Stelzner. 1997,** Application of genome sequence information to the classification of bovine enteroviruses: the importance of 5'- and 3'-nontranslated regions. *Virus Res.* Vol.51, p.213-229

