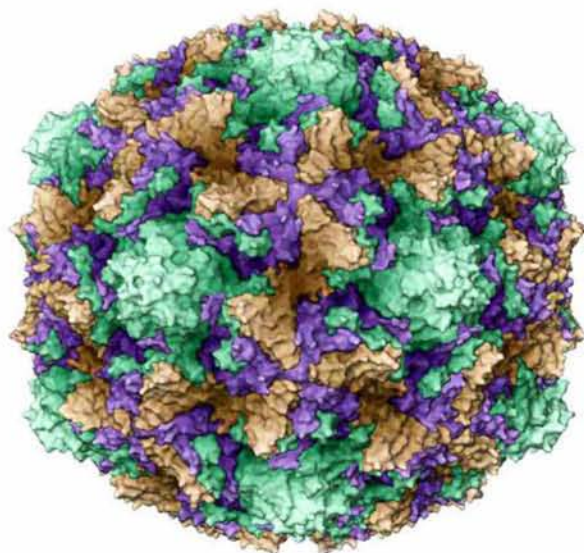


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕΤΑΞΥ
ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΖΑΧΑΡΟΥΛΑ Γ. ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ



ΛΑΡΙΣΑ 2010

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΟ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ν. ΚΑΤΗΣ

Καθηγητής Ιολογίας Φυτών
Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση
βιοδραστικών μορίων
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζαχαρούλα Γ. Κυριακοπούλου

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΜΕΤΑΞΥ
ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ**

*Στους γονείς μου,
Γιώργο και Βασιλική
και τα αδέλφια μου,
Ολυμπία και Ηλία*

Ζαχαρούλα Γ. Κυριακοπούλου

2010

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ
ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ
ΜΕΤΑΞΥ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

Αριθμός προκαταρτικών σελίδων: 11

Συνολικός αριθμός σελίδων: 145

Αριθμός πινάκων: 17

Αριθμός εικόνων: 72

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 206

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος των εντεροϊών ανήκει στην οικογένεια των Picornaviridae ιών. Σήμερα, οι εντεροϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο ταξινομούνται σε τέσσερις ομάδες: στο είδος A (HEVA), στο είδος B (HEVB), στο είδος C (HEVC), και στο είδος D (HEVD). Το καψίδιο των εντεροϊών δεν περιβάλλεται από λιπιδικό έλυτρο και εσωκλείει ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας, 7.500bp περίπου. Το γένωμα των εντεροϊών περιλαμβάνει τρεις κύριες περιοχές: την 5' μη κωδική περιοχή (5' untranslated region-5'UTR), το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame-ORF) και την 3' μη κωδική περιοχή (3' untranslated region-3'UTR). Η κωδική περιοχή του RNA (ORF) μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία περιέχει πληροφορίες για τις τέσσερις δομικές (VP1-VP4) και τις επτά λειτουργικές (2A-2C και 3A-3D) πρωτεΐνες του ιού.

Η μόλυνση με εντεροϊό ξεκινά από το πεπτικό σύστημα και ο πολλαπλασιασμός του ιού γίνεται στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και του εντέρου. Μολυσμένα άτομα μπορούν να εκκρίνουν σε μεγάλες ποσότητες εντεροϊούς στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων τους είτε είναι συμπτωματικοί είτε όχι και κατά συνέπεια μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, δεδομένου ότι με τη διασπορά τους σε ποτάμια, λίμνες και στη θάλασσα είναι δυνατόν να επανέλθουν στη τροφική αλυσίδα. Η παρακολούθηση του περιβάλλοντος έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην αποτίμηση του μεγέθους και της διάρκειας της κυκλοφορίας πολιοϊών σε συγκεκριμένους πληθυσμούς.

Από περιβαλλοντικά δείγματα έχουν απομονωθεί επίσης και ανασυνδυασμένα στελέχη πολιοϊών. Οι εντεροϊοί είναι γνωστοί για τους υψηλούς ρυθμούς εξέλιξης του γονιδιώματός τους, οφειλόμενοι κυρίως στις μεταλλάξεις και τους γενετικούς ανασυνδυασμούς. Από ανταλλαγές γενετικού υλικού μεταξύ των ιών μπορεί να προκύψει κάποιο ιδιαίτερα παθογόνο και επικίνδυνο στέλεχος, ικανό να προκαλέσει επιδημία. Η παρακολούθηση μέσω του περιβάλλοντος των εντεροϊών αποτελεί επίσης ένα σημαντικό εργαλείο για την μελέτη της εξέλιξης των εντεροϊών, μιας και μπορεί να απομονωθούν πληθώρα στελεχών τα οποία σχετίζονται με τα στελέχη που απομονώνονται από ασθενείς.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η απομόνωση εντεροϊών από περιβαλλοντικά δείγματα, η μελέτη του γονιδιώματός τους καθώς και η μελέτη γενετικών ανασυνδυασμών, ως ισχυρά γεγονότα της εξέλιξής τους. Αφού επιλέχθηκαν οι καταλληλότερες μέθοδοι για την ανίχνευση των εντεροϊών από περιβαλλοντικά δείγματα, εφαρμόστηκαν σε δείγματα μη επεξεργασμένων λυμάτων και νερού ποταμού. Εντεροϊοί ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 30,4% των λυμάτων. Τελικά, απομονώθηκαν εννιά εντεροϊοί, εκ των οποίων οι επτά απομονώθηκαν από λύματα και οι δύο από τον Πηνειό ποταμό. Η μελέτη του γονιδιώματος των απομονωθέντων στελεχών, καθώς επίσης και τριών στελεχών πολιοϊών, τα οποία απομονώθηκαν από κρούσματα πολιομυελίτιδας, ανέδειξε γεγονότα ανασυνδυασμού σε όλα τα στελέχη. Φαίνεται ότι ο ανασυνδυασμός παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη δημιουργία στελεχών με «μωσαϊκά» γονιδιώματα, με άγνωστες ιδιότητες, αφού κάποια από τα στελέχη που μελετήθηκαν έφεραν πολλαπλούς ενδο-οροτυπικούς και δια-οροτυπικούς ανασυνδυασμούς.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αισθάνομαι ιδιαίτερα τυχερή που είχα μέντορα και καθοδηγητή έναν αξιόλογο επιστήμονα και άνθρωπο, τον καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτο. Του οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και με μύησε στον κόσμο της ιολογίας. Η καθημερινή του παρουσία, οι εύστοχες παρατηρήσεις του, η επιστημονική του καθοδήγηση, η εμπύχωσή του στις δυσκολίες σε συνδυασμό με τον ευγενή του χαρακτήρα αποτέλεσαν πολύτιμη βοήθεια στην αντιμετώπιση κάθε σκοπέλου που συνάντησα.

Ένα ευχαριστώ επίσης στον καθηγητή Ζήση Μαμούρη και στον αναπληρωτή καθηγητή Κωνσταντίνο Σταθόπουλο για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή της παρούσας διατριβής και για τη συμβολή τους σε αυτήν. Ευχαριστώ ακόμη τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τους καθηγητές Νίκο Κατή και Δημήτρη Κουρέτα, τον αναπληρωτή καθηγητή Δημήτρη Κομιώτη και το λέκτορα Δημήτρη Μόσιαλο για το χρόνο που αφιέρωσαν στην ανάγνωση, στη διόρθωση και στην εκτίμηση αυτής της εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στους συναδέρφους Βάϊα Πλιάκα και Δημήτρη Τσακογιάννη, όπως και σε όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές, με τους οποίους συνεργάστηκα, για το εξαιρετικά φιλικό κλίμα στο εργαστήριο. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στο συνάδελφο και φίλο Βαγγέλη Δεδεψίδη για την άψογη συνεργασία μας καθόλη τη διάρκεια της διατριβής, με τον οποίο μοιραστήκαμε ευχάριστες αλλά και δύσκολες στιγμές.

Θα ήταν παράληψη από μέρους μου αν δεν ευχαριστούσα τις φίλες Εύη Κακάνη, Κωνσταντίνα Τσουμάνη και Ματίνα Γιαννούλη που ήταν δίπλα μου σε χαρές, λύπες, ανησυχίες και απογοητεύσεις και για την πολύτιμη ηθική και ψυχολογική βοήθεια που απλόχερα μου προσέφεραν. Τις ευχαριστώ επίσης για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε εντός και εκτός του πανεπιστημίου στα πλαίσια μιας γνήσιας φιλίας. Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τις επιστήθιες φίλες μου Νικολέτα Καραγιάννη και Χαρά Επισκόπου που βρίσκονταν τόσο κοντά μου παρά τα χιλιόμετρα που μας χώριζαν.

Αφήνω τελευταίο το πιο βαθύ από ψυχής ευχαριστώ στους γονείς μου, Γιώργο και Βασιλική, που στάθηκαν ηθικοί και οικονομικοί αρωγοί όχι μόνο στην

ολοκλήρωση του διδακτορικού αλλά και σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Τους ευχαριστώ επίσης για όλες τις συνθήκες που δημιούργησαν για να βρίσκομαι σε αυτή τη θέση. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στα αδέρφια μου, Ολυμπία και Ηλία για τη δύναμη που μου έδιναν όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	1
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	2
1.3 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	3
1.3.1 Δομή καψιδίου	3
1.3.2 Το γονιδίωμα των εντεροϊών.....	6
1.3.2.1 Η 5΄ μη κωδική περιοχή (5΄UTR)	7
1.3.2.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης - δομική περιοχή	9
1.3.2.3 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης - λειτουργικές πρωτεΐνες	9
1.3.2.4 Η 3΄ μη κωδική περιοχή (3΄UTR)	13
1.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	14
1.5 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	16
1.5.1 Πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς - είσοδος στα κύτταρα.....	16
1.5.2 Μετάφραση	18
1.5.3 Πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης	19
1.5.4 Αντιγραφή	19
1.5.5 Καψιδίωση - Δημιουργία ιικών σωματιδίων.....	21
1.6 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ - ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ.....	22
1.7 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	23
1.8 ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	23
1.9 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	26
1.9.1 Κλινικά δείγματα.....	26
1.9.2 Περιβαλλοντικά δείγματα	26
1.9.3 Κυτταρικές σειρές	26
1.9.4 Οροτυπική Ταυτοποίηση.....	27
1.9.5 Μοριακές τεχνικές.....	28
1.10 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	29
1.10.1 Μεταλλάξεις.....	29
1.10.2 Ανασυνδυασμοί στους πολιοϊούς.....	30

1.10.3 Ανασυνδυασμοί στους μη πόλιο-εντεροϊούς	31
1.10.4 Μηχανισμοί ανασυνδυασμών	33
1.11 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	37
2.1.1 Πρότυπα στελέχη	37
2.1.2 Πειραματικά στελέχη	39
2.2 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	42
2.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ	43
2.4 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	44
2.4.1 Μέθοδος διαχωρισμού δυο φάσεων	44
2.4.2 Μέθοδος καθίζησης με PEG	45
2.4.3 Μέθοδος προσρόφησης - έκλυσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα	45
2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΩΝ	46
2.5.1 Κυτταροκαλλιέργειες	46
2.5.2 Ενοφθαλμισμός κλινικών δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες	48
2.5.3 Ενοφθαλμισμός περιβαλλοντικών δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες	48
2.5.4 Σειριακές αραιώσεις	49
2.5.5 Υπολογισμός ιικού τίτλου	50
2.6 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA	51
2.7 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ	51
2.8 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ	52
2.9 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	58
2.9.1 PCR	58
2.9.2 semi-nested PCR	58
2.10 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ RT-PCR	60
2.11 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ	60
2.12 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	61
2.12.1 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	61
2.12.2 Αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας	61
2.12.3 Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών	62
2.12.4 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων	62

2.12.5 Ανάλυση ανασυνδυασμών	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
3.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ semi nested-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	65
3.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	65
3.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ - ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ.....	66
3.3.1 Ταυτοποίηση απομονωθέντων στελεχών	67
3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ Kats, Hal ΚΑΙ Kar	69
3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LR11F7	77
3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LR31G7	87
3.7 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ LR51A5 ΚΑΙ LR61G3	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	111
4.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ semi nested-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	111
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ - ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	112
4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ Kats, Hal ΚΑΙ Kar	118
4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LR11F7	122
4.5 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LR31G7	125
4.6 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ LR51A5 ΚΑΙ LR61G3	128
4.7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	131
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	133
ABSTRACT	147
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	149

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ



Εικόνα 1.1. Επικήδειος στήλη που παρουσιάζει τον ιερέα Siptah με τυπική ένδειξη παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών της οικογένειας των Picornavirales. Η ιστορία τους ξεκινά με την ιστορία των πολιοϊών. Η παλαιότερη καταγραφή ιογενούς λοίμωξης βρίσκεται σε μια επικήδειο στήλη από το μεσαίο βασίλειο της Αιγύπτου της περιόδου της δυναστείας του Ραμσή, περίπου το 1400 π.Χ. (εικόνα 1.1). Η συγκεκριμένη στήλη δείχνει τον ιερέα Siptah με την οικογένειά του και μπορεί κανείς να διακρίνει το αδυνατισμένο και παραλυτικό άκρο του ιερέα, τυπική ένδειξη παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Η πρώτη κλινική περιγραφή της πολιομυελίτιδας έγινε γύρω στο 1800, με αναφορές σε παράλυση και πυρετό. Αναγνωρίστηκε ως ιική νόσος το 1909 από τους Landsteiner και Popper, ενώ ο ιός απομονώθηκε για πρώτη φορά, στη δεκαετία του 1930. Έπειτα από πολλές μελέτες στη βιολογία των πολιοϊών, δημιουργήθηκαν αρκετά εμβόλια, εκ των οποίων τα πιο γνωστά είναι το Salk, αδρανοποιημένο εμβόλιο (inactivated polio vaccine, IPV), και το Sabin, εξασθενημένο εμβόλιο (oral polio vaccine, OPV), η χρήση των οποίων οδήγησε στη παγκόσμια εξάλειψη της πολιομυελίτιδας.

Η πρώτη απομόνωση Coxsackie A ιών (CAV) έγινε κατά τη διάρκεια επιδημίας πολιομυελίτιδας το 1948 από κόπρανα παιδιών με παράλυση στο Coxsackie της Νέας Υόρκης (Dalldorf and Sickles, 1948). Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν ύστερα από ενοφθαλμισμό σε ποντίκια, με εντελώς διαφορετική παθογένεια από αυτή των πολιοϊών. Τον επόμενο χρόνο απομονώθηκε από ασθενείς με άσηπτη μηνιγγίτιδα ο πρώτος Coxsackie B ιός (CBV) (Melnick et al., 1949). Τα απομονωθέντα στελέχη Coxsackie A ιών προκαλούσαν χαλαρή

παράλυση στα πίσω άκρα σε νεογνά ποντίκια, ενώ οι Coxsackie B ιοί προκαλούσαν σπαστική παράλυση και γενικευμένη μόλυνση στον εγκέφαλο, την καρδιά, το πάγκρεας και το λιπώδη ιστό.

Το 1951 καταγράφηκε η απομόνωση Echo ιών από κόπρανα ασυμπτωματικών ασθενών. Το όνομά τους (από τα αρχικά των λέξεων Enteric Cytopathic Human Orphan) το πήραν επειδή δεν μπορούσαν να συνδεθούν με κάποια έως τότε γνωστή ασθένεια. Μετέπειτα μελέτες όμως, τους συνδέουν με πληθώρα ανθρώπινων ασθενειών.

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των Picorna ιών. Οι Picorna ιοί, όπως δηλώνει και η ονομασία τους (Pico: μικρός + RNA), αποτελούν μια ευρεία οικογένεια μικρών, μη ελντροφόρων RNA-ιών θετικής πολικότητας, η οποία περιλαμβάνει αρκετά παθογόνα στελέχη για τον άνθρωπο και για άλλα είδη θηλαστικών. Οι Picorna ιοί διαχωρίζονται σε εννέα γένη: τους Εντεροϊούς (Enteroviruses), τους Ρινοϊούς (Rhinoviruses), τους ιούς της Ηπατίτιδας Α (Hepatoviruses), τους Καρδιοϊούς (Cardioviruses), τους Παρεκοϊούς (Parechoviruses), τους Κομπουϊούς (Kobuviruses), τους Ερμποϊούς (Erboviruses), τους Αφθοϊούς (Aphthoviruses) και τους Τεσκοϊούς (Tescoviruses) (King et al., 2000). Τα τρία τελευταία γένη δεν παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Κάθε γένος αποτελείται από διακριτά ως προς την αντιγονικότητα στελέχη και μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί περίπου 230 ορότυποι Picorna ιών.

Τα μέλη του γένους των εντεροϊών διακρίνονται, με βάση την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή τους, σε 80 αντιγονικά διακριτούς ορότυπους, οι οποίοι με βάση την παθογένειά τους στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα χωρίζονται σε τέσσερα είδη: τους Πολιοϊούς (PV, ορότυποι 1-3), τους Coxsackie A ιούς (CAV, ορότυποι 1-24), τους Coxsackie B ιούς (CBV, ορότυποι 1-6) και τους Echo ιούς (E, ορότυποι 1-33) (Knipe and Howley, 2007). Αυτό το σύστημα ταξινόμησης κατέρρευσε όταν άρχισαν να ανακαλύπτονται ιοί αντιγονικά όμοιοι με τους Echo ιούς, οι οποίοι όμως προκαλούσαν ασθένειες σε ποντίκια και ανθρώπους. Έτσι λοιπόν οι νέοι εντεροϊοί που απομονώνονταν αριθμούνταν, ξεκινώντας από τον Εντεροϊό 68 (EV68).

Παρά τη σπουδαιότητα των αντιγονικών ιδιοτήτων των ιών, η ανάπτυξη μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης και η επανεκτίμηση του παλιού συστήματος ταξινόμησης, οδήγησε στην ανάπτυξη ενός νέου συστήματος, βάση του οποίου το γένος των Εντεροϊών χωρίζεται σε 8 είδη (King et al., 2000), εκ των οποίων τα πέντε (Poliovirus και Human enterovirus A-D) παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Ύστερα από πρόσφατες μελέτες που αποδείκνυαν τη στενή φυλογενετική σχέση των Πολιοϊών με τους εντεροϊούς της ομάδας C (Brown et al., 2003), εντάχθηκαν στην ομάδα αυτή. Αναλυτικότερα, οι ανθρώπινοι εντεροϊοί ταξινομούνται πλέον ως εξής: στο είδος A (HEVA), όπου ανήκουν οι Cocksackie ιοί A2-A8, A10, A12, A14, A16, και οι Εντεροϊοί EV71, EV76, EV89 -EV91, στο είδος B (HEVB), που περιλαμβάνει τους Cocksackie ιούς B1-B6, A9, τους Echo ιούς E1-E9, E11-E21, E24-E27, E29-E33 και τους πιο πρόσφατα ανακαλυφθέντες εντεροϊούς EV69, EV73-EV75, EV77-EV88, EV93, EV97, EV98, EV100, EV101, EV106, EV107, στο είδος C, όπου ανήκουν οι τρεις ορότυποι των Πολιοϊών PV1-PV3, οι Cocksackie ιοί A1, A11, A13, A17, A19-A22, A24 και οι εντεροϊοί EV95, EV96, EV99, EV102, EV104 και EV-105, και τέλος στο είδος D (HEVD), που περιλαμβάνει τους εντεροϊούς EV68, EV70 και EV94.

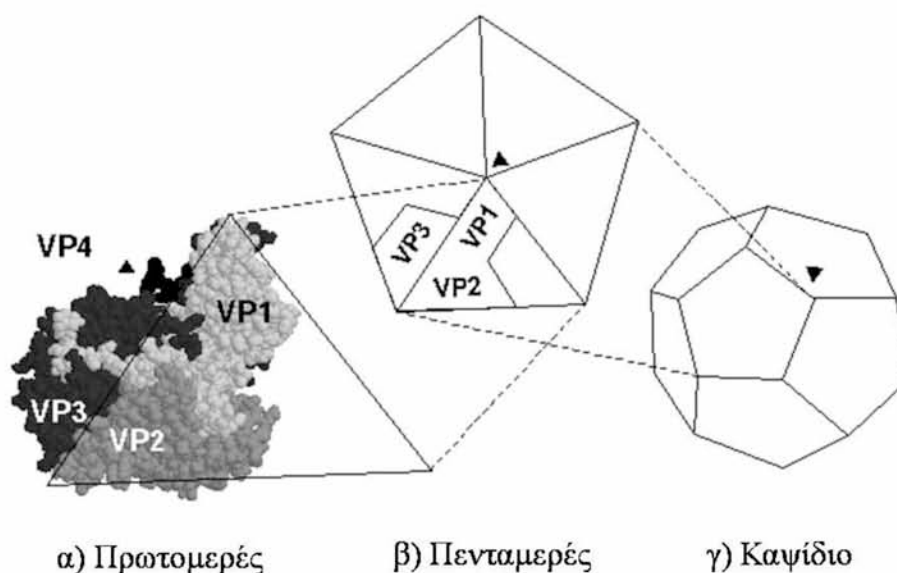
1.3 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Τα ιϊκά σωματίδια των εντεροϊών είναι σφαιρικά διαμέτρου περίπου 30nm και δεν περιβάλλονται από λιπιδικό έλυτρο. Το καψίδιο των εντεροϊών είναι ανθεκτικό σε όξινα περιβάλλοντα (pH~3), γεγονός που τους επιτρέπει την επιτυχή διέλευσή τους από το στομάχι στο έντερο, όπου και πολλαπλασιάζονται. Εσωτερικά του καψιδίου βρίσκεται το γονιδίωμα του ιού, ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας.

1.3.1 Δομή καψιδίου

Το καψίδιο των εντεροϊών συνίσταται από 60 αντίγραφα καθεμιάς από τις τέσσερις δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4 (Pfister et al., 1999). Κατά την διάρκεια της πρωτεόλυσης, η πρόδρομος πρωτεΐνη P1 των δομικών πρωτεϊνών διαχωρίζεται στα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3 και VP1 τα οποία δημιουργούν πενταμερή [(VP0,VP3,VP1)₅]. Δώδεκα από τα πενταμερή αυτά δημιουργούν το «προκαψίδιο» [(VP0,VP3,VP1)₅]₁₂. Το τελευταίο στάδιο

ωρίμανσης του καψιδίου αποτελείται από τον αποχωρισμό της VP4 από την VP0 δημιουργώντας την VP2. Η VP4 είναι η μικρότερη καψιδιακή πρωτεΐνη και βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια του καψιδίου, κάτω από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Το κάθε πενταμερές σταθεροποιείται από ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του καρβοξυτελικού και αμινοτελικού άκρου των VP1 και VP3 μαζί με την VP4. Γειτονικά πενταμερή συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τμημάτων των VP2 και VP3. Η ύπαρξη αυτών των σχετικά χαλαρών δεσμών μεταξύ των καψιδιακών πρωτεϊνών φαίνεται να είναι σημαντική στην αποδιάταξη του καψιδίου των ιών και στην απελευθέρωση του γενετικού τους υλικού κατά την είσοδο στο κύτταρο ξενιστή (Stanway, 1990).



Εικόνα 1.2. Αναπαράσταση της δομής του ιικού καψιδίου. Παρουσιάζεται η δομή του πρωτομερούς και του πενταμερούς.

Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του πολιοϊού τύπου 1 (PV1) μέσω κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X, βοήθησε στην κατανόηση της δομής των καψιδιακών πρωτεϊνών (Hogle et al., 1985). Οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 παρουσιάζουν παρόμοια τριτοταγή διαμόρφωση, αν και δεν εμφανίζουν ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία. Αποτελούνται από μια οκτάκλινη κατασκευή β-βαρελίου και διαφέρουν κυρίως στο μέγεθος των θηλειών (loops) και άλλων λεπτομερειών που βρίσκονται στα β-φύλλα, τα οποία αποτελούν τη δομή του πυρήνα της κατασκευής.

Η εξωτερική επιφάνεια του ιού χαρακτηρίζεται από προεξοχές και αυλακώσεις. Σημαντικότερη είναι μια βαθιά «αυλάκωση» (canyon), η οποία διαμορφώνεται στην σύνδεση της VP1 με τη VP3 και εντοπίζεται περιμετρικά του άξονα πενταπλούς συμμετρίας (Knipe and Howley, 2007). Έχει προταθεί ότι στην «αυλάκωση» αυτή εντοπίζεται η θέση πρόσδεσης των υποδοχέων των κυττάρων ξενιστών, αποτελώντας ταυτόχρονα μια στρατηγική για την αποφυγή ανοσολογικής παρέμβασης από τον οργανισμό ξενιστή (Stanway, 1990). Πιο συγκεκριμένα, οι μικρές διαστάσεις της «αυλάκωσης» δεν επιτρέπουν την αναγνώριση εσωτερικών περιοχών της από τα σχετικά ογκώδη αντισώματα. Παράλληλα, φέρει στο εσωτερικό της, κατάλληλες περιοχές που μπορούν να ενωθούν με αρκετά μικρότερα, συγκεκριμένα τμήματα που προεξέχουν από τους κυτταρικούς υποδοχείς, επιτρέποντας έτσι την αναγνώριση και προσκόλληση του ιού στο κύτταρο. Οι περιοχές αυτές στο εσωτερικό της αυλάκωσης, λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασής τους με τους κυτταρικούς υποδοχείς δεν έχουν δυνατότητα εξελικτικής ποικιλομορφίας και παραμένουν φυλογενετικά σταθερές μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Αντίθετα, περιοχές του ιικού καψιδίου που δεν έχουν μεγάλη λειτουργική σημασία για τον ιό, παραμένουν στερεοδομικά απροστάτευτες στην περιφέρεια της «αυλάκωσης» και λειτουργούν ως επίτοποι. Όμως, η αποφυγή της ανοσολογικής αντίδρασης επιτυγχάνεται με την μεγάλη ευμεταβλητότητα των περιοχών αυτών, λόγω της ανοχής μεγάλου ρυθμού μεταλλάξεων στις αντίστοιχες περιοχές του γονιδιώματος, που οδηγούν στην εξέλιξη νέων οροτύπων.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της «αυλάκωσης» είναι η ύπαρξη μιας υδρόφοβης εσοχής (hydrophobic pocket) στο κάτω μέρος της. Η εσοχή αυτή περιέχει σφιγγοσίνη και πιστεύεται ότι ελέγχει την ικανότητα του καψιδίου να πραγματοποιεί δομικές μεταβολές κατά την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, με σκοπό την απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κυτταρικό περιβάλλον (Filman et al., 1989). Η εσοχή αυτή αποτελεί επίσης τη θέση δέσμευσης πολλών φαρμάκων κατά των Picorna ιών, εμποδίζοντας έτσι είτε την προσκόλληση του ιού είτε την απελευθέρωση του ιικού γενώματος.

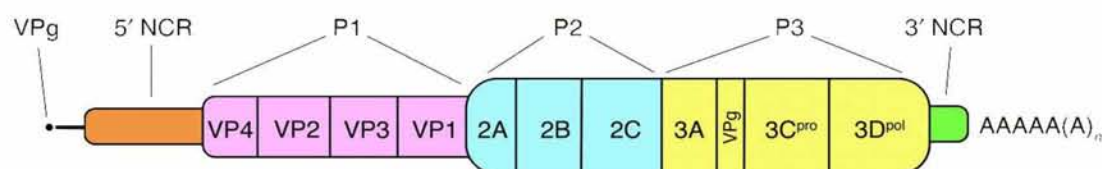
Οι ποικίλοι ιικοί ορότυποι καθορίζονται από τις θηλιές των καψιδιακών πρωτεϊνών, οι οποίες προεξέχουν στην επιφάνεια του καψιδίου. Αυτές περιέχουν τις κυριότερες αντιγονικές θέσεις του ιού, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλό

ρυθμό μεταλλάξεων, παρέχοντας έτσι το ρόλο της αντιγονικής ποικιλίας στους εντεροϊούς (Minor et al., 1986).

1.3.2 Το γονιδίωμα των εντεροϊών

Το γονιδίωμα των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο RNA μόριο, θετικής πολικότητας, το οποίο έχει μήκος 7.500 νουκλεοτίδια περίπου. Το ιικό RNA θεωρείται μολυσματικό, γιατί με την είσοδό του στο κύτταρο είναι μεταγραφικά ενεργό κωδικοποιώντας για όλες τις πρωτεΐνες του ιού. Το γένωμα των εντεροϊών περιλαμβάνει τρεις κύριες περιοχές: την 5' μη κωδική περιοχή (5' untranslated region-5'UTR), το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame-ORF) και την 3' μη κωδική περιοχή (3' untranslated region-3'UTR) (εικόνα 1.3). Στο 5' άκρο υπάρχει ομοιοπολικά συνδεδεμένη η VPg (Virion Protein, genome linked) ική πρωτεΐνη, ενώ στο 3' άκρο βρίσκεται η πολυαδενυλιωμένη περιοχή (εικόνα 1.3).

Η 5'UTR περιοχή, μήκους περίπου 750 νουκλεοτιδίων, περιέχει συντηρημένα τμήματα δευτεροταγών δομών παίζοντας σημαντικό ρόλο στη μετάφραση και αντιγραφή του ιού. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη περίπου 2.100 κωδικονίων, η οποία περιέχει πληροφορίες για τις τέσσερις δομικές (VP1-VP4) και τις επτά λειτουργικές (2A-2C και 3A-3D) πρωτεΐνες του ιού καθώς και για τις ενδιάμεσες ικές πρωτεΐνες όπως οι VP0, 2BC, 3AB και 3CD (Knipe and Howley, 2007). Η 3' UTR αποτελείται από 62 νουκλεοτίδια και στη συγκεκριμένη περιοχή εδράζεται μια χαρακτηριστική RNA δευτεροταγής δομή θηλιάς, η οποία πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην αντιγραφή του ιικού γενώματος (Jacobson et al., 1993). Η poly(A) ουρά έχει κατά μέσο όρο μήκος περίπου 60 νουκλεοτίδια και συμμετέχει στις διαδικασίες της αντιγραφής και μετάφρασης του ιικού γενώματος.



Εικόνα 1.3. Χάρτης του γονιδιώματος των εντεροϊών. Στο 5' άκρο της 5'UTR είναι προσδεμένη η VPg πρωτεΐνη, κωδικοποιούμενη από τον ίδιο τον ιό και στο 3' άκρο της 3'UTR βρίσκεται η πολυαδενυλιωμένη περιοχή. Η κωδική περιοχή χωρίζεται σε τρία τμήματα, τα P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού.

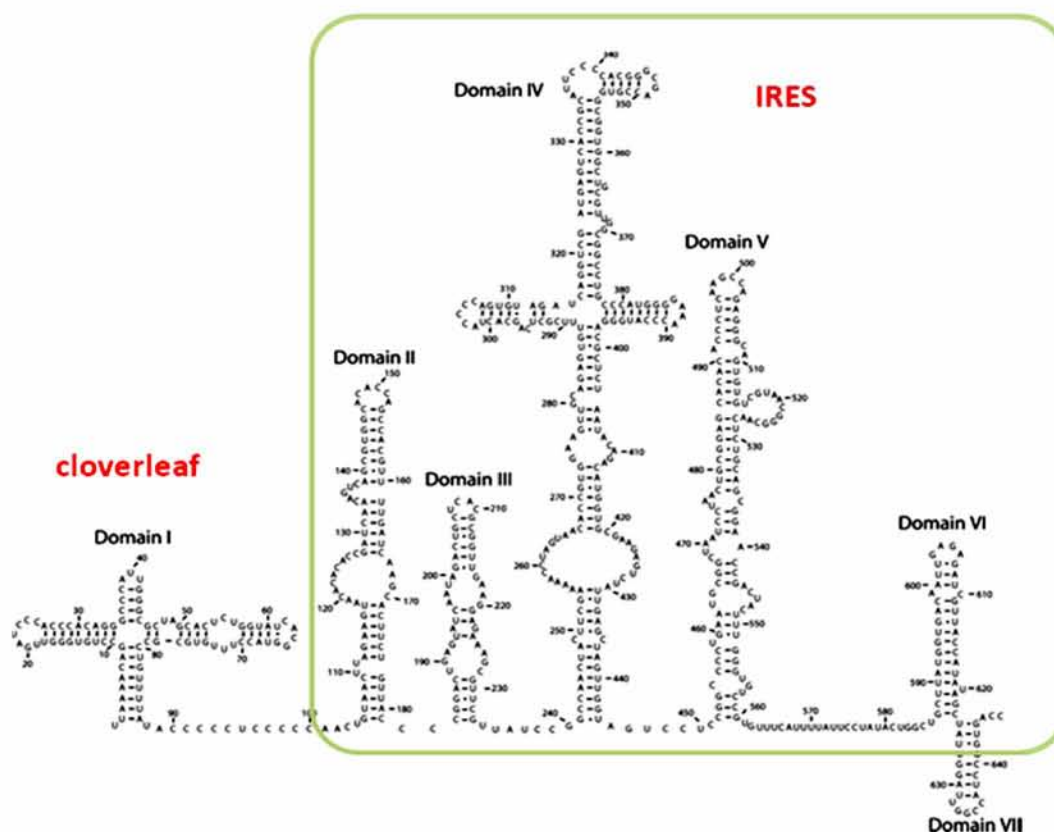
1.3.2.1 Η 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR)

Η 5'UTR των εντεροϊών και γενικά των Picorna ιών, έχει αρκετά μεγάλο μήκος σε σχέση με τις αντίστοιχες περιοχές άλλων ιών ή κυττάρων. Αποτελεί το 8-12% του γενώματός τους και παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία των βάσεων μεταξύ κοντινών φυλογενετικά ιών (Stanway et al., 1984). Το γεγονός ότι περιέχει μεγάλες περιοχές πλήρως ή μερικώς συντηρημένες, υποδηλώνει ότι η 5'UTR διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο, που είναι άμεσα συνδεδεμένος με την αλληλουχία της περιοχής αυτής, υπεύθυνης για τον εγκλεισμό του RNA στο ιικό καψίδιο και τον πολλαπλασιασμό του ιού. Οι συντηρημένες αυτές περιοχές της 5'UTR έχουν χρησιμοποιηθεί και σαν στόχος εκκινητικών μορίων στη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση μεγάλου εύρους εντεροϊών (Siafakas et al., 2000).

Ένα χαρακτηριστικό της 5'UTR περιοχής των εντεροϊών (και γενικά όλων των Picorna ιών) είναι η μεγάλη περιεκτικότητά της σε νουκλεοτίδια με αζωτούχες βάσεις την γουανίνη και την κυτοσίνη σε σύγκριση με το υπόλοιπο γένωμα (Stanway et al., 1984), γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη δευτεροταγούς δομής. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.4, η 5'UTR περιοχή των εντεροϊών αποτελείται από επτά δομικά στοιχεία (domain I-VII) και διακρίνεται σε τρία τμήματα: στη δομή με σχήμα τριφυλλιού (cloverleaf, domain I), στο Internal Ribosome Entry Site (IRES, domain II-VI) και τέλος στο τμήμα που περιέχει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης.

Το cloverleaf αποτελεί μια δομή σχήματος τριφυλλιού η οποία είναι σημαντική για τη σταθερότητα του RNA και για την έναρξη της αντιγραφής του θετικής πολικότητας κλώνου (Melchers et al., 2006). Η δομή αυτή είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των εντεροϊών και των ρινοϊών και αποτελείται από 4 δομές μίσχου – θηλιάς τις A, B, C και D. Στην περιοχή B συνδέεται η κυτταρική πρωτεΐνη PCBP2 (poly (rC)-binding protein 2), σταθεροποιώντας το ιικό RNA. Επίσης, επιτυγχάνεται η κυκλοποίηση του ιικού γενώματος, που είναι απαραίτητη για τη μετάφραση και την αντιγραφή του ιού, μέσω της αλληλεπίδρασης των PCBP2 (προσδεσμένη σε cloverleaf) και της Poly (A) binding protein (PABP) η οποία είναι προσδεσμένη στην poly(A) ουρά (Herold and Andino, 2001). Η περιοχή D αναγνωρίζεται από την ιική πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD και έτσι δημιουργείται ένα σύμπλεγμα μεταξύ του 5'-άκρου-PCBP-3CD το οποίο

λειτουργεί σαν μοριακός διακόπτης συντονίζοντας τη μετάβαση από τη μετάφραση του ιικού γενώματος στην αντιγραφή. Πιο συγκεκριμένα, η πρόσδεση μόνο της PCBP2 στο cloverleaf ευνοεί τη μετάφραση του ιικού γενώματος, ενώ η πρόσδεση της ιικής πρωτεΐνης 3CD μαζί με την PCBP2 στο cloverleaf οδηγεί στο σταμάτημα της μετάφρασης και στην έναρξη της αντιγραφής (Gamarnic and Andino, 1998).



Εικόνα 1.4. Δευτεροταγής δομή της 5'UTR του CBV3.

Το IRES απαρτίζεται από πέντε διακριτά δομικά RNA στοιχεία (II-VI) και παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης, αποτελώντας το κύριο παράγοντα για τον τροπισμό και την παθογένεια των ιών (Kauder and Racaniello, 2004). Η προαγωγή της μετάφρασης επιτελείται μέσω της πρόσδεσης των ριβοσωμάτων και των κυτταρικών παραγόντων μετάφρασης στο εσωτερικό του IRES και της μετακίνησής τους μέχρι το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Πιο συγκεκριμένα, κυτταρικές πρωτεΐνες [La, Unr, PCBP2 και Polypyrimidine Tract-Binding protein (PTB)], οι οποίες εδράζουν στον πυρήνα όπου και εκτελούν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες, περνούν στο κυτταρόπλασμα με την είσοδο του ιού στο κύτταρο και προσδένονται στο IRES. Στη συνέχεια, ο μεταφραστικός

παράγοντας SRp20, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με ριβοσώματα, προσδένεται στην PCBP2 αλληλεπιδρώντας έτσι με το IRES. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για τη «στρατολόγηση» των ριβοσωμάτων στο IRES (Sharma et al., 2004).

Η τελευταία περιοχή της 5'UTR, αν και η ακριβής λειτουργία της είναι ακόμα άγνωστη, περιέχει πολλές τριπλέτες AUG πριν από το σημείο έναρξης της μετάφρασης, καθώς επίσης και το ίδιο το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (Witwer et al., 2001).

1.3.2.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης - δομική περιοχή

Η δομική περιοχή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (P1) κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του ιού, VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες αποτελούν τα δομικά στοιχεία του ιικού καψιδίου (περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 1.3.1 Δομή καψιδίου). Η P1 γενωμική περιοχή παρέχει αξιόπιστη συσχέτιση της αλληλουχίας με τον ορότυπο. Η συσχέτιση του οροτύπου με το γενότυπο φαίνεται να ισχύει και ξεχωριστά για κάθε δομικό γονίδιο, με εξαίρεση τη VP4 γενωμική περιοχή. Μοριακές μελέτες προτείνουν ότι η νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής μπορεί να χρησιμοποιηθεί ασφαλώς για τη ταυτοποίηση των διαφόρων οροτύπων εντεροϊών (Oberste et al., 1999).

1.3.2.3 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης - λειτουργικές πρωτεΐνες

Η λειτουργική περιοχή του γονιδιώματος των πολιοϊών κωδικοποιεί πρωτεΐνες (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) καθώς και λειτουργικά ενδιάμεσα των πρωτεϊνών αυτών (2BC, 3AB, 3CD), που εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή, στην επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης, στην αναστολή των κυτταρικών λειτουργιών, στην αλλαγή διαμόρφωσης των κυτταρικών μεμβρανών και στη δημιουργία κυστιδίων.

Η **2A πρωτεάση (2A^{pro})** πραγματοποιεί το πρωταρχικό ρήγμα στην πολυπρωτεΐνη. Το πρωτεολυτικό αυτό ρήγμα δημιουργείται στο δικό της αμινοτελικό άκρο, στα όρια P1-P2, διαχωρίζοντας έτσι τις πρόδρομες πρωτεΐνες του καψιδίου από αυτές των μη δομικών πρωτεϊνών (Toyoda et al., 1986). Έχει επίσης υποστηριχτεί ότι η 2A^{pro} αναγνωρίζει μια δεύτερη θέση πρωτεόλυσης, στην πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD^{pro} με αποτέλεσμα να οδηγεί στη παραγωγή των

προϊόντων 3C και 3D. Η 2A^{pro} υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ τυροσίνης (Tyr) και γλυκίνης (Gly). Στην πρωτεάση αυτή υπάρχει η καταλυτική τριάδα αμινοξέων αποτελούμενη από κυστεΐνη (Cys), ιστιδίνη (His) και ασπαραγινικό οξύ (Asp), η οποία διατηρείται φυλογενετικά σε διαφορετικούς εκπροσώπους των εντεροϊών (Bazan and Fletterick, 1988).

Η 2A^{pro} φαίνεται επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιικού RNA, διεγείροντας την έναρξη σύνθεσης της αρνητικής αλυσίδας, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στη σύνθεση της αλυσίδας θετικής πολικότητας. Ο τρόπος με τον οποίο η 2A^{pro} επιτυγχάνει κάτι τέτοιο δεν είναι γνωστός, αλλά είναι πιθανό η πρωτεάση να μπορεί να τροποποιεί μια κυτταρική πρωτεΐνη που απαιτείται για τη σύνθεση της αρνητικής αλυσίδας RNA (Jurgens et al., 2006).

Η 2A^{pro} αποκόπτει το αμινοτελικό άκρο των παραγόντων eIF4GI και eIF4GII, καθώς και το καρβοξυτελικό άκρο της PABP (Ventoso et al., 1998) με αποτέλεσμα τη διακοπή της κυτταρικής μετάφρασης. Η διακοπή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης από την 2A^{pro} έχει ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση γονιδίων απαραίτητων για τη βιωσιμότητα του κυττάρου, γεγονός που με τη σειρά του οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης μέσω της κασπάσης 3 (Calandria et al., 2004).

Η **2B πρωτεΐνη** είναι μικρή, υδρόφοβη και εμπλέκεται σε αρχικό στάδιο της σύνθεσης του ιικού RNA. Αλλαγές στη 2B πρωτεΐνη των πολιοϊών και των Cocksackie ιών οδήγησαν σε ιούς με ελλιπή δυνατότητα αντιγραφής (van Kuppeveld et al., 1995). Το καρβοξυτελικό άκρο της 2B περιέχει μια υδρόφοβη περιοχή, η οποία συνδέει τη πρωτεΐνη με κυτταρικές μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και του συμπλέγματος Golgi. Λόγω της ικανότητάς της να αυξάνει τη διαπερατότητα των μεμβρανών (Madan et al., 2008), προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση των μεμβρανών, τόσο των ενδοκυττάρων όσο και της πλασματικής, και αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca²⁺ και άλλων δισθενών ιόντων, οδηγώντας στην απόπτωση του κυττάρου.

Η **2C πρωτεΐνη** είναι σε υψηλό βαθμό διατηρημένη μεταξύ διαφορετικών ειδών και περιέχει περιοχές πρόσδεσης σε μεμβράνες, στο RNA καθώς και σε νουκλεοτίδια. Η 2C φαίνεται να συμμετέχει στην έναρξη της αντιγραφής του ιικού RNA και συγκεκριμένα στην αντιγραφή της αρνητικής πολικότητας αλυσίδας, ενώ δε φαίνεται να επηρεάζει τη σύνθεση της θετικής πολικότητας αλυσίδας, ούτε και την επιμήκυνση των RNA μορίων (Barton and Flanagan,

1997). Η 2C πρωτεΐνη, σε συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες του ιού, συμβάλει στη δημιουργία του συμπλόκου αντιγραφής και στη σταθεροποίησή του στις μεμβράνες του κυττάρου ξενιστή, όπου και αντιγράφεται το γενετικό υλικό του ιού (Bienz et al., 1990, Teterina et al., 2006). Με την ιδιότητά της ως ATPase και GTPase συμβάλει επίσης, εκτός από τον πολλαπλασιασμό του ιού (Pfister and Wimmer, 1999), και στον προσδιορισμό της δομής του καψιδίου (Li and Baltimore, 1990).

Η **2BC πρωτεΐνη** αποτελεί το πρόδρομο μόριο των 2B και 2C πρωτεϊνών. Αρκετό ποσοστό της 2BC δεν υδρολύεται κατά τη μόλυνση του κυττάρου, καθώς η παρουσία της φαίνεται να είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του ιού (Paul et al., 1998). Εντοπίζεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και η σημαντικότερη ιδιότητά της είναι ότι προκαλεί την αναδιάταξη των μεμβρανών και τη δημιουργία κυστιδίων στα οποία επιτελείται η ιική αντιγραφή.

Η **3A πρωτεΐνη** μέσω της υδρόφοβης περιοχής της έχει την ικανότητα σύνδεσης με τις μεμβράνες. Η ανάλυση της δομής της έχει δείξει ότι υπάρχει σαν ομοδιμερές, με επιφάνεια διμερισμού το κέντρο της πρωτεΐνης (Strauss et al., 2003). Η 3A επάγει αλλαγές στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και το σχηματισμό κυστιδίων αντιγραφής του ιού (Belon et al., 2007). Η αμινοτελική περιοχή της 3A εκτός από τον ρόλο της πρόσδεσης σε μεμβράνες, είναι σημαντική και για τη σύνθεση του θετικής πολικότητας κλώνου καθώς και για τη σωστή επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης (Towner et al., 2003). Η 3A, σε συνεργασία με τις 2B και 2BC, εμποδίζει την μεταφορά των πρωτεϊνών του κυττάρου ξενιστή από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi, επιδρώντας με τον τρόπο αυτό στο εκκριτικό σύστημα του κυττάρου (Doedens et al., 1997).

Η **VPg** είναι μια μικρή πρωτεΐνη αποτελούμενη από 23 αμινοξέα περίπου. Κωδικοποιείται από την περιοχή 3B του γονιδιώματος και βρίσκεται ομοιοπολικά προσδεσμένη στο 5' άκρο του ιικού RNA. Έχει την ικανότητα να προσκολλάται ομοιοπολικά στο RNA απουσία άλλων παραγόντων (Tobin et al., 1989). Το τρίτο αμινοξύ της VPg είναι μια τυροσίνη, η οποία φαίνεται να διατηρείται σε πολλούς Picorna ιούς. Η υδροξυλομάδα στο O⁴ αυτής της πρωτεΐνης δημιουργεί φωσφοδιεστερικό δεσμό με το νουκλεοτίδιο στο 5' άκρο του ιικού RNA κι έτσι έχουμε την δομή VPg-pUU. Η VPg φαίνεται να παίρνει μέρος στη διαδικασία συγκρότησης του ιικού καψιδίου καθώς και στην αντιγραφή του RNA, πιθανώς

παίζοντας το ρόλο εκκινητικού μορίου (Paul et al., 1998), με τη μορφή VPgpUpU στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων (Lyle et al., 2002).

Η **3AB πρωτεΐνη** φαίνεται να συμβάλλει στη σταθεροποίηση της VPg στις μεμβράνες για την έναρξη της σύνθεσης του RNA. *In vitro* πειράματα έδειξαν ότι διεγείρει τη δράση της ιικής πολυμεράσης (Richards and Ehrenfeld, 1998), καθώς και την πρωτεολυτική ενεργότητα της 3CD πρωτεάσης (Molla et al., 1994). Μια ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα της 3AB είναι αυτή του συνοδού μορίου (chaperon). Συγκεκριμένα, η 3AB διπλώνει το ιικό RNA στην ευνοϊκότερη θερμοδυναμικά διαμόρφωση, «ξεδιπλώνει» σύνθετες δευτεροταγείς RNA δομές προκειμένου να προσδεθεί η ιική πολυμεράση και διαχωρίζει τους κλώνους θετικής και αρνητικής πολικότητας κατά τη δημιουργία του αντιγραφικού ενδιαμέσου.

Η **3C πρωτεΐνη** μαζί με το πρόδρομό της μόριο 3CD, θεωρείται ότι διεξάγει την πλειοψηφία των πρωτεολυτικών διασπάσεων (Marcotte et al., 2007). Πρόκειται για μια πρωτεάση κυστεΐνης, η οποία φαίνεται να προκαλεί διάσπαση στον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ των αμινοξέων γλουταμίνης και γλυκίνης (Stanway, 1990). Η προτίμηση για το διπεπτίδιο αυτό φαίνεται να είναι απόλυτη για τους πολιοϊούς, όχι όμως και για τα υπόλοιπα μέλη των Picorna ιών. Μια κυστεΐνη (στη θέση 147 για τους πολιοϊούς), μια ιστιδίνη (στην θέση 40) και ένα ασπαρτικό οξύ (στη θέση 85) σχηματίζουν μια ενζυμική τριάδα, η οποία διατηρείται σε όλους τους Picorna ιούς (Bazan and Fletterick, 1988). Μια άλλη ιδιότητα της 3C είναι η αναστολή της πρωτεϊνολυτικής σύνθεσης του κυττάρου ξενιστή, απενεργοποιώντας το μεταγραφικό παράγοντα TFIIIC, ο οποίος απαιτείται για τη σύνθεση μορίων tRNA (Clark and Dasgupta, 1990). Τέλος, αποκόπτει την πρωτεΐνη TBP (TATA box binding protein), η οποία προάγει την ιική μετάφραση, ανοίγοντας έτσι το δρόμο για την εκκίνηση της ιικής αντιγραφής (Back et al., 2002).

Η **3D πολυμεράση** ($3D^{pol}$) είναι μια RNA εξαρτώμενη πολυμεράση. Το καταλυτικό της κέντρο αποτελείται από ένα τριπεπτίδιο Γλυκίνη-Ασπαρτικό οξύ-Ασπαρτικό οξύ, «GDD μοτίβο (Gly-Asp-Asp)», το οποίο διατηρείται σε όλους τους Picorna ιούς και είναι παρόμοιο με το YXDD μοτίβο (Tyr-Xxx-Asp-Asp), το οποίο απαντάται σε πολλούς RNA ιούς καθώς επίσης και στην αντίστροφη μεταγραφάση των ρετροϊών (Kamer and Argos, 1984). Η $3D^{pol}$ είναι το κύριο ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός κατά την αντιγραφή του. Συνθέτει RNA χρησιμοποιώντας σαν εκκινητικό μόριο την VPg πρωτεΐνη, έχοντας την ικανότητα

να παράγει θετικής και αρνητικής πολικότητας RNA. Επιπρόσθετα, έχει δραστηριότητα ελικάσης, ξεδιπλώνοντας τα σημεία όπου το RNA έχει δημιουργήσει διπλή έλικα κατά το στάδιο επιμήκυνσης της αντιγραφής και τέλος, είναι ικανή να προσθέτει την αδενυλιωμένη ουρά στο 3' άκρο του RNA και να συμβάλει έτσι στην ολοκλήρωση της σύνθεσης του θετικής πολικότητας ιικού RNA (Pfister et al., 1999).

Η **3CD πρωτεΐνη** παρουσιάζει ισχυρή δραστικότητα πρωτεάσης, αλλά δεν παρουσιάζει δραστικότητα πολυμεράσης (Marcotte et al., 2007). Η 3CD διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ιική αντιγραφή. Ειδικότερα, συμβάλλει στη δημιουργία κυστιδίων αντιγραφής στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Belon et al., 2007), προσδένεται στο cloverleaf και στο Cis Response Element (CRE) διεγείροντας την αντιγραφή και την ουριδιλίωση της VPg αντίστοιχα (Paul et al., 2000), και τέλος, προκαλεί τη λήξη της ιικής μετάφρασης, σηματοδοτώντας έτσι την έναρξη της ιικής αντιγραφής, μέσω της πρωτεόλυσης του καρβοξυτελικού άκρου της PCBP2 (Perera et al., 2007). Η 3CD έχει επίσης την ικανότητα να εισέρχεται στο πυρήνα του κυττάρου, όπου και αυτοκαταλύεται σε 3C και 3D. Στο εσωτερικό του πυρήνα η 3C πλέον, πρωτεολύει μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων, σταματώντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφική μηχανή του κυττάρου (Weidmann et al., 2003).

1.3.2.4 Η 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR)

Το μήκος της 3' μη κωδικής περιοχής (3'UTR) του RNA των Picorna ιών ποικίλει μεταξύ των εκπροσώπων αυτής της οικογένειας (από 40 νουκλεοτίδια στους ρινοϊούς έως 126 νουκλεοτίδια στους καρδιοϊούς). Οι εντεροϊοί μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες με βάση την αλληλουχία και την οργάνωση της 3'UTR: στην ομάδα των πολιοϊών, η οποία περιλαμβάνει επιπρόσθετα τον Cocksackie A21 και τους εντεροϊούς των βοοειδών, και στην ομάδα των Cocksackie B ιών, η οποία περιλαμβάνει επίσης τους εντεροϊούς των χοιροειδών, τον Cocksackie A9 και τους Echo ιούς 6 και 11. Η ομάδα των Cocksackie B ιών παρουσιάζει στη 3'UTR μια πλήρη διάταξη θηλιάς (stem loop), η οποία απουσιάζει από την ομάδα των πολιοϊών. Στους πολιοϊούς παρουσιάζονται δύο θηλιές (X και Ψ) οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, δημιουργώντας έτσι ένα μοτίβο τριτοταγούς δομής.

Στο 3' άκρο της η 3'UTR φέρει μια poly-(A) ουρά (αντίστοιχα υπάρχει poly-(U) τμήμα στην αντίστοιχη περιοχή του αρνητικής πολικότητας RNA) (Melnick, 1996). Η περιοχή αυτή φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού (Rohll et al., 1995). Υπάρχουν αποδείξεις ότι οι ιικές πρωτεΐνες 3AB και 3CD καθώς και μια πρωτεΐνη του κυττάρου ξενιστή μεγέθους 34-36kDa δεσμεύονται στην 3'UTR (Todd et al., 1995). Μεταλλάξεις που εξασθενούν την πρόσδεση της 3'UTR με τον κυτταρικό παράγοντα έχουν επιβλαβή αποτελέσματα στον πολλαπλασιασμό του ιού, προτείνοντας την υπόθεση ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιού, πιθανότατα στο επίπεδο σύνθεσης της αρνητικής πολικότητας αλυσίδας RNA (Herold and Andino, 2001). Τέλος, η 3'UTR φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ιικής μετάφρασης, αλληλεπιδρώντας με το στοιχείο IRES.

1.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Ο παθογόνος κύκλος των εντεροϊών ξεκινά με την προσκόλλησή τους σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή (πίνακας 1.1).

Η πλειοψηφία των υποδοχέων των εντεροϊών συνδέεται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3 στη σχηματιζόμενη αυλάκωση (Rossmann, 1994). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν παρόμοια δομή και περιέχουν μια σειρά από περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών. Πιο συγκεκριμένα, υποδοχείς οι οποίοι ανήκουν στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών είναι οι: ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), ο οποίος έχει βρεθεί ότι συνδέεται με τον Coxsackie A21 (Xiao et al., 2001), 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 (Poliovirus Receptor) ο οποίος συνδέεται με τους πολιοϊούς. Εκτός όμως από την σύνδεση με το ιικό καψίδιο, οι υποδοχείς αυτοί οδηγούν στην αναδιάταξη του ιικού καψιδίου και απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κύτταρο ξενιστή (Rossmann, 1994). Ορισμένοι Echo και Coxsackie B ιοί προσδένονται στο παράγοντα επιτάχυνσης της αλλοίωσης DAF (decay-acceleration factor) ή CD55, που είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών ρύθμισης της ενεργότητας του συμπληρώματος (Bergelson et al., 1994). Οι υποδοχείς αυτοί δε συμβάλλουν στην αποσταθεροποίηση του ιικού καψιδίου.

Ιός	Υποδοχέας	Τύπος υποδοχέα	Συνυποδοχέας
Πολιοϊοί 1-3	PVR	Ig-like	
Coxsackie A13, A18, A21	Icam-1	Ig-like	
Enterovirus 70	CD55	SCR-like (complement cascade)	
Coxsackie A21	CD55	SCR-like (complement cascade)	Icam-1
Coxsackie B1, B3, B5	CD55	SCR-like (complement cascade)	$\alpha_v\beta_6$ -Integrin
Echo 3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29, 33	CD55	SCR-like (complement cascade)	β_2 -Microglobulin
Echo 1, 8	$\alpha_2\beta_1$ -Integrin (Vla- 2)	Integrin	β_2 -Microglobulin
Coxsackie B1-B6	CAR	Ig-like	

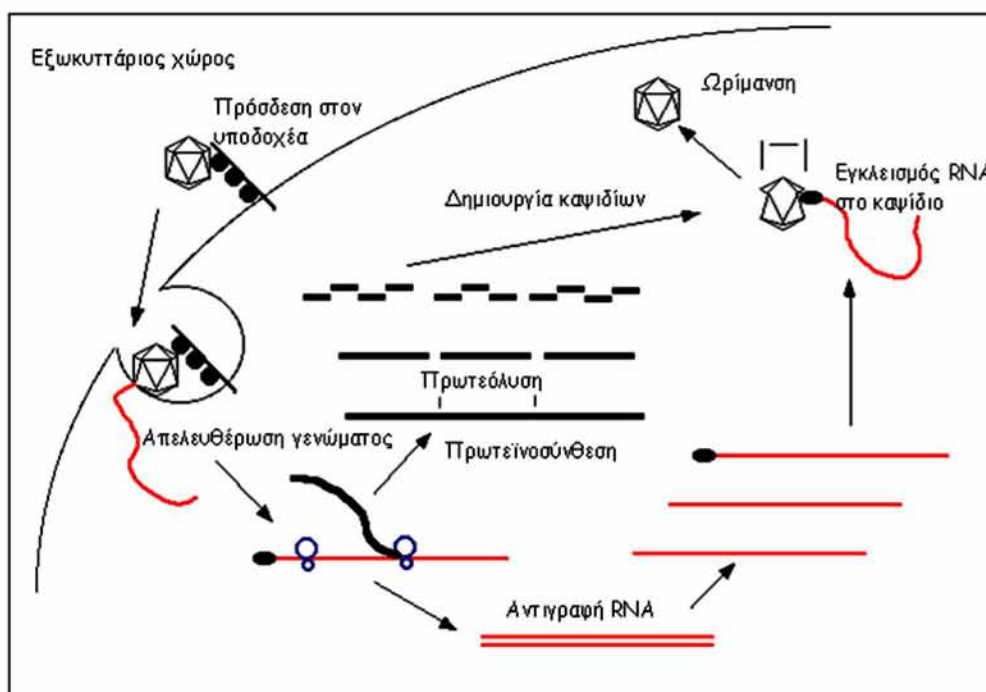
Ig, Immunoglobulin; SCR, short consensus repeat

Πίνακας 1.1. Οι κυτταρικοί υποδοχείς των εντεροϊών.

Η αλληλεπίδραση ενός εντεροϊού με τον υποδοχέα δεν είναι πάντα επαρκής για την είσοδό του στο κύτταρο και απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου μορίου ή υποδοχέα (συνυποδοχέα). Για παράδειγμα, για τον Coxsackie A21 απαραίτητη είναι η παρουσία τόσο του DAF όσο και του ICAM-I ως συνυποδοχέων προκειμένου να ξεκινήσει έναν παραγωγικό μολυσματικό κύκλο (Shafren et al., 1997). Ο ακριβής ρόλος των συνυποδοχέων στην μόλυνση του κυττάρου δεν είναι ακόμα γνωστός.

1.5 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών ξεκινά με την πρόσδεσή τους στον κυτταρικό τους υποδοχέα, στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή. Μετά την απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο εσωτερικό του κυττάρου, ο ιός μεταφράζει το γονιδίωμα του σε μια πολυπρωτεΐνη, από την οποία μετά από πρωτεόλυση θα δημιουργηθούν οι ικές πρωτεΐνες. Ακολουθεί η αντιγραφή του ιικού γενώματος και η δημιουργία των ιικών καψιδίων. Μετά τον εγκλεισμό του ιικού RNA στο καψίδιο, ο ιός είναι έτοιμος να εξέλθει από το κύτταρο (εικόνα 1.5).



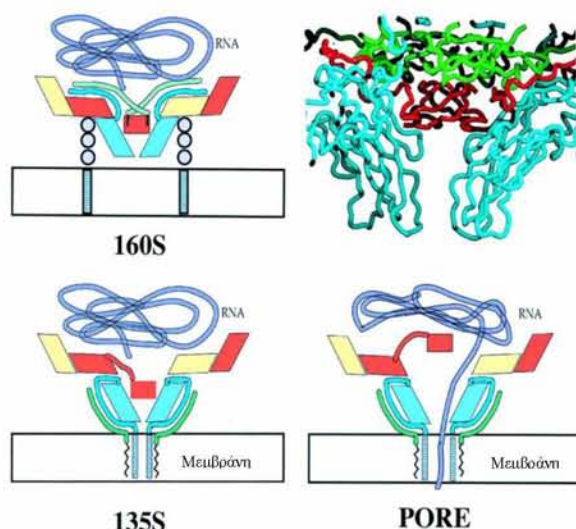
Εικόνα 1.5. Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών.

1.5.1 Πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς - είσοδος στα κύτταρα

Οι εντεροϊοί προσδένονται στο κύτταρο μέσω της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα και της θέσης πρόσδεσης που αναγνωρίζει στην επιφάνεια του ιού. Στο καψίδιο των πολιοϊών έχουν βρεθεί δυο θέσεις αναγνώρισης των κυτταρικών υποδοχέων γεγονός που αυξάνει το ρυθμό αλληλεπίδρασης του ιού με το κύτταρο (McDermott et al., 2000). Μετά τη πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς, το ιικό καψίδιο πρέπει να αποδομηθεί προκειμένου να απελευθερωθεί το RNA και να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα. Για κάποιους ιούς ο κυτταρικός υποδοχέας είναι

αυτός που επάγει την έναρξη δομικών αλλαγών και την είσοδο του RNA στο κύτταρο. Για άλλους Picorna ιούς η αλληλεπίδραση με τον κυτταρικό υποδοχέα εξυπηρετεί μόνο τη συγκέντρωση του ιού στη κυτταρική επιφάνεια. Η απελευθέρωση του γενώματος του ιού είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συνυποδοχέα.

Η πρόσδεση αυτή ακολουθείται από στερεοδομικές μεταβολές στο καψίδιο του ιού, οι οποίες τον προετοιμάζουν για την είσοδο του γενετικού του υλικού στο κυτταρόπλασμα. Οι πολιοϊοί όταν προσδεθούν στον PVR αλλάζουν στερεοδιάταξη και μετατρέπονται σε μορφές γνωστές ως «Α σωματίδια» (Wimmer et al, 1994). Τα σωματίδια αυτά περιέχουν μολυσματικό RNA, όμως διαφέρουν από τους ελεύθερους πολιοϊούς στο συντελεστή καθίζησης (τα Α σωματίδια έχουν συντελεστή καθίζησης 135S σε αντίθεση με τους ελεύθερους ιούς των 160S), στην αυξημένη ευαισθησία τους σε πρωτεάσες και στην απουσία της VP4 καψιδικής πρωτεΐνης (Wimmer et al, 1994). Οι παραπάνω αλλαγές συνοδεύονται και με την μεταφορά του αμινοτελικού άκρου της VP1 πρωτεΐνης από το εσωτερικό του ιού στην εξωτερική επιφάνεια του ιικού καψιδίου, προσδίδοντας του υδρόφοβες ιδιότητες, και ως εκ τούτου αυξημένη συγγένεια με τις μεμβράνες (Fricks et al., 1990). Οι αλλαγές αυτές φαίνεται να είναι απαραίτητες για την είσοδο των πολιοϊών στο κύτταρο. Το αμινοτελικό άκρο της VP1 δημιουργεί μια έλικα η οποία εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, δημιουργώντας έναν πόρο μέσω του οποίου θα περάσει το ιικό RNA στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1.6). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από μελέτες σύμφωνα με τις οποίες τα σωματίδια Α όταν προστεθούν σε λιπιδική διπλοστοιβάδα, επάγουν τη δημιουργία ιοντικών καναλιών (Tosteson and Chow, 1997).



Εικόνα 1.6. Πιθανός μηχανισμός εισόδου ιϊκού RNA στο κύτταρο. Οι VP1, VP2, VP3 και VP4 δομικές πρωτεΐνες παρουσιάζονται με κυανό, κίτρινο, κόκκινο και πράσινο χρώμα, αντίστοιχα. Η VP3 φαίνεται να εμποδίζει το RNA να βγει έξω από το καψίδιο. Όταν ο ιός (160S) προσδένεται στον υποδοχέα (3 μαύροι κύκλοι), αλλάζει η δομή του και μετατρέπεται σε σωματίδιο 135S. Η VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 βγαίνουν στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου. Η VP1 δημιουργεί υδρόφοβες έλικες, οι οποίες διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και επιτρέπουν στο RNA να περάσει στο κυτταρόπλασμα μέσω ενός πόρου, αφού πρώτα η VP3 απομακρυνθεί από τη δίοδο. (Belnap et al., 2000)

1.5.2 Μετάφραση

Μετά την είσοδο του ιού στο κυτταρόπλασμα, το θετικής πολικότητας RNA του ιού χρησιμοποιείται ως mRNA, το οποίο μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη. Όμως, οι εντεροϊοί στερούνται κάποιων βασικών στοιχείων τα οποία συναντώνται σε όλα τα ευκαρυωτικά mRNA. Τα ευκαρυωτικά mRNA φέρουν στο 5' άκρο τους ένα κάλυμμα, γνωστό ως cap το οποίο περιέχει μια μεθυλιωμένη γουανοσίνη. Οι εντεροϊοί στην θέση της δομής cap έχουν την πρωτεΐνη VPg η οποία αφαιρείται από ένα κυτταρικό ένζυμο, την VPg-Unlinkase με άγνωστο φυσιολογικό κυτταρικό ρόλο (Gulevich et al., 2001) προκειμένου να αρχίσει η πρωτεϊνοσύνθεση.

Για την έναρξη της μετάφρασης των εντεροϊών είναι απαραίτητοι όλοι οι παράγοντες έναρξης των ευκαρυωτικών κυττάρων, με εξαίρεση την πρωτεΐνη eIF4E, η οποία προσδένεται στον cap σχηματισμό (Ochs et al., 2002). Αρχικά ο δημιουργείται το σύμπλοκο eIF4F από τη πρόσδεση των eIF4B, eIF4A και eIF4GI μεταγραφικών παραγόντων στο ιικό RNA. Στη συνέχεια η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (40S) σε σύμπλοκο με τους παράγοντες eIF1A, eIF3 και eIF2-GTP-Met-tRNA προσδένεται με το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο eIF4F - ιικό RNA, δημιουργώντας το 43S προεναρκτήριο σύμπλοκο. Το προεναρκτήριο σύμπλοκο κινείται κατά μήκος του IRES μέχρι να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης. Τέλος, προσδένεται η μεγάλη υπομονάδα (60S) του ριβοσώματος δημιουργώντας το ολοκληρωμένο ριβόσωμα που φέρει εις πέρας τη μετάφραση (Prevot et al., 2003).

Εκτός όμως από τους καθιερωμένους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης, στο IRES στοιχείο των Picorna ιών προσδένονται και άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή, που προάγουν την μετάφραση ή διαμορφώνουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιικού RNA, όπως η πρωτεΐνη των 57kDa που προσδένεται στην πολυπυριμιδική περιοχή PTB (Polypyrimidine Tract-Binding protein), η πρωτεΐνη La των 52kDa (La auto antigen), η poly(rC) πρωτεΐνη PCBP(Poly(rC) Binding Protein) των 39 kDa και η Unr (Upstream of N-Ras) (Murray et al, 2001; Costa-Mattioli et al, 2004; Boussadia et al., 2003). Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να είναι απαραίτητες αλλά όχι επαρκείς από μόνες τους για την έναρξη της μετάφρασης (Hunt, 1999), εκτός από την Unr η οποία είναι πράγματι αναγκαία σε αυτή τη διαδικασία (Boussadia et al., 2003).

1.5.3 Πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης

Η πολυπρωτεΐνη που παράγεται είναι ασταθής και θα υποστεί πρωτεόλυση για τη δημιουργία των δομικών και μη-δομικών πρωτεϊνών του ιού. Η διαδικασία της πρωτεόλυσης της ιικής πολυπρωτεΐνης διακρίνεται σε τρία στάδια. Το πρώτο βήμα είναι ο αποχωρισμός της P1 πρόδρομου πρωτεΐνης. Αυτή η πρώτη τομή καταλύεται από την ιική πρωτεάση 2A^{pro}. Το δεύτερο βήμα είναι η δημιουργία των δομικών πρωτεϊνών από την P1 και των μη-δομικών από τις P2 και P3 με τη σημαντική βοήθεια των πρωτεασών 3C^{pro} και 3CD^{pro}. Τέλος, η VP0 διαχωρίζεται αυτοκαταλυτικά στις VP2 και VP4 δομικές πρωτεΐνες.

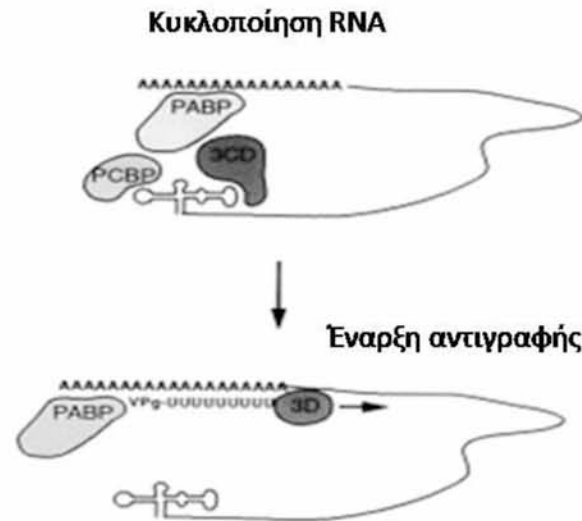
1.5.4 Αντιγραφή

Με την ολοκλήρωση της μετάφρασης του ιικού γενώματος και την έκφραση των ιικών γονιδίων, το θετικής πολικότητας RNA (+RNA) των εντεροϊών χρησιμοποιείται για τη δημιουργία νέων μορίων RNA με την ίδια πολικότητα. Στη διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη η παρεμβολή ενός ενδιάμεσου μορίου RNA με αντίθετη πολικότητα (-RNA), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί σαν καλούπι για τη σύνθεση πολλών κλώνων θετικής πολικότητας.

Η αντιγραφή λαμβάνει χώρα στα αντιγραφικά κυστίδια που αποτελούνται από τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου, του συμπλέγματος Golgi και των λυσοσωμάτων του κυττάρου. Η έναρξη της σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας RNA απαιτεί τη δημιουργία ενός συμπλόκου αντιγραφής αποτελούμενο από ικές

πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}, η 2C^{ATPase}, η 3A, η 3B και οι πρόδρομες αυτών 2BC και 3AB, κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2 και η PABP, καθώς και από ιικό RNA, το οποίο περιέχει *cis*-δραστικά στοιχεία απαραίτητα για τη σύνθεση του -RNA (Egger et al., 2000).

Το πρώτο βήμα για την αντιγραφή του ιικού γενώματος είναι η κυκλοποίησή του, που επιτυγχάνεται με την αλληλεπίδραση των 3CD^{pro} και PCBP, οι οποίες είναι προσδεμένες στη δομή cloverleaf, με την πρωτεΐνη του ξενιστή PABP (Wang et al., 1999), η οποία φαίνεται να προσδένεται στην poly(A) ουρά του 3'UTR του γενώματος του ιού (εικόνα 1.7). Στη συνέχεια η 3CD πρωτεΐνη αποκόπτει την προσδεσμένη σε μεμβράνες 3AB, σε 3A και VPg καθώς και την 3CD σε 3C και 3D (Murray and Barton, 2003). Στην επιφάνεια της 3D, η VPg, η poly(A) ουρά και το UTP-Mg²⁺ προσδένονται σε κατάλληλη διαμόρφωση, τέτοια ώστε τα κατάλοιπα 17 και 20 της VPg να καταλύσουν την ουριδιλίωση της VPg σε VPgpU (Schein et al., 2006). Το μόριο VPgpU χρησιμοποιείται σαν εκκινητήριο μόριο από την 3D για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου. Μετά το τέλος της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου δημιουργείται ένα δίκλωνο μόριο RNA γνωστό ως αντιγραφικό ενδιάμεσο. Κατά τη διάρκεια σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας κλώνου λαμβάνει χώρα η ουριδιλίωση της VPg σε VPgpUpU. Η συγκεκριμένη αντίδραση απαιτεί την πρόσδεση 2 μορίων 3CD στην περιοχή μίσχου του CRE (δομικό RNA στοιχείο στη 2C περιοχή) και την πρόσδεση στο σύμπλοκο της VPg και της 3D. Η 3D χρησιμοποιεί την αλληλουχία 5' AAAC 3' στη θηλιά του CRE σαν καλούπι και ουριδιλιώνει την VPg σε VPgpUpU. Το VPgpUpU χρησιμοποιείται σαν εκκινητής για τη σύνθεση πολλών κλώνων θετικής πολικότητας, σχεδόν ~20 μόρια ανά -RNA (Murray and Barton, 2003).



Εικόνα 1.7. Μοντέλο για την έναρξη της σύνθεσης του $-RNA$ κατά την αντιγραφή των εντεροϊών. Η μικρή πολυμεράση που περιέχεται στο πολυπεπίδιο 3CD προσδένεται μαζί με τον κυτταρικό παράγοντα PCBP στη δομή cloverleaf του 5' άκρου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της 3CD, της PCBP και της PABP2 κρατούν το 3' και 5' άκρο κοντά προκαλώντας την κυκλοποίηση του ιικού RNA. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές πλησιάζουν την 3D πολυμεράση στην poly(A) ουρά του 3' άκρου επιτρέποντας τη δημιουργία της *VrgpUpU* και την έναρξη της σύνθεσης του $-RNA$ (Herold and Andino, 2001).

1.5.5 Καψιδίωση - Δημιουργία ιικών σωματιδίων

Μετά τον πολλαπλασιασμό του ιικού γενώματος στο κύτταρο δημιουργούνται τα ιοσωμάτια. Το στοιχείο IRES φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην είσοδο του RNA στο καψίδιο, όμως δεν αποτελεί από μόνο του επαρκές στοιχείο (Gromeier et al., 1996) και η όλη διαδικασία φαίνεται να εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως η VPg.

Το πρώτο βήμα για τη συναρμολόγηση του καψιδίου είναι η τομή της πρόδρομου πρωτεΐνης P1 από την 3CD^{pro} και η δημιουργία ενός άωρου πρωτομερούς 5S από τις VP0, VP1 και VP3 δομικές πρωτεΐνες. Οι 5S υπομονάδες συναρμολογούνται σε πενταμερή των 14S, η παρουσία των οποίων απαιτείται για την καψιδίωση του RNA των πολιοϊών (Verlinden et al., 2000). Δώδεκα πενταμερή απαιτούνται για την κατασκευή ενός εικοσαεδρικού καψιδίου που θα προστατέψει το RNA του ιού. Η δημιουργία των 150-160S ιών συνοδεύεται με το τελευταίο πρωτεολυτικό ρήγμα της VP0 σε VP2 και VP4, το οποίο φαίνεται να είναι απαραίτητο για τη σταθερότητα και τη μολυσματικότητα του ιού (Curry et

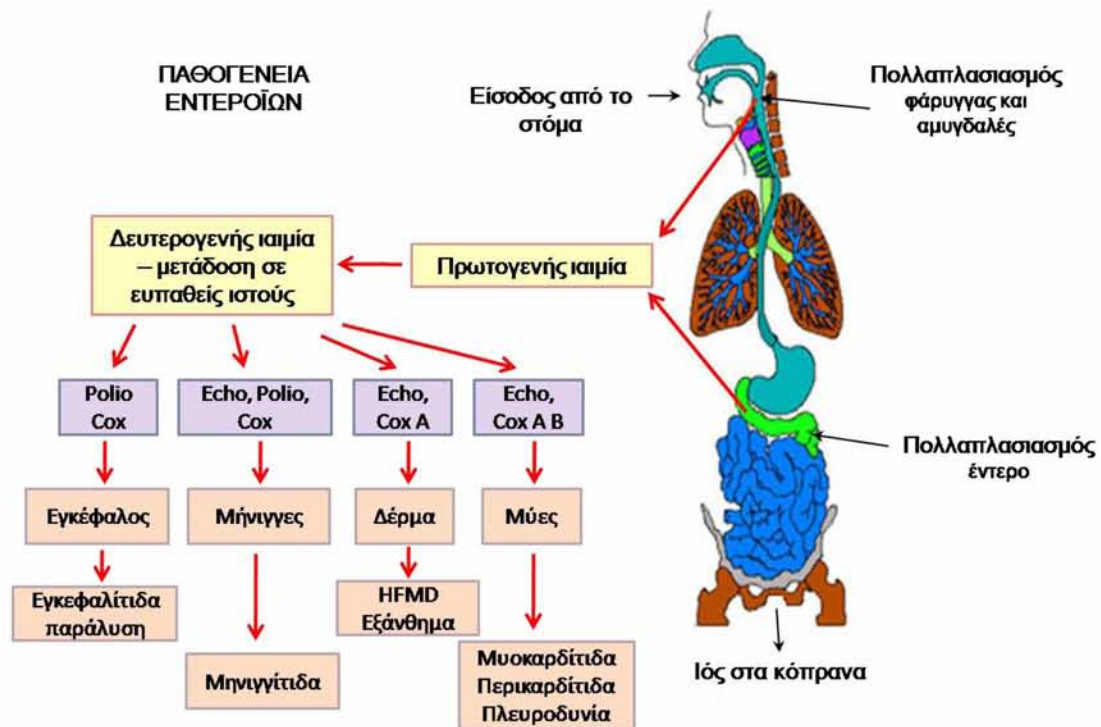
al., 1997). Προτείνεται ότι είναι μια αυτοκαταλυτική διαδικασία, που εξαρτάται από την καψιδίωση του RNA (Arnold et al., 1987), όμως ο μηχανισμός παραμένει άγνωστος.

1.6 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ - ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Η μόλυνση με εντεροϊό ξεκινά από το πεπτικό σύστημα. Η είσοδος του ιού γίνεται από το στόμα. Εξαιρέση αποτελούν ο CAV21, που κυρίως ευθύνεται για λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος και εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της αναπνευστικής οδού και ο EV70, ο οποίος χρησιμοποιεί τις οφθαλμικές και αναπνευστικές εκκρίσεις ως μέσο μετάδοσής του (Knipe and Howley, 2007). Ο πολλαπλασιασμός των εντεροϊών γίνεται στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα, στις πλάκες του Peyer και στο λεπτό έντερο (Εικόνα 1.8). Η περίοδος επώασης, δηλαδή ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας, είναι συνήθως 7-14 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2-32 ημέρες. Τρεις με πέντε ημέρες μετά την έκθεση ο ιός μπορεί να απομονωθεί από το αίμα, το φάρυγγα και από τα κόπρανα. Την περίοδο αυτή εμφανίζονται τα συμπτώματα της ήπιας ασθένειας ή η μόλυνση μπορεί να παραμείνει ασυμπτωματική. Μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό, ο ιός διαδίδεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε άλλους ευπαθείς ιστούς - λεμφαδένες, δέρμα, μύες - και περνώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μπορεί να εισβάλλει στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Όταν οι εντεροϊοί προσβάλλουν το νευρικό σύστημα μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες όπως παράλυση - η οποία οφείλεται σε πολιοϊό (πολιομυελίτιδα) ή άλλο εντεροϊό, κυρίως Cocksackie και Ehco (Brown et al., 1972; Grimwood et al., 2003) - άσηπτη μηνιγγίτιδα και μηνιγγίτιδα. Μια άλλη ασθένεια που οφείλεται σε εντεροϊούς είναι η HFMD (Hand Foot Mouth Disease) (Chan et al., 2003). Είναι μια ήπια παιδική ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από απότομο σχηματισμό πληγών στο στόμα και βλάβες, συνήθως αγγειακές, στα χέρια και στα πόδια. Ασθένειες του αναπνευστικού έχουν επίσης συσχετισθεί με διάφορα στελέχη των εντεροϊών, όπως για παράδειγμα το EV68 (Oberste et al., 2004b). Η μόλυνση των μυϊκών κυττάρων της καρδιάς από τους Cocksackie B ιούς είναι ένας σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας της ανθρώπινης καρδιομυοπάθειας, όπου έχουν ανιχνευθεί στο 30% των περιπτώσεων (Baboonian

et al., 1997). Τέλος, Coxsackie B και Echo ιοί έχουν συσχετιστεί με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (Dotta et al., 2007; Williams et al., 2006).



Εικόνα 1.8. Παθογένεια των εντεροϊών.

1.7 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι άνθρωποι είναι η μόνη πηγή μόλυνσης με εντεροϊούς (Knipe and Howley, 2007). Στη μετάδοση του ιού πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν η ηλικία, το φύλο και διάφοροι κοινωνικο-οικονομικοί παράγοντες. Ο ιός μεταδίδεται πιο εύκολα σε περιοχές με φτώχη υγιεινή. Σε ήπια κλίματα υπάρχει έξαρση μολύνσεων με εντεροϊό την άνοιξη και το καλοκαίρι, χωρίς να αποκλείεται η εμφάνιση περιστατικών τις υπόλοιπες εποχές του χρόνου. Οι ιοί μεταδίδονται πιο γρήγορα μεταξύ των μελών μιας οικογένειας, με τα παιδιά να είναι πιο ευαίσθητα από ότι οι ενήλικες. Αυτό οφείλεται στην επίκτητη ανοσία του ενήλικου πληθυσμού. Σε αναπτυσσόμενες περιοχές, όπου οι συνθήκες ευνοούν την ευρεία διάδοση του ιού, η ασθένεια εμφανίζεται κυρίως σε νήπια.

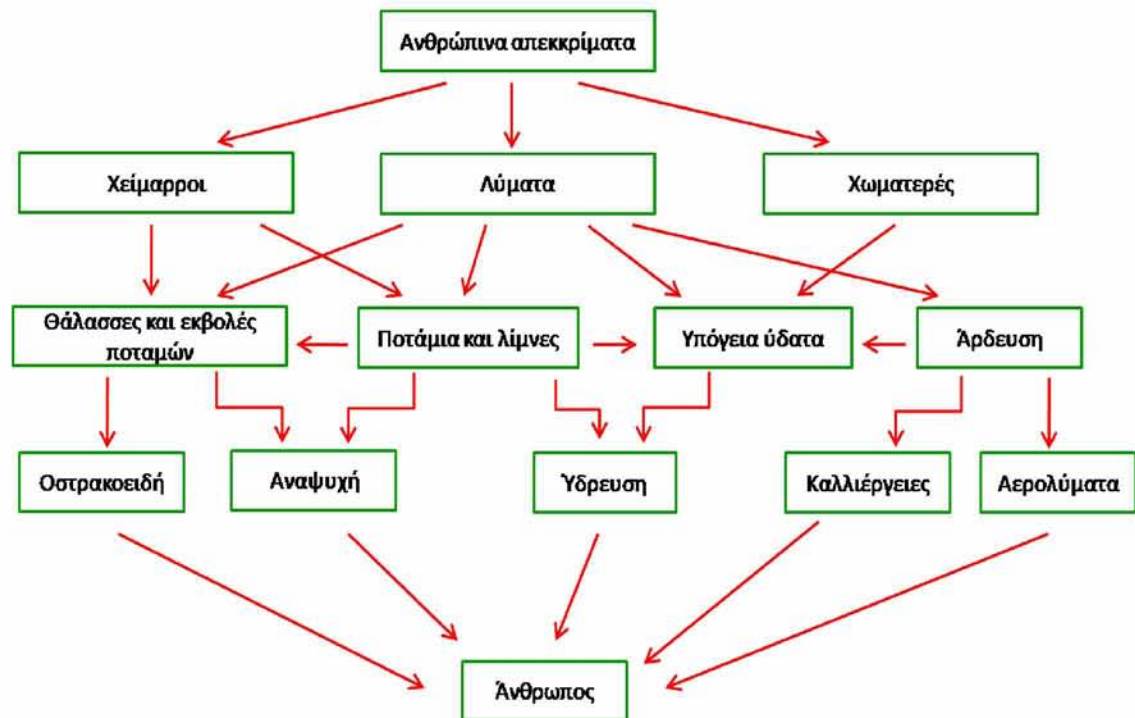
1.8 ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Μολυσμένα άτομα μπορούν να εκκρίνουν σε μεγάλες ποσότητες εντεροϊούς στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων τους είτε είναι συμπτωματικά είτε όχι. Από

μελέτες έχειδειχθεί ότι παρά την σημαντική μείωση του ιικού φορτίου μετά την επεξεργασία των λυμάτων, τα στερεά και υγρά απόβλητα αποτελούν εστία από την οποία οι εντερικοί ιοί μπορούν να διασκορπιστούν στο περιβάλλον (Griffin et al., 2003) και κατά συνέπεια μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, δεδομένου ότι με τη διασπορά τους σε ποτάμια, λίμνες και στη θάλασσα είναι δυνατόν να επανέλθουν στη τροφική αλυσίδα (εικόνα 1.9). Οι εντεροϊοί μπορούν να επιβιώσουν για εβδομάδες στο περιβάλλον σε συνθήκες με ουδέτερο pH, υγρασία και χαμηλή θερμοκρασία, κυρίως με τη παρουσία οργανικής ύλης, η οποία μπορεί να τους προστατέψει από την αδρανοποίηση.

Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί σε επιφανειακά και υπόγεια νερά (Knipe and Howley, 2007). Σε τροπικά κλίματα η παρουσία των εντεροϊών είναι πιο συχνή σε υπόγεια νερά μιας και έχουν χαμηλότερη θερμοκρασία. Οι εντεροϊοί μπορούν να βρεθούν στα νερά αυτά ακόμα και μετά τη χλωρίωση. Σε βιομηχανοποιημένες περιοχές η μετάδοση των εντεροϊών από πόσιμο νερό δεν είναι συνήθης, εντούτοις όμως, αποτελεί ανησυχία για την δημόσια υγεία το γεγονός ότι οι συνθήκες χλωρίωσης δεν είναι πάντα κατάλληλες για την αδρανοποίησή τους.

Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί επίσης σε ωμά ή μη πλήρως μαγειρεμένα μαλάκια και οστρακόδερμα (Shieh et al., 2003; Formiga-Cruz et al., 2005). Τα οστρακοειδή έχουν την ικανότητα να συγκεντρώνουν ιούς, περιλαμβανομένων των εντεροϊών. Οι ιοί αυτοί μπορούν να επιβιώσουν σε μύδια για τρεις εβδομάδες σε θερμοκρασίες 1-21°C. Το 1976 μια επιδημία άσηπτης μηνιγγίτιδας από Echo 4, αποδόθηκε σε κατανάλωση μολυσμένων οστρακόδερμων, όμως έκτοτε δεν έχει γίνει άλλη αναφορά σε επιδημία με εντεροϊό από κατανάλωση τέτοιων τροφών. Το χώμα και οι καλλιέργειες μπορούν επίσης να παρέχουν ιδανικές συνθήκες για τους εντεροϊούς, καθώς μπορούν να επιβιώσουν σε λάσπη. Εντούτοις, η επιβίωση των εντεροϊών σε λαχανικά τα οποία έχουν εκτεθεί σε μολυσμένα νερά και λιπάσματα δεν έχει συσχετιστεί με τη μετάδοσή τους.



Εικόνα 1.9. Κυκλοφορία των εντεροϊών στο περιβάλλον.

Η παρακολούθηση του περιβάλλοντος έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην αποτίμηση του μεγέθους και της διάρκειας της κυκλοφορίας εντεροϊών σε συγκεκριμένους πληθυσμούς (Sedmak et al., 2003; Pallin et al., 1997; Shieh et al., 1997). Επίσης, ο έλεγχος αποβλήτων έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα πιο ευαίσθητο εργαλείο για την απομόνωση αγρίων στελεχών πολιοϊών σε πληθυσμούς από ότι η αναζήτηση και παρακολούθηση ασθενών με οξεία χαλαρή παράλυση (Grabow et al., 1999), καθώς και αγρίου τύπου πολιοϊοί έχουν απομονωθεί από λύματα απουσία περιστατικών οξείας χαλαρής παράλυσης στον πληθυσμό (Metcalf et al., 1995; Tambini et al., 1993; El Bassioni et al., 2003). Μπορεί επίσης η παρακολούθηση κυκλοφορούντων στελεχών να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο της δραστηριότητας των εμβολιασμών κατά τη διάρκεια επιδημιών πολιομυελίτιδας (Rougy et al., 1988) και την ανίχνευση αγρίων τύπων πολιοϊών σε κοινωνίες απαλλαγμένες αγρίων στελεχών πολιοϊών (Cochi et al., 1995). Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι όλα τα μολυσμένα άτομα, είτε παρουσιάζουν κάποια συμπτώματα είτε όχι, εκκρίνουν έναν μεγάλο αριθμό εντεροϊών στο περιβάλλον για μια περίοδο 2-8 εβδομάδων (Sutter et al., 2004). Άλλωστε η παρακολούθηση του περιβάλλοντος αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη μέθοδο, ικανή να απομονώσει στελέχη πολιοϊών ακόμα και αν 1 στα 10.000 άτομα απεκκρίνουν τον ιό (Hovi et

al., 2001). Όλα αυτά συνηγορούν στην σπουδαιότητα του ελέγχου περιβαλλοντικών δειγμάτων για την πρόληψη πιθανών επιδημιών από εντεροϊούς, δεδομένου ότι έχουν απομονωθεί από το περιβάλλον πολιοϊοί οι οποίοι απομονώθηκαν αργότερα και από ασθενείς (Deshpande et al., 2003).

1.9 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

1.9.1 Κλινικά δείγματα

Απομόνωση από μολυσμένα όργανα και συσχετιζόμενα υγρά, όπως το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, αποτελεί την πιο ισχυρή ένδειξη λοίμωξης με εντεροϊό. Τα καλύτερα δείγματα για την απομόνωση τους είναι από το πεπτικό σύστημα, όπως φαρυγγικά επιχρίσματα, πρωκτικά επιχρίσματα ή δείγματα κοπράνων. Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί επίσης και από δάκρυα (Shulman et al., 1997). Τα δείγματα κοπράνων αποτελούν το πιο αξιόπιστο υλικό για την ανίχνευση εντεροϊών.

1.9.2 Περιβαλλοντικά δείγματα

Τα αστικά και βιομηχανικά λύματα χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ιών σε μια κοινότητα. Αν και μεγάλοι όγκοι πόσιμου νερού και νερού από ποτάμια, λίμνες και τη θάλασσα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ιών, τα λύματα θεωρούνται καταλληλότερα λόγω της παρουσίας μεγαλύτερης συγκέντρωσης αυτών. Εντούτοις, η ανίχνευση ιών από οποιουδήποτε τύπου περιβαλλοντικού δείγματος χωρίς μια αποτελεσματική διαδικασία συγκέντρωσης και απομόνωσης είναι συνήθως δύσκολη και ανεπιτυχής. Οι περισσότερες μέθοδοι συγκέντρωσης μεγάλων όγκων που έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιούν μια διαδικασία προσρόφησης και έκλουσης από θετικά ή αρνητικά φορτισμένα φίλτρα (Crabtree et al., 1997; Katayama et al., 2002; Mocé-Llivina et al., 2002), ενώ μέθοδοι χημικής επεξεργασίας και φυγοκέντρωσης είναι καταλληλότερες για την συγκέντρωση λυμάτων (Hovi et al., 2001; Shieh et al., 1997).

1.9.3 Κυτταρικές σειρές

Παραδοσιακά η απομόνωση και ανίχνευση των εντεροϊών σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα, ύστερα από την κατάλληλη επεξεργασία, βασίζεται

στον ενοφθαλμισμό κυτταρικών σειρών. Δυστυχώς, δεν υπάρχει μια μοναδική κυτταρική σειρά στην οποία μπορούν να πολλαπλασιαστούν όλοι οι ορότυποι των εντεροϊών. Οι πολιοϊοί και οι Cocksackie B ιοί έχουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού σε αρκετές κυτταρικές σειρές προερχόμενες από τον άνθρωπο ή τον πίθηκο, ενώ οι περισσότεροι Echo ιοί απομονώνονται σε κύτταρα ανθρώπινων ινοβλαστών ή ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Μερικοί ορότυποι Cocksackie A ιών ενώ μπορούν να απομονωθούν με ενοφθαλμισμό σε νεογνά ποντίκια, δεν έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν σε κυτταρικές σειρές (Knipe and Howley, 2007). Έτσι, εκλεκτική απομόνωση πολιοϊών μπορεί να γίνει σε πληθυσμούς ανασυνδυασμένων κυττάρων ποντικών που εκφράζουν το γονίδιο για τον υποδοχέα των πολιοϊών (PVR) όπως η L₂₀B σειρά. Για την απομόνωση εντεροϊών χρησιμοποιούνται κυρίως κύτταρα από ανθρώπινο ραβδομυοσάρκωμα (RD), ινοβλάστες από ανθρώπινο εμβρυϊκό πνεύμονα (HEL), κύτταρα από ανθρώπινο επιδερμικό καρκίνωμα (HEP-2), κύτταρα από καρκίνο του εντέρου (CaCo-2), κύτταρα που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα ICAM-1 (HeLa) και νεφρικά κύτταρα πράσινου αφρικανικού πιθήκου (Vero).

1.9.4 Οροτυπική Ταυτοποίηση

Η διάκριση των διαφόρων οροτύπων των εντεροϊών μπορεί να γίνει με την εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης των ιών, με τη χρησιμοποίηση ειδικών αντιορών για κάθε ορότυπο (Knipe and Howley, 2007). Μια τέτοια διαδικασία με εξουδετερωτικούς ορούς για καθένα από τους 66 γνωστούς οροτύπους εντεροϊών δεν είναι πρακτική, κι έτσι χρησιμοποιούνται μείγματα αντιορών προερχόμενα από άλογα, που περιέχουν διαφορετικούς συνδυασμούς αντισωμάτων. Η πιο γνωστή μέθοδος είναι αυτή των Lim-Benyesh-Melnick (LBM), που στηρίζεται στην χρήση 8 μειγμάτων αντιορών (από A έως το H), τα οποία περιέχουν αντιορούς για 42 διαφορετικούς οροτύπους. Αν δεν μπορεί να γίνει η ταυτοποίηση με τα παραπάνω μείγματα, τότε χρησιμοποιούνται επτά επιπρόσθετα (από J έως P), τα οποία περιέχουν επιπλέον αντισώματα. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή οι εντεροϊοί που έχουν απομονωθεί επωάζονται μαζί με καθένα από τα μείγματα των αντιορών και στη συνέχεια ενοφθαλμίζονται σε κατάλληλες κυτταρικές σειρές, σύμφωνα με τις οδηγίες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ).

Πρόκειται για μια πολύπλοκη και χρονοβόρα μέθοδο, ενώ η προμήθεια αντιορών είναι περιορισμένη και η ΠΟΥ προωθεί μια συντηρητική χρήση των μειγμάτων. Επιπρόσθετα, με τη συγκεκριμένη μέθοδο δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση όλων των οροτύπων των εντεροϊών. Οι εντεροϊοί που μπορούν να ταυτοποιηθούν είναι οι PV1, PV2, PV3, CBV1 έως CBV6, CAV9, E1 έως E7, E9, E11 έως E14, E20 έως E22, E25, E27, E29, E30 και E33.

1.9.5 Μοριακές τεχνικές

Οι τεχνικές μοριακής βιολογίας έχουν αντικαταστήσει πλέον τις παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης και ταυτοποίησης των εντεροϊών. Κυριότερες τεχνικές είναι η *in situ* υβριδοποίηση με τη χρήση cDNA ανιχνευτών και ο υβριδισμός με νουκλεϊκά οξέα.

Η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος στην ανίχνευση γενετικού υλικού εντεροϊών είναι η τεχνική της Αντίστροφης Μεταγραφής – Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (RT – PCR), η οποία παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο αποτέλεσμα. Η σύγκριση των αλληλουχιών των γονιδιωμάτων των εντεροϊών επέτρεψε την αναγνώριση περιοχών που είναι εξαιρετικά διατηρημένες μεταξύ των διαφορετικών μελών, όπως η 5'UTR. Έχουν σχεδιαστεί αρκετά εκκινητικά μόρια που στοχεύουν τη συγκεκριμένη περιοχή δίνοντας ποικίλου μεγέθους προϊόντα (Romero, 1999; Georgoroulou et al., 2000), ανιχνεύοντας τους περισσότερους ή και όλους τους εντεροϊούς, ακόμα και αυτούς που δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε κυτταροκαλλιέργεια.

Πέρα από την διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς απαραίτητη είναι και η ταυτοποίησή τους. Το μοριακό σύστημα ταξινόμησης βασίζεται στην ενίσχυση με RT-PCR και αλληλούχιση της VP1 καψιδιακής περιοχής, η οποία φαίνεται να αντιστοιχεί στον ορότυπο του κάθε ιού (Oberste et al., 1999; Caro et al., 2001; Oberste et al., 2003). Στην τράπεζα πληροφοριών υπάρχουν οι αλληλουχίες για πρότυπα και άγρια στελέχη εντεροϊών και η σύγκριση με αυτές μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση του απομονωμένου ιού. Για να καταταχθεί ένας εντεροϊός σε κάποιο συγκεκριμένο ορότυπο θα πρέπει να εμφανίζει νουκλεοτιδική ομοιότητα >75% (>85% αμινοξική ομοιότητα) της VP1 περιοχής ή τμήματος αυτής με το πρότυπο στέλεχος, με την προϋπόθεση ότι η ομολογία με

άλλο πρότυπο στέλεχος δε ξεπερνά το 70%. Νουκλεοτιδική ομοιότητα κάτω του 70% υποδεικνύει ένα νέο ορότυπο (Oberste et al., 2004).

1.10 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ

Οι εντεροϊοί όπως όλοι οι RNA ιοί, παρουσιάζουν πολύ υψηλούς ρυθμούς εξέλιξης. Η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των εντεροϊών οφείλεται κυρίως σε δύο παράγοντες: τις μεταλλάξεις και τον γενετικό ανασυνδυασμό.

1.10.1 Μεταλλάξεις

Η δημιουργία μεγάλου αριθμού σημειακών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό των εντεροϊών οφείλεται στο υψηλό ποσοστό ενσωμάτωσης λαθών της ιικής RNA πολυμεράσης ($3D^{pol}$), 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 και επομένως των quasi-species, η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή (Gavrilin 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. Νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις που σχετίζονται με αλλαγές κωδικονίων -μη συνώνυμες μεταλλάξεις- συνήθως δεν είναι ουδέτερες σε σχέση με εκείνες που δεν τροποποιούν το νόημα των κωδικονίων. Οι μεταλλάξεις που προσφέρουν εξελικτικό πλεονέκτημα επικρατούν στα πλαίσια της φυσικής επιλογής.

Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι αυτές που κωδικοποιούν για τις καψιδιακές πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία να εμφανίζεται στις περιοχές που εκτίθενται στην επιφάνεια των ιών. Το VP1 γονίδιο περιέχει τις κυριότερες αντιγονικές περιοχές και δέχεται την

μεγαλύτερη εξελικτική πίεση από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού-ξενιστή, με αποτέλεσμα την τάση δημιουργίας ποικιλόμορφων οροτύπων. Η αλληλουχία, αντίθετα, που κωδικοποιεί για τις μη δομικές πρωτεΐνες φαίνεται να είναι πιο συντηρημένη (Muir et al., 1998). Μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελεί μια συμβίωση γονιδίων όπου το καθένα από αυτά εξελίσσεται ανεξάρτητα από τα άλλα (μονάδα εξέλιξης), δηλαδή φαίνεται ότι οι καψιδιακές πρωτεΐνες, οι μη δομικές πρωτεΐνες και οι μη κωδικές περιοχές εξελίσσονται ανεξάρτητα (Lukashev et al., 2003).

1.10.2 Ανασυνδυασμοί στους πολιοϊούς

Οι πολιοϊοί ήταν οι πρώτοι RNA ιοί στους οποίους παρατηρήθηκε ανταλλαγή γενετικού υλικού (Hirst, 1962). Σε πολλά κλινικά δείγματα έχουν εντοπισθεί ανασυνδυασμένοι πολιοϊοί. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα στελέχη αυτά προέρχονταν από στελέχη εμβολίου OPV. Το φαινόμενο αυτό είναι συχνό γιατί το OPV περιέχει και τους τρεις ορότυπους (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3) με αποτέλεσμα να ευνοεί την ταυτόχρονη μόλυνση ενός κυττάρου από διάφορους συνδυασμούς οροτύπων (Furione et al., 1993). Έχουν απομονωθεί στελέχη Sabin ανασυνδυασμένα από υγιή άτομα που είχαν εμβολιαστεί με το OPV (Gammack et al., 1989, Blomqvist et al., 2003; Karakasiliotis et al., 2004) καθώς επίσης και από περιπτώσεις ασθενών με εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP) (Guillot et al., 2000). Έχει, επίσης, δειχθεί ότι ο διατυπικός ανασυνδυασμός μπορεί να οδηγήσει στη μεταστροφή του εξασθενημένου φαινοτύπου των εμβολιακών στελεχών σε νευρομολυσματικό (MacAdam et al., 1989).

Οι ανασυνδυασμοί μεταξύ των στελεχών του εμβολίου διακρίνονται εύκολα λόγω των καλά προσδιορισμένων αλληλουχιών των Sabin στελεχών. Εντούτοις, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις ανασυνδυασμών μεταξύ εμβολιακών και αγρίων στελεχών πολιοϊών ή εμβολιακών με κάποιο άγριο στέλεχος εντεροϊού καθώς και ανασυνδυασμοί μεταξύ αγρίων στελεχών πολιοϊών (Dahourou et al., 2002; Liu et al., 2003; Guillot et al., 2000). Σε πολλές από τις περιπτώσεις όπου ο δότης γενετικού υλικού δεν έχει εντοπιστεί, υπάρχει έντονη υποψία ότι μπορεί να είναι κάποιο μέλος της ομάδας C των εντεροϊών, στην οποία εντάσσονται 11 ορότυποι Coxsackie A (Liu et al., 2003; Guillot et al., 2000).

Οι θέσεις πάνω στο ιικό γένωμα όπου παρατηρούνται συνήθως ανασυνδυασμοί φαίνεται να είναι διάσπαρτες στις περιοχές που κωδικοποιούν τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Μεγαλύτερη συχνότητα ανασυνδυασμών έχει παρατηρηθεί στις 2C και 3D περιοχές του ιικού γονιδιώματος (Cuervo et al., 2001; Georgopoulou and Markoulatos, 2001; Paximadi et al., 2006; Paximadi et al., 2007), ενώ ανταλλαγές γενετικού υλικού στην καψιδιακή περιοχή είναι πολύ σπάνιες (Blomqvist et al., 2003; Martin et al., 2002; Dedepsidis et al., 2008). Έχει προταθεί ότι δευτεροταγείς RNA δομές στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές είναι υπεύθυνες για την προαγωγή του συγκεκριμένου φαινομένου (Cuervo et al., 2001; Karakasiliotis et al., 2004; Paximadi et al., 2006). Οι ανασυνδυασμοί στην 5'UTR περιοχή είναι πολύ σπάνιοι και στη βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μια αναφορά αυτού του γεγονότος (Yang et al., 2003).

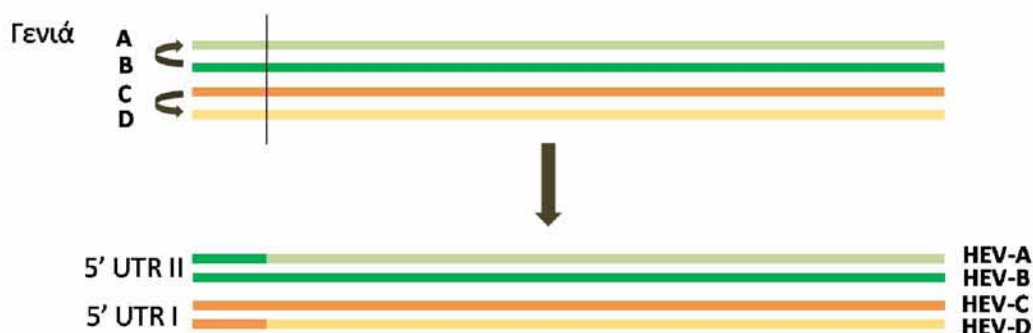
1.10.3 Ανασυνδυασμοί στους μη πολιο εντεροϊούς

Μέχρι πρόσφατα, η έρευνα είχε επικεντρωθεί στους πολιοϊούς, έχοντας ως αποτέλεσμα να έχουν πραγματοποιηθεί λίγες μελέτες στην επιδημιολογία και την γενετική των μη πολιο εντεροϊών. Με την εξάλειψη της πολιομυελίτιδας το ενδιαφέρον έχει πλέον στραφεί στους εντεροϊούς.

Η αλληλούχηση και η μελέτη των γονιδιωμάτων των πρότυπων στελεχών εντεροϊών ανέδειξε γεγονότα ανασυνδυασμού στις μη καψιδιακές περιοχές του γονιδιώματος τους. Η πρώτη ένδειξη ανασυνδυασμού προήλθε από τη μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος του Cocksackie A21, μέλος της ομάδας HEV-C, το οποίο παρουσίαζε μεγάλη ομολογία με τους πολιοϊούς στη μη καψιδιακή περιοχή (Hughes et al., 1989). Επίσης, υποστηρίχτηκε ότι το πρότυπο στέλεχος Echo 9 Hill προήλθε από τον ανασυνδυασμό των πρότυπων στελεχών Echo 18 Metcalf και Echo 9 Barty (Andersson et al., 2002). Το 1999 ο Santti και οι συνεργάτες (Santti et al., 1999) μελετώντας ολόκληρο το γονιδίωμα 24 πρότυπων στελεχών έδειξαν ότι ο ανασυνδυασμός έπαιξε σημαντικό ρόλο κατά την μακροεξελικτική ιστορία του γένους των εντεροϊών, έχοντας μάλιστα ως αποτέλεσμα οι HEVA και οι HEVB να διαθέτουν κοινή 5'UTR περιοχή, τύπου II, ενώ οι HEVC και οι HEVD να μοιράζονται την ίδια 5'UTR, τύπου I (εικόνα 1.10). Σύγκριση ολόκληρων των γονιδιωμάτων των πρότυπων στελεχών των HEVC ανέδειξε ανασυνδυασμό μέσα στο είδος καθώς επίσης και μεταξύ των HEVC και των

πολιοϊών, προτείνοντας έτσι ότι οι πολιοϊοί πρέπει να ενταχθούν στους HEVC (Brown et al., 2003). Τέλος, η πλήρης γενωμική ανάλυση όλων των προτύπων στελεχών HEVB παρέχει αρκετές αποδείξεις τυχαίου ανασυνδυασμού μεταξύ των διαφορετικών μελών (Oberste et al., 2004).

Γεγονότα ανασυνδυασμού έχουν επίσης βρεθεί και σε κυκλοφορούντα στελέχη εντεροϊών. Ανάλυση 35 στελεχών CAV9 σε τρεις γενωμικές περιοχές έδειξε ασυμφωνία μεταξύ των φυλογενετικών δέντρων της καψιδιακής και της 3D γενωμικής περιοχής καταδεικνύοντας γεγονότα ανασυνδυασμού (Santti et al., 2000). Ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος E11 στελεχών έδειξε ότι τα στελέχη αυτά παρουσίαζαν ομοιότητα με το πρότυπο στέλεχος μόνο στην καψιδιακή περιοχή ενώ στις υπόλοιπες περιοχές παρουσίαζαν ομοιότητα με τα πρότυπα στελέχη E1 και E9 (Lukashev et al., 2004). Μόνο μια εργασία έχει περιγραφεί απουσία ανασυνδυασμού σε μελετημένο κλινικό στέλεχος (E7 UMMC) ως προς το ομόλογο πρότυπό του (E7 Wallace) (Chua et al., 2001). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι γεγονότα ανασυνδυασμού συμβαίνουν και μεταξύ στελεχών που κυκλοφορούν σε ένα πληθυσμό την ίδια χρονική περίοδο (Bolanaki et al., 2007; Kottaridi et al., 2007; Mirand et al., 2007).



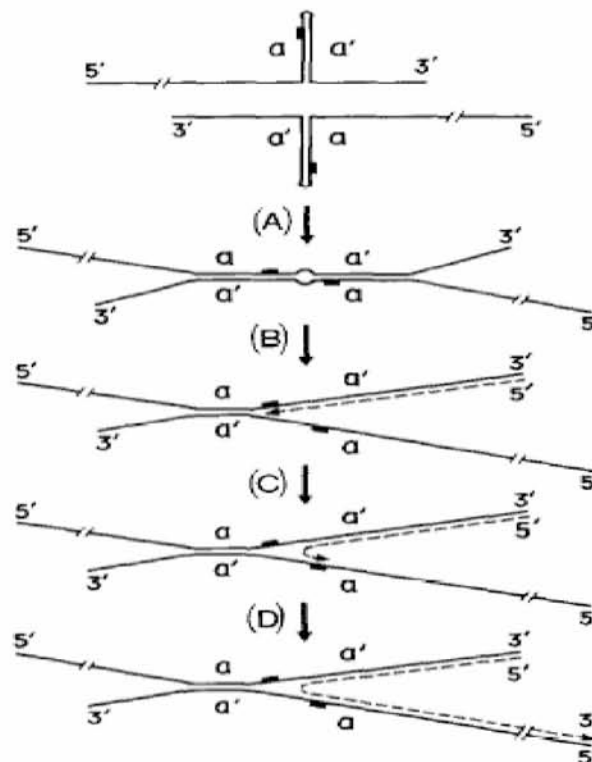
Εικόνα 1.10. Σχηματική αναπαράσταση των προτεινόμενων γεγονότων ανασυνδυασμού μεταξύ της 5' UTR και του υπόλοιπου γονιδιώματος κατά την διάρκεια εξέλιξης των εντεροϊών.

Όλοι οι ανασυνδυασμοί που έχουν μελετηθεί στους εντεροϊούς έχουν εντοπισθεί στην μη καψιδιακή περιοχή. Μεγαλύτερη συχνότητα ανασυνδυασμού έχει βρεθεί στις 2ABC και 3D γενωμικές περιοχές (Lukashev et al., 2005; Kottaridi et al., 2007; Bolanaki et al., 2007). Εξάιρεση αποτελεί ένα στέλεχος Coxsackie B4 το οποίο είναι ανασυνδυασμένο με Coxsackie B3 στην VP3 καψιδιακή περιοχή. Η επιβίωση ενός τέτοιου στελέχους αποδίδεται στο γεγονός

ότι οι δύο ιοί χρησιμοποιούν τον ίδιο υποδοχέα για την είσοδό τους στο κύτταρο (Buslama et al., 2007).

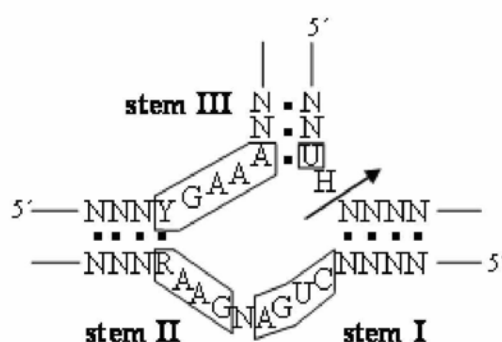
1.10.4 Μηχανισμοί ανασυνδυασμών

Ένας από τους κυριότερους μηχανισμούς που έχουν προταθεί είναι ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch mechanism) (Kirkegaard and Baltimore, 1986). Σύμφωνα με την θεωρία αυτή, ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα κατά την διαδικασία της επιμήκυνσης ενός νεοσυντιθέμενου μορίου -RNA, για αυτό ονομάζεται και ανασυνδυασμός αντιγραφικού τύπου (εικόνα 1.11). Η 3D πολυμεράση κατά την σύνθεση του RNA συναντά κάποιο εμπόδιο με αποτέλεσμα να σταματά η διαδικασία της επιμήκυνσης. Στο σημείο αυτό το ένζυμο αλλάζει υπόστρωμα και συνεχίζει την αντιγραφή, χρησιμοποιώντας σαν μήτρα ένα άλλο μόριο ιικού RNA. 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, Paximadi et al., 2007, Paximadi et al., 2008).



Εικόνα 1.11. Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Romanova et al. Οι συνεχείς γραμμές αναπαριστούν τα δύο μόρια RNA που θα χρησιμεύσουν ως μήτρες του ανασυνδυασμένου μορίου. Οι δυο αντίστροφες επαναλήψεις είναι οι α και α', οι συμπαγείς παύλες αποτελούν τις θέσεις στα δύο γονιδιώματα που γίνεται ο ανασυνδυασμός και η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το παραγόμενο ανασυνδυασμένο RNA. (Romanova et al., 1986)

Πιο πρόσφατα προτάθηκε από τον Gmyl και τους συνεργάτες του ένας μη-αντιγραφικός μηχανισμός ανασυνδυασμού ιικού RNA (εικόνα 1.12). Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται μηχανισμός τομής-σύνδεσης (mechanism of the breaking and joining) και προτείνει ότι τα μέρη του RNA κόβονται σε κάποια σημεία και τα εκτιθέμενα άκρα τους ενώνονται. Υπάρχουν δυο θεωρίες που περιγράφουν τον ανασυνδυασμό μέσω του μηχανισμού αυτού. Σύμφωνα με την πρώτη, φωσφοδιεστερικοί δεσμοί προσβάλλονται από ένα εξωτερικό νουκλεόφιλο και τα εκτιθέμενα (3' υδροξύλιο και 5' φωσφορικό) άκρα δημιουργούν μια δομή διακλάδωσης τα οποία ενώνονται από ενεργοποίηση της 5' φωσφορικής ομάδας (Chetverin, 1999). Η δεύτερη θεωρία εμπλέκει την προσβολή του φωσφοδιεστερικού δεσμού από ένα παρακείμενο 2-υδροξύλιο, το οποίο δρα σαν εσωτερικό νουκλεόφιλο. Τότε παράγονται ένα 2',3'-κυκλικοφωσφορικό και ένα 5' φωσφορικό άκρο, τα οποία μπορούν να ενωθούν με αντίδραση *trans*-εστεροποίησης (Gmyl et al., 1999).



Εικόνα 1.12. Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Gmyl et al. Παρουσιάζεται η hammerhead-like δομή με ριβοενζυμική δράση. Τα περιγεγραμμένα νουκλεοτίδια αποτελούν συντηρητικές θέσεις σε τέτοιου τύπου ριβοένζυμα. Y = πυριμιδίνη, R = πουρίνη και N = οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο. Η θέση τομής παρουσιάζεται με ένα βέλος (Gmyl et al., 1999).

1.11 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η εξέταση περιβαλλοντικών δειγμάτων για την παρουσία εντεροϊών και η μελέτη της επιβίωσης ανασυνδυασμένων στελεχών, στα πλαίσια μιας προσπάθειας κατανόησης της εξέλιξής τους.

Στο πρώτο μέρος της μελέτης κύριος στόχος ήταν η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου συγκέντρωσης και ανίχνευσης σε περιβαλλοντικά δείγματα. Συγκρίθηκαν και αξιολογήθηκαν πρωτόκολλα συγκέντρωσης βασισμένα στη χημική επεξεργασία του δείγματος ακολουθούμενη από φυγοκέντρωση, και τεχνικές προσρόφησης-έκλυσης σε φίλτρα. Για τη μοριακή ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων εντεροϊών αναπτύχθηκε πρωτόκολλο semi nested PCR με το σχεδιασμό εκκινητικών μορίων, τα οποία στοχεύουν στη 5' UTR περιοχή όλων των εντεροϊών. Η αξιοπιστία και η ευαισθησία της τεχνικής ελέγχθηκε τόσο σε πρότυπα όσο και σε κλινικά στελέχη. Τέλος, εξετάστηκαν δείγματα από ποτάμι και από λύματα για την παρουσία εντεροϊών.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας στόχος ήταν η αναζήτηση και μελέτη ανασυνδυασμών, μιας και αποτελούν ισχυρά γεγονότα εξέλιξης των εντεροϊών. Για το σκοπό αυτό, ενισχύθηκε και μελετήθηκε ολόκληρο το γονιδίωμα των στελεχών που απομονώθηκαν από το περιβάλλον καθώς επίσης και τριών στελεχών πολιοϊών, τα οποία απομονώθηκαν από κρούσματα πολιομυελίτιδας και παρουσίασαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής επιχειρήθηκε επίσης, η νουκλεοτιδική και φυλογενετική μελέτη όλων των περιοχών του γενόματος των προαναφερθέντων στελεχών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

2.1.1 Πρότυπα στελέχη

Τα πρότυπα στελέχη εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία προέρχονται από το Ινστιτούτο Pasteur Παρισίων, από τον οργανισμό ATCC (Rockville, Maryland, USA) και από το Εθνικό Κέντρο Επιδημιολογίας Bela Johan, στη Βουδαπέστη (Division of Virology, 'Bela Johan' National Center of Epidemiology, Budapest, Hungary). Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 ελήφθησαν από το NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom). Στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται τα πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη καθώς και ο αριθμός καταχώρησής τους στη Τράπεζα Αλληλουχιών (GenBank).

Το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 2 χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες καθώς και στον υπολογισμό της ευαισθησίας των μεθόδων συγκέντρωσης περιβαλλοντικών δειγμάτων και των μοριακών τεχνικών. Οι αλληλουχίες των πρότυπων στελεχών χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό των εκκινητικών μορίων για την ανίχνευση των εντεροϊών καθώς επίσης και για τη νουκλεοτιδική και φυλογενετική ανάλυση. Τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν δοκιμάστηκαν σε πρότυπα στελέχη εντεροϊών, τα οποία αναφέρονται στο πίνακα 2.1.

Ορότυπος	Στέλεχος	Αριθμός καταχώρησης στο GenBank	Ορότυπος	Στέλεχος	Αριθμός καταχώρησης στο GenBank
CAV1*	Tompkins	AF499635	Echo12*	Travis	X79047
CAV2*	Fleetwood	AY421760	Echo13*	Del Carmen	AY302539
CAV3*	Olson	AY421761	Echo14*	Tow	AY302540
CAV4*	High Point	AY421762	Echo15*	Ch 96-51	AY302541
CAV5	Swartz	AY421763	Echo16*	Harrington	AY302542
CAV6*	Gdula	AY421764	Echo17*	CHHE-29	AY302543
CAV7*	Parker	AY421765	Echo18*	Metcalf	AF317694
CAV8*	Donovan	AY421766	Echo19	Burke	AY302544
CAV9	Griggs	D00627	Echo20*	JV-1	AY302546
CAV10*	Kowalik	AY421767	Echo21*	Farina	AY302547
CAV11*	Belgium 1	AF499636	Echo24*	DeCamp	AY302548
CAV12*	Texas-12	AY421768	Echo25	JV-4	AY302549
CAV13*	Flores	AF303040	Echo26*	Coronel	AY302550
CAV14*	G-14	AF329687	Echo27*	Bacon	AY302551
CAV15*	G-9	AY028217	Echo29*	JV-10	AY302552
CAV16	G-10	U05876	Echo30	Bastianni	AF162711
CAV17	G-12	AF499639	Echo31*	Caldwell	AY302554
CAV18*	G-13	AF499640	Echo32*	PR-10	AY302555
CAV19	Dohi	AF499641	Echo33*	Toluca-3	AY302556
CAV20*	IH-35	AF499642	EV68	Fermon	AY426531
CAV21*	Coe	D00538	EV69	Toluca-1	AY302560
CAV22	Chulman	AF499643	EV70*	J670/71	D00820
CAV24	EH 24/70	D90457	EV71	Tainan/5746/98	AF304457
CBV1*	Japan	M16560	EV73	CA55-1988	AF241359
CBV2*	Ohio-1	AF081485	EV74	CA75-10213	AY556057
CBV3	Nancy	M88483	EV75	OK85-10362	AY556070
CBV4	JVB	X05690	EV77	TX97-10394	AY843302
CBV5*	Faulkner	AF114383	EV79	CA82-10385	AY843309
CBV6*	Schmitt	AF039205	EV79	CA79-10384	AY843297
Polio 1	Mahoney	V01148	EV80	CA67-10387	AY843298
Polio 1*	Sabin	V01150	EV81	CA68-10389	AY843299
Polio 2	Lansing	M12197	EV82	CA64-10390	AY843300
Polio 2*	Sabin	X00595	EV83	CA76-10392	AY843301
Polio 3	Leon	K01392	EV84	CIV2003-10603	DQ902712
Polio 3*	Sabin	K00043	EV85	BAN00-10353	AY843303
Echo1*	Farouk	AF029859	EV86	BAN00-10354	AY843304
Echo2*	Cornelis	AY302545	EV87	BAN01-10396	AY843305
Echo3*	Morrissey	AY302553	EV88	BAN01-10398	AY843306
Echo4*	Pesacek	AY302557	EV89	BAN00-10359	AY697459
Echo5	Noyce	AF083069	EV90	BAN99-10399	AY697460
Echo6	D'Amori	AY302558	EV91	BAN00-10406	AY697461
Echo7	Wallace	AY036579	EV97	BAN99-10355	AY843307
Echo9*	Barty	X92886	EV100	BAN2000-10500	NC009887
Echo11*	Gregory	X80059	EV101	CIV03-10361	AY843308

Πίνακας 2.1. Πρότυπα στελέχη εντεροϊών.

* Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη πειραματική διαδικασία.

2.1.2 Πειραματικά στελέχη

Μετά τον έλεγχο των εκκινητικών μορίων για την ανίχνευση όλων των εντεροϊών στα στελέχη αναφοράς, ακολούθησε έλεγχος σε στελέχη εντεροϊών που απομονώθηκαν από ασθενείς και από το περιβάλλον. Συνολικά μελετήθηκαν 49 κλινικά στελέχη διαφόρων οροτύπων, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 2.2 και προέρχονται από την συλλογή δειγμάτων του εργαστηρίου μας και το National Reference Center for Enteroviruses Cantacuzino Institute, Bucharest, Romania. Οι ορότυποι στους οποίους αντιστοιχούν, η περιοχή προέλευσης, το έτος απομόνωσης και οι κλινικές εκδηλώσεις με τις οποίες έχουν συσχετισθεί, παρουσιάζονται στον ίδιο πίνακα.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής αλληλουχήθηκαν σχεδόν σε ολόκληρο το γένωμα στελέχη εντεροϊών που απομονώθηκαν από το περιβάλλον στη παρούσα μελέτη. Μελετήθηκαν επίσης σε ολόκληρο το γένωμα και τρία στελέχη πολιοϊών τύπου 1, τα οποία είχαν απομονωθεί το 1996 από αντίστοιχα δείγματα κοπράνων τριών περιστατικών οξείας χαλαρής παράλυσης στο τμήματος Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur. Τα τρία αυτά περιστατικά προήρχοντο από μη εμβολιασμένα παιδιά αθίγγανων. Η αρχική απομόνωση και αναγνώριση των στελεχών έγινε μεταξύ του τέλους Ιουνίου και Σεπτεμβρίου του 1996, την ίδια περίοδο που στην Αλβανία, υπήρχε μία σοβαρή επιδημία πολιομυελίτιδας από πολιοϊό τύπου 1. Το στέλεχος που θεωρήθηκε υπεύθυνο για την επιδημία απομονώθηκε από το ποταμό Λάνα δύο μήνες πριν το πρώτο κρούσμα χαλαρής παράλυσης μαζί με ανασυνδυασμένα εμβολιακά στελέχη πολιοϊών (Divizia et al., 1999). Στον πίνακα 2.3 περιλαμβάνονται πληροφορίες που αφορούν τον ορότυπο των στελεχών, την προέλευση των στελεχών, τις κλινικές εκδηλώσεις, την χρονολογία απομόνωσής τους, καθώς και τον αριθμό καταχώρησής τους στην παγκόσμια τράπεζα αλληλουχιών.

Κλινικό Στέλεχος	Ορότυπος	Γεωγραφική προέλευση	Έτος απομόνωσης	Βιολογικό υλικό	Κλινική εικόνα
Sm2/71/1	CAV4	Ρουμανία	1971	Άγνωστο	Μηνιγγίτιδα
243/7/99	CAV8	Ρουμανία	1971	Κόπρανα	Χωρίς συμπτώματα
611/80/1	CAV9	Ρουμανία	1980	Άγνωστο	Παροδική παράλυση
65/89/1	CAV9	Ρουμανία	1989	Άγνωστο	Παροδική παράλυση
113/73/2	CAV9	Ρουμανία	1973	Άγνωστο	Μόνιμη παράλυση
A9/He1	CAV9	Κύπρος	2002	Περιβάλλον	-
A9/He2	CAV9	Κύπρος	2002	Περιβάλλον	-
A9/He3	CAV9	Κύπρος	2002	Περιβάλλον	-
A9/He5	CAV9	Κύπρος	2002	Περιβάλλον	-
5441	CAV16	Ελλάδα	1994	Άγνωστο	HFMD
99/74/1	CBV1	Ρουμανία	1974	Άγνωστο	Παροδική παράλυση
98/74/2	CBV1	Ρουμανία	1974	Άγνωστο	Παροδική παράλυση
88/74/9	CBV1	Ρουμανία	1974	Άγνωστο	Παροδική παράλυση
116/95/2	CBV2	Ρουμανία	1974	Άγνωστο	Άγνωστο
118/95/1	CBV2	Ρουμανία	1974	Άγνωστο	Άγνωστο
5207 B	CBV2	Ελλάδα	1984	Άγνωστο	Άγνωστο
5211 B	CBV2	Ελλάδα	1984	Άγνωστο	Άγνωστο
109/85/1	CBV3	Ρουμανία	1985	Κόπρανα	Παροδική παράλυση
123/95/1	CBV3	Ρουμανία	1995	Άγνωστο	Μηνιγγο- εγκεφαλίτιδα
77/78/3	CBV3	Ρουμανία	1978	Άγνωστο	Μηνιγγο- εγκεφαλίτιδα
169/75/1	CBV4	Ρουμανία	1986	Κόπρανα	Γαστρεντερικές διαταραχές
69/86/1	CBV4	Ρουμανία	1986	Κόπρανα	Γαστρεντερικές διαταραχές
14/70/1	CBV5	Ρουμανία	1970	ENY	Μηνιγγίτιδα
254/77/1	CBV5	Ρουμανία	1977	Άγνωστο	Παράλυση προσώπου
81020	CBV5	Ελλάδα	2001	Άγνωστο	Μηνιγγίτιδα
6451G	CBV5	Ελλάδα	1981	Άγνωστο	Άγνωστο
86/73/1	CBV6	Ρουμανία	1973	Άγνωστο	Παροδική παράλυση
7/73/19	CBV6	Ρουμανία	1973	Άγνωστο	Επιπεφυκίτιδα
AB-19	CBV6	Ρουμανία	1973	Άγνωστο	Άγνωστο
138/79/1	Echo3	Ρουμανία	1979	Κόπρανα	Παράλυση προσώπου
243/97/1	Echo3	Ρουμανία	1997	Κόπρανα	βρογχοπνευμονία
156/98/1	Echo5	Ρουμανία	1998	Κόπρανα	Χωρίς συμπτώματα
Foun	Echo6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
Bled	Echo6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
Tsikan	Echo6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα

Freg	Echo6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
44/73/1	Echo7	Ρουμανία	Άγνωστο	Άγνωστο	Άγνωστο
307/77/1	Echo9	Ρουμανία	1977	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
121/82/1	Echo9	Ρουμανία	1982	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
257/98/1	Echo11	Ρουμανία	1998	Κόπρανα	Παράλυση προσώπου
Papad	Echo13	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
Pleur	Echo13	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
Pap	Echo13	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
1817	Echo14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριπικά συμπτώματα
1729	Echo14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριπικά συμπτώματα
1374	Echo14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριπικά συμπτώματα
85671	Echo30	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
86027	Echo30	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
85929	Echo30	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα

Πίνακας 2.2. Κλινικά και περιβαλλοντικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στον έλεγχο των εκκινητικών μορίων για την ανίχνευση εντεροϊών.

Στέλεχος	Ορότυπος	Γεωγραφική προέλευση	Έτος απομόνωσης	Βιολογικό υλικό	Κλινική εικόνα	Αριθμός καταχώρησης στο GenBank
Kats	Polio1	Ελλάδα	1996	Κόπρανα	Χαλαρή παράλυση	AY956405 AY960848 AY956408 AY962580 AY962579 AY962578 AY962577
Hal	Polio1	Ελλάδα	1996	Κόπρανα	Χαλαρή παράλυση	AY956406 AY960849 AY962582 AY962583 AY956409 AY962584
Kar	Polio1	Ελλάδα	1996	Κόπρανα	Χαλαρή παράλυση	AY962586 AY962585 AY962587 AY962588 AY956407 AY960850 AY956410
LR11F7	Echo7	Ελλάδα	2005	Λύματα	-	FJ460595
LR31G7	Echo3	Ελλάδα	2005	Λύματα	-	FJ766334
LR51A5	Echo6	Ελλάδα	2006	Λύματα	-	-
LR61G3	Echo6	Ελλάδα	2006	Λύματα	-	-

Πίνακας 2.3. Κλινικά και περιβαλλοντικά στελέχη που αλληλουχήθηκαν και μελετήθηκαν στο μεγαλύτερο τμήμα του γενόματός τους.

2.2 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Εξετάστηκαν 42 περιβαλλοντικά δείγματα για τη παρουσία εντεροϊών. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από τον Ιούλιο του 2005 έως τον Αύγουστο του 2007. Τα δείγματα προήρχοντο από το Βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας (17 δείγματα), των Τρικάλων (5 δείγματα), του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (2 δείγματα) και από τον Πηνειό ποταμό (περιοχές αισθητικού δάσους και Αμυγδαλιάς) (18 δείγματα). Στον πίνακα 2.4 παρουσιάζονται τα περιβαλλοντικά δείγματα, ο τόπος προέλευσης και η ημερομηνία λήψης τους. Όλα τα δείγματα επεξεργάστηκαν εντός 24 ωρών από τη λήψη τους.

Δείγμα	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Προέλευση	Βιολογικό υλικό
B1	13/07/2005	Αισθητικό δάσος	Νερό Πηνειού
Γ1	13/07/2005	Αμυγδαλιά	Νερό Πηνειού
LR1	14/07/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
B2	7/09/2005	Αισθητικό δάσος	Νερό Πηνειού
Γ2	7/09/2005	Αμυγδαλιά	Νερό Πηνειού
LR2	8/09/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
B3	5/10/2005	Αισθητικό δάσος	Νερό Πηνειού
Γ3	5/10/2005	Αμυγδαλιά	Νερό Πηνειού
LR3	6/10/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
B4	16/11/2005	Αισθητικό δάσος	Νερό Πηνειού
Γ4	16/11/2005	Αμυγδαλιά	Νερό Πηνειού
B5	24/05/2005	Αισθητικό δάσος	Νερό Πηνειού
Γ5	24/05/2005	Αμυγδαλιά	Νερό Πηνειού
LR5	25/05/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
B6	15/06/2006	Αισθητικό δάσος	Νερό Πηνειού
Γ6	15/06/2006	Αμυγδαλιά	Νερό Πηνειού
LR6	16/06/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
B7	29/06/2006	Αισθητικό δάσος	Νερό Πηνειού
Γ7	29/06/2006	Αμυγδαλιά	Νερό Πηνειού
LR7	4/07/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
B8	12/07/2006	Αισθητικό δάσος	Νερό Πηνειού
Γ8	12/07/2006	Αμυγδαλιά	Νερό Πηνειού
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
B11	14/09/2006	Αισθητικό δάσος	Νερό Πηνειού
Γ11	14/09/2006	Αμυγδαλιά	Νερό Πηνειού
TR1	15/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
LR11	18/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
GN2	14/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	Λύματα
GN1	21/09/2006	Βιολ. Καθαρισμός Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	Λύματα
TR2	28/11/2006	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
TR3	18/01/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
LR12	5/02/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LR13	14/02/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
TR4	18/04/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
TR5	3/06/2007	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Αστικά λύματα
LR14	24/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα

LR15	26/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LRB1	26/07/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Βοθρολύματα
LR16	1/08/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα
LRB2	1/08/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Βοθρολύματα

Πίνακας 2.4. Περιβαλλοντικά δείγματα.

2.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

Η πλειοψηφία των δειγμάτων του πίνακα 2.2 καθώς τα τρία δείγματα Polio1 του πίνακα 2.3 προήρχοντο από κόπρανα. Πριν από τον ενοφθαλμισμό των κοπράνων σε κυτταροκαλλιέργεια προηγείται ειδική διαδικασία επεξεργασίας σύμφωνα με τους κανόνες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (Π.Ο.Υ).

Η επεξεργασία των κοπράνων πραγματοποιείται σε θάλαμο βιολογικής προστασίας (Biological Safety Cabinet, BSC) επιπέδου 2 (Biological Safety Level, BSL 2). Σε αριθμημένους σωλήνες φυγοκέντρησης (πλαστικοί σωλήνες των 15 ml, τύπου falcon) προστίθενται 10 ml πλήρους διαλύματος PBS (εμπλουτισμένου με αντιβιοτικά), 1 gr αποστειρωμένων γυάλινων σφαιριδίων, 1 ml χλωροφορμίου και 2 gr από κάθε δείγμα κοπράνων. Ακολουθεί ομογενοποίηση μέσω ανάμειξης (vortex) για 20 min. Στην συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση των σωλήνων στις 1500 x g για 20 min, στους 20°C. Το υπερκείμενο που προκύπτει μετά την φυγοκέντρωση μοιράζεται σε δύο σωλήνες φύλαξης, από τους οποίους ο ένας φυλάσσεται στους -20°C για μελλοντική χρήση, ενώ ο άλλος στους +4°C για ενοφθαλμισμό σε κυτταροκαλλιέργειες.

Διαλύματα:

Το πλήρες PBS (pH7.4) με αντιβιοτικά παρασκευάζεται από τα διαλύματα Α, Β, Γ και αντιβιοτικά.

Διάλυμα Α (ατελές PBS): 8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,91 gr Na₂HPO₄ (άνυδρο) και 0,12 gr KH₂PO₄ (Merck, Germany) διαλύονται σε 600-800 ml απεσταγμένου νερού. Ακολουθεί προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 1000 ml. Το μείγμα αποστειρώνεται σε κλίβανο 10 psi (70 kPa) για 15 min.

Διάλυμα Β: 0,10 gr MgCl₂·6H₂O (Merck, Germany) διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένου νερού. Ακολουθεί αποστείρωση για 15 min σε κλίβανο 10 psi (70 kPa).

Διάλυμα Γ: 0,10 gr CaCl_2 (Merck, Germany) διαλύονται σε 100 ml απεσταγμένου νερού. Ακολουθεί αποστείρωση για 15 min σε κλίβανο 10 psi (70 kPa).

Τα διαλύματα Α, Β και Γ αναμειγνύονται σε αναλογία 8: 1: 1. Με προσθήκη 1×10^5 units πενικιλίνης (Gibco, USA) και 0,1 gr στρεπτομυκίνης (Gibco, USA) σε 1000 ml πλήρους PBS, προκύπτει πλήρες PBS με τελική συγκέντρωση πενικιλίνης 100 units/ml και στρεπτομυκίνης 100 $\mu\text{g/ml}$. Το διάλυμα φυλάσσεται στους $4-8^\circ\text{C}$ για διάστημα 7 ημερών.

2.4 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Λόγω του μεγάλου όγκου των περιβαλλοντικών δειγμάτων και της χαμηλής συγκέντρωσης ιών σε αυτά, προηγούνται μέθοδοι συγκέντρωσης των ιών πριν την απομόνωσή τους. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή είναι η μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων, η μέθοδος καθίζησης με PEG και η μέθοδος έκλουσης - προσρόφησης σε ηλεκτραρνητικά φίλτρα. Η επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων πραγματοποιείται σε θάλαμο βιολογικής προστασίας (Biological Safety Cabinet, BSC) επιπέδου 2 (Biological Safety Level, BSL 2). Για τον έλεγχο της τοξικότητας και της παρουσίας αναστολέων μέρος κάθε περιβαλλοντικού δείγματος ενοφθαλμίστηκε με γνωστή συγκέντρωση εμβολιακού στελέχους πολιοϊού 2 (Sabin2).

2.4.1 Μέθοδος διαχωρισμού δυο φάσεων

Αρχικά φυγοκεντρούνται 500 ml δείγματος στις 1000 g για 10 min. Το ίζημα φυλάσσεται στους 4°C , ενώ ρυθμίζεται το pH του υπερκείμενου στο 7-7,5. Σε 500 ml υπερκείμενου (pH 7-7,5) προστίθενται 39,5 ml 22% (w/v) dextran, 287 ml 29% (w/v) PEG6000 και 35 ml NaCl 5 N (Sigma, USA). Το μείγμα αναδεύεται για 1 h στους 4°C και στη συνέχεια εισάγεται σε φιάλη διαχωρισμού, όπου και επωάζεται στους 4°C για 48 h. Η κάτω φάση, όπου και συγκεντρώνονται τα ιικά σωματίδια, συλλέγεται και προστίθεται στο ίζημα που φυλάχθηκε από τη φυγοκέντρωση. Στο μίγμα προστίθεται χλωροφορμίο 20% v/v και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 1500 g για 20 min. Η πάνω φάση συλλέγεται σε πλαστικό σωλήνα, όπου και προστίθενται πενικιλίνη και

στρεπτομυκίνη σε τελικές συγκεντρώσεις 100 units/ml και 100 µg/ml αντίστοιχα (WHO 2003).

2.4.2 Μέθοδος καθίζησης με PEG

Σε δείγμα όγκου 500 ml προστίθεται 10% W/V PEG6000 και NaCl (Sigma, USA) σε τελική συγκέντρωση 0,5 M. Το μίγμα αναδεύεται για 18 h στους 4°C και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 11.000 rpm για 1h. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται σε 5 ml θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιιεργειών (MM).

2.4.3 Μέθοδος προσρόφησης - έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα

Δείγμα όγκου 500 ml (στη περίπτωση των λυμάτων) ή 4 L (στη περίπτωση πόσιμου νερού) φυγοκεντρείται σε 1000 rpm για 2 min. Το υπερκείμενο συλλέγεται και ρυθμίζεται το pH στο 3.8 με τη προσθήκη 3 N HCl. Στη συνέχεια, τα ιικά σωματίδια φορτίζονται θετικά παρουσία Mg^{2+} , με τη προσθήκη $MgCl_2$ (Merck, Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,05 M. Ακολουθεί αργή ανάδευση και φιλτράρισμα σε ηλεκτραρνητικά φορτισμένο φίλτρο (MF-Millipore), διαμέτρου 47 mm και μέγεθος πόρου 3 µm, στην επιφάνεια του οποίου προσροφούνται τα ιικά σωματίδια. Το φίλτρο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο δοχείο ζέσεως 250 ml, όπου προστίθενται 10 ml διαλύματος 0,05 M Tris με pH 9, εμπλουτισμένου με 3% BSA. Η έκλυση πραγματοποιείται με αργή ανάδευση για 10 min. Αφού απομακρυνθεί το διάλυμα, η διαδικασία της έκλυσης επαναλαμβάνεται. Το φίλτρο φυλάσσεται στους 4°C, ενώ ρυθμίζεται το pH του συγκεντρωμένου δείγματος στο 7 με τη χρήση διαλύματος 3 N HCl. Ακολουθεί περαιτέρω συγκέντρωση του δείγματος με τη μέθοδο καθίζησης με PEG: στο δείγμα προστίθεται 10% w/v PEG6000 και NaCl (Sigma, USA) σε τελική συγκέντρωση 0,5 M. Το μίγμα αναδεύεται για 18 h στους 4°C και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 11.000 rpm για 1h. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται σε 2 ml θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιιεργειών (MM).

2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΩΝ

2.5.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Για την απομόνωση των ιών χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές: RD (rhabdomyosarcoma), Hep-2 (human epidermoid carcinoma) και L₂₀B (mouse cells). Όλες οι διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας πραγματοποιούνται κάτω από ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε ειδικές καμπίνες βιολογικής ασφαλείας (P2) με κάθετη νηματική ροή αέρα και με την χρήση αποστειρωμένων υλικών (υγρών αντιδραστηρίων και γυάλινων σκευών). Για την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιείται το μέσο καλλιέργειας για ανάπτυξη (Growth Medium, GM), το οποίο διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε ορό (συνήθως 10%), επάγοντας τη γρήγορη ανάπτυξη των κυττάρων. Για τη διατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιείται το μέσο καλλιέργειας για διατήρηση (Maintenance Medium, MM), το οποίο έχει περιεκτικότητα σε ορό περίπου 2% και χρησιμοποιείται για τη διατήρηση των κυτταροκαλλιιεργειών σε μία κατάσταση αργής κυτταρικής ανάπτυξης κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού των ιών.

Τα κύτταρα φυλάσσονται στους -70°C παρουσία DMSO. Για την απόψυξή τους μεταφέρονται σε υδατόλουτρο με απεσταγμένο νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μέχρι τα κύτταρα να ξεπαγώσουν. Ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων και του θρεπτικού μέσου σε πλαστική φιάλη καλλιέργειας 25 cm². Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα GM (3-4 ml) για την παραγωγή μίας μονοστιβάδας κυττάρων. Στην συνέχεια η πλαστική φιάλη καλλιέργειας επωάζεται για 4-6 h σε κλίβανο στους 37°C, ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στην επιφάνειά της και ακολουθεί απομάκρυνση του DMSO (το οποίο αποτελεί μεθυλιωτικό παράγοντα) και προσθήκη 7 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού GM. Η πλαστική φιάλη καλλιέργειας επανατοποθετείται στους 37°C ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα.

Για τον αναδιπλασιασμό των κυττάρων ακολουθείται η εξής διαδικασία: οι φιάλες των κυττάρων απομακρύνονται από τον κλίβανο και εξετάζονται ως προς την ποιότητά τους σε μικροσκόπιο διέλευσης φωτός. Το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και ακολουθούν δύο διαδοχικά πλυσίματα με διάλυμα τρυψίνης-EDTA και επώση 2 min στους 37°C για την αποκόλληση των κυττάρων από την

επιφάνεια της πλαστικής φιάλης καλλιέργειας. Αφού διαπιστωθεί πλήρης αποκόλληση, τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 21 ml καλλιεργητικού μέσου GM με ταυτόχρονη ανάδευση με πιπέτα (10ml) ώστε να διαλυθούν πιθανά συσσωματώματα κυττάρων. Τέλος τα κύτταρα μοιράζονται σε 3 πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας, οι οποίες τοποθετούνται για ανάπτυξη στους 37°C. Η διαδικασία των ανακαλλιιεργειών επαναλαμβάνεται κάθε 2-3 ημέρες, ανάλογα με την κατάσταση των κυττάρων.

Διαλύματα:

Διάλυμα ερυθρού της φαινόλης 0,4%: Το ερυθρό της φαινόλης αποτελεί δείκτη pH. Δημιουργία διαλύματος 0,4% w/v (Merck, Germany) σε απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί αποστείρωση σε κλίβανο 10 psi (70 kPa) για 15 min.

Διάλυμα NaHCO₃ 7,5%: 7,5 gr στερεού NaHCO₃ (Sigma, USA) διαλύονται σε 50 ml απεσταγμένου νερού. Προστίθενται 0,2 ml διαλύματος ερυθρού της φαινόλης 0,4% και συμπληρώνεται απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Ακολουθεί αποστείρωση σε κλίβανο στους 10psi (70 kPa) για 15 λεπτά.

Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης: σε 100 ml PBS διαλύονται 1×10^6 units πενικιλίνης και 1 gr στρεπτομυκίνης. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω φιλτραρίσματος.

GM (Eagle's Growth Medium): για 100 ml διαλύματος αναμιγνύονται 85,3 ml Eagle's minimum essential medium (Earl's salts base, no bicarbonate) (Sigma, USA), 1 ml L-γλουταμίνη 200 mM (L-glutamine) (Gibco, USA), 10 ml Fetal Calf Serum (Sigma, USA), 1,5 ml διάλυμα NaHCO₃ 7,5%, 1 ml HEPES 1M (Merck, Germany), 1ml διαλύματος στρεπτομυκίνης-πενικιλίνης, 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4%.

MM (Eagle's Meintenance medium): για 100 ml διαλύματος αναμιγνύονται 92,3 ml Eagle's minimum essential medium (Earl's salts base, no bicarbonate), 1 ml L-glutamine 200 mM, 2 ml Fetal Calf Serum(Sigma, USA), 2,5 ml διαλύματος NaHCO₃ 7,5%, 1 ml HEPES 1M, 1ml διαλύματος στρεπτομυκίνης-πενικιλίνης, 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4%.

Διάλυμα τρυψίνης: 1 gr Difco 1:250 trypsin διαλύεται σε 400 ml ατελούς PBS και ακολουθεί ήπια ανάδευση στους 36°C για 30 min. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω φιλτραρίσματος.

Διάλυμα EDTA: 0,1 gr EDTA (Sigma, Germany) διαλύονται σε 10 ml απιονισμένο νερό. Ακολουθεί αποστείρωση σε κλίβανο 10 psi (70 kPa) για 15 min. Κατά τη χρήση, 0,4 ml του διαλύματος προστίθενται σε 20 ml ατελούς PBS προκειμένου να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 0,02%.

2.5.2 Ενοφθαλμισμός κλινικών δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες

Σε πλαστικούς σωλήνες καλλιέργειας μεταφέρονται 2 ml αιωρήματος κυττάρων σε θρεπτικό μέσο GM. Οι σωλήνες επωάζονται στους 37°C για 24-48 h. Αφού διαπιστωθεί η ανάπτυξη μονοστιβάδας κυττάρων στους σωλήνες, το GM αντικαθίσταται με 2 ml MM. Οι σωλήνες μεταφέρονται σε άλλο θάλαμο εργασίας (BSL-2) για την σπορά των ιών.

Από το ENY και το υπερκείμενο επεξεργασμένων κοπράνων μεταφέρονται 200μl στους σωλήνες κυτταροκαλλιέργειας. Στο σωλήνα που χρησιμοποιείται αρνητικός μάρτυρας μεταφέρεται ίδια ποσότητα θρεπτικού υλικού MM. Οι σωλήνες μεταφέρονται σε κλίβανο επώασης στους 37°C, όπου τοποθετούνται υπό κλίση (5°) σε περιστρεφόμενο κύλινδρο. Οι σωλήνες εξετάζονται καθημερινά για πιθανή εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης, και τα αποτελέσματα της παρακολούθησης καταγράφονται. Μετά από την παρατήρηση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης, οι σωλήνες ψύχονται στους -20°C. Για ενίσχυση του ιικού τίτλου, η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις φορές και από τους σωλήνες της τρίτης ανακαλλιέργειας λαμβάνεται το υλικό για περαιτέρω επεξεργασία.

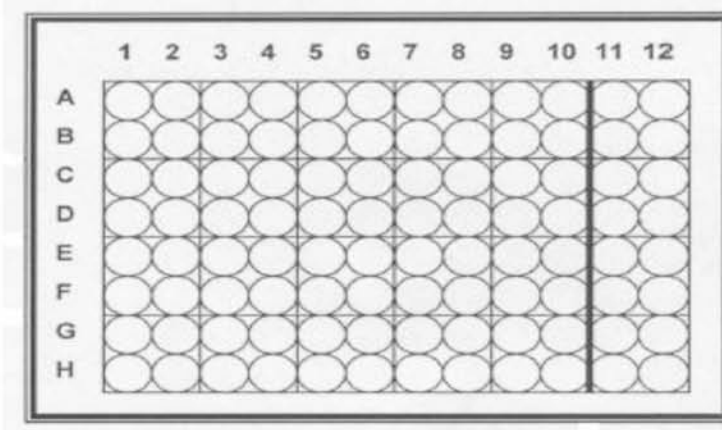
2.5.3 Ενοφθαλμισμός περιβαλλοντικών δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες

Για την απομόνωση εντεροϊών, ακόμα και αυτών που βρίσκονται σε μείγμα σε χαμηλή συγκέντρωση, από τα επεξεργασμένα περιβαλλοντικά δείγματα πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (εικόνα 2.1).

Σε κάθε θέση της πλάκας μεταφέρονται 100 μl αιωρήματος κυττάρων σε θρεπτικό μέσο MM. Οι πλάκες επωάζονται στους 37°C για 24 h. Από τα επεξεργασμένα περιβαλλοντικά δείγματα μεταφέρονται 50 μl σε κάθε θέση των στηλών 1 έως 10. Οι θέσεις στις στήλες 11 και 12 χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί

μάρτυρες όπου προστίθεται 50 μl θρεπτικού υλικού MM. Οι πλάκες μεταφέρονται σε κλίβανο στους 37°C για 1 h, ώστε να περάσει ο ιός στα κύτταρα. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό και το δείγμα απομακρύνονται προσεκτικά από κάθε θέση και προστίθενται 200 μl θρεπτικού μέσου MM. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για την απομάκρυνση τοξικών παραγόντων που υπάρχουν στα περιβαλλοντικά δείγματα και μπορούν να καταστρέψουν τα κύτταρα. Οι πλάκες μεταφέρονται σε κλίβανο στους 37°C και εξετάζονται καθημερινά για πιθανή εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης. Μετά από την παρατήρηση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης, οι πλάκες ψύχονται στους -20°C.

Για ενίσχυση του ιικού τίτλου, σε πλάκα στρωμένη με κύτταρα όπως παραπάνω, μεταφέρονται 50 μl σε κάθε θέση από την αντίστοιχη θέση της πλάκας του πρώτου ενοφθαλμισμού. Ακολουθεί επώαση στους 37°C μέχρι την ανάπτυξη πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται δύο φορές. Από τις θέσεις της τρίτης ανακαλλιέργειας που εμφάνισαν κυτταροπαθογόνο δράση λαμβάνεται το υλικό για περαιτέρω επεξεργασία.



Εικόνα 2.1. Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων.

2.5.4 Σειριακές αραιώσεις

Η διαδοχική αραιώση των κυτταροκαλλιιεργειών, στις οποίες είχαν ενοφθαλμιστεί τα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα πραγματοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, προκειμένου να διαχωριστούν πιθανά μείγματα ιών.

Για κάθε δείγμα δημιουργούνται 10 αραιώσεις, από 10^{-1} έως 10^{-10} , σε πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (eppendorf). Οι αραιώσεις πραγματοποιούνται σε θρεπτικό μέσο MM. Στη συνέχεια, για κάθε δείγμα 100 μl από κάθε αραιώση ενοφθαλμίζονται στις θέσεις 1 έως 10 αντίστοιχα σε δύο γραμμές, σε πλάκα

μικροτιτλοποίησης στρωμένης με κύτταρα. Έτσι σε κάθε πλάκα μικροτιτλοποίησης πραγματοποιούνται αραιώσεις 4 δειγμάτων (για κάθε δείγμα γίνονται δύο επαναλήψεις). Οι στήλες 11 και 12 αποτελούν τους αρνητικούς μάρτυρες. Οι πλάκες τοποθετούνται στους 37°C για επώαση. Η χαμηλότερη αραιώση κάθε δείγματος στην οποία παρατηρείται κυτταροπαθογόνος δράση ενοφθαλμίζεται σε πλαστικό σωλήνα κυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται το απόθεμα (stock) των ικών στελεχών.

2.5.5 Υπολογισμός ιικού τίτλου

Ο αριθμός των ικών σωματιδίων που περιέχονται σε 100 μl του ιικού δείγματος αποτελεί τον τίτλο του ιού. Ο ιικός τίτλος υπολογίστηκε για το εμβολιακό στέλεχος πολιοϊού 2 (Sabin 2), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας στους ελέγχους ευαισθησίας των πειραματικών μεθόδων. Ο υπολογισμός του ιικού τίτλου πραγματοποιήθηκε σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων στρωμένης με L₂₀-B κύτταρα.

Σε πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (eppendorf) δημιουργούνται 8 σειριακές αραιώσεις του ιού από 10⁻¹ έως 10⁻⁸ σε θρεπτικό υλικό MM. Στη συνέχεια, 500 μl της 10⁻¹ αραιώσης ενοφθαλμίζονται στις θέσεις A1-A5 (100 μl/θέση), ενώ 500 μl της 10⁻² αραιώσης ενοφθαλμίζονται στις θέσεις B1-B10 (100 μl/θέση). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι και τον ενοφθαλμισμό της 10⁻⁸ αραιώσης στην πλάκα. Οι στήλες 11 και 12 χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί μάρτυρες. Η πλάκα τοποθετείται για επώαση στους 37°C και παρακολουθείται καθημερινά για την εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίζεται ο ιικός τίτλος είναι:

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

L: η μικρότερη αραιώση όπου εμφανίζεται πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

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

2.6 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Για την εκχύλιση του ιικού RNA από τις κυτταροκαλλιέργειες καθώς και κατευθείαν από τα επεξεργασμένα περιβαλλοντικά δείγματα, εφαρμόστηκε η

μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (Casas et al, 1995). Σε πλαστικό σωλήνα των 2 ml αναμιγνύονται 100 µl δείγματος, 10 µl γλυκογόνου (100mg/ml) και 300 µl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση (vortex) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 20 min, ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών και ιικών μεμβρανών για την απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων. Στη συνέχεια, προστίθενται 400 µl ισοπροπανόλης (διατηρημένης στους -20 °C). Μετά από ισχυρή ανάδευση (vortex), τα δείγματα διατηρούνται στους -20°C για 20 min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 min στις 13.000 x g (σε θερμοκρασία 4°C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αναδιαλύεται με ισχυρή ανάδευση σε 500 µl αιθανόλης 70% (διατηρημένης στους -20 °C). Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρωση στις 14.000 x g για 10 min. Η αιθανόλη απομακρύνεται πλήρως και το ίζημα αναδιαλύεται σε 100 µl διπλά απιονισμένου νερού (ddH₂O) (Sigma, USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών. Τα RNA των δειγμάτων φυλάχθηκαν στους -80°C, για μακροπρόθεσμη χρήση.

Διαλύματα:

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

2.7 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

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

Η παραπάνω διαδικασία διεκπεραιώθηκε για την περαιτέρω εφαρμογή της PCR με όλα τα εκκινητικά μόρια, με την εξαίρεση των εκκινητικών μορίων

EUC2-EUG3a,b,c, πριν την εφαρμογή των οποίων προηγείται αντίστροφη μεταγραφή με τα αντικωδικά εκκινητικά μόρια EUC2a και EUC2b σε συγκέντρωση 10 pmol, σε θερμοκρασία επώασης 42°C, αντί 37°C (Caro et al., 2001).

2.8 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων του ιικού γενώματος προέρχονται είτε από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, είτε σχεδιάστηκαν για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής. Ο σχεδιασμός των εκκινητικών μορίων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Primer3, Whitehead Institute (<http://www.genome.wi.mit.edu/genomesoftware/other/>).

Τα εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση όλων των οροτύπων των εντεροϊών σχεδιάστηκαν σε συντηρημένα τμήματα της 5' UTR του γονιδιώματός τους. Η αναζήτηση των συντηρημένων αυτών τμημάτων πραγματοποιήθηκε με την ομοπαράθεση των αλληλουχιών των πρότυπων στελεχών του πίνακα 2.1 με τη βοήθεια του προγράμματος ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>). Για την αύξηση της ευαισθησίας σχεδιάστηκε και ένας εσωτερικός αντικωδικός εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε στη semi-nested PCR. Στον πίνακα 2.5 παρουσιάζονται τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση των εντεροϊών, η αλληλουχία τους, η θέση που αναγνωρίζουν πάνω στο γονιδίωμα και η πολικότητά τους.

Σε όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που στοχεύουν το 16sRNA της *Escherichia coli* (πίνακας 2.6), για τον έλεγχο παρουσίας αναστολέων της PCR (Widjoatmodjo et al., 1995).

Τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος των Polio1 στελεχών (Kats, Hal, Kar), του Echo 7 (LR11F7), του Echo 3 (LR31G7) και των Echo 6 (LR51A5, LR61G3) περιγράφονται στους πίνακες 2.7, 2.8, 2.9, και 2.10 αντίστοιχα.

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 2.5. 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	AGGCCCGGGAACGTATTCAC

Πίνακας 2.6. Εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση *Escherichia coli*. Η θέση αναφέρεται στο 16sRNA της *Escherichia coli*.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Βιβλιογραφία
72437	1-20	Sense	TTAAAACAGCTCTGGGGTTG	Mulders et al. 1999
216616	545-565	Antisense	GGAACACGGACACCCAAAGTA	Blomqvist et al. 1999
Z752	752-774	Sense	CAGGTCTCATCCAGAAAGTTG	Παρούσα εργασία
Z1461	1461-1483	Antisense	GGGTGTCGTTTGGTTATTGTCT	Παρούσα εργασία
Z1196	1196-1216	Sense	ACCGAACACACTAAGGGACA	Παρούσα εργασία
Z1941	1941-1963	Antisense	GGTAGCACTCAAATCAAAAGGA	Παρούσα εργασία
Z1814	1814-1836	Sense	GACAAC'TTTCAGTCTCCGTGTG	Παρούσα εργασία
Z2478	2478-2500	Antisense	GCCTTGTGCTATTGCTTTTGT	Παρούσα εργασία
Z2378	2378-2400	Sense	GAAATGGATATTCTCGGGTTTG	Παρούσα εργασία
Z3021	3021-3043	Antisense	TTGATGGGTTTGATGAAGTCTG	Παρούσα εργασία
EUC2	4413-4433	Antisense	TTTGCACCTGAAGTGTATGTA	Caro et al. 2001
EUC2a	4428-4448	Antisense	GGTCAATACGGCATTG	Caro et al. 2001
EUC2b	4428-4448	Antisense	GGTCAATACGGTGTGCT	Caro et al. 2001
EUG3a	2946-2965	Sense	TGGCAAAC'TCCWCCAACCC	Caro et al. 2001
EUG3b	2946-2965	Sense	TGGCAAACATCTTCMAATCC	Caro et al. 2001
EUG3c	2946-2965	Sense	TGGCAGACTTCAACHAACCC	Caro et al. 2001
Z4202	4202-4223	Sense	CATTGACTGGCTGAAGGAGAG	Παρούσα εργασία
Z4809	4809-4831	Antisense	GGCTACAGTGGGTGGAGTTATT	Παρούσα εργασία
Z4677	4677-4697	Sense	AGAACCCAGAAGGTGCTGAC	Παρούσα εργασία
Z5309	5309-5331	Antisense	TGTCATTGCTCTGTTGATGTTG	Παρούσα εργασία
Z5228	5228-5250	Sense	GAACATTTCAAGTCAGGTCCAA	Παρούσα εργασία
Z5890	5890-5912	Antisense	TGCCAGTACAAGTGATGATTCC	Παρούσα εργασία
UG16	5921-5940	Sense	GTTGGTGGGAACGGTTCACA	Guillot et al, 2000
UC12	6516-6494	Antisense	TCAATTAGTCTGGATTTTCCCTG	Guillot et al, 2000
Z6206	6206-6228	Sense	GACCACTATGCTGGACAACCTCA	Παρούσα εργασία
Z6643	6643-6665	Antisense	AGCACTGGGATCTTACTCCAAA	Παρούσα εργασία
S ₂ 107	6541-6562	Sense	TCCCAGTGCTAATGGAAGAGA	Paximadi et al., 2006
S ₂ 872	7421-7441	Antisense	ACAACAGCATGACCCAATCC	Paximadi et al., 2006

Πίνακας 2.7. Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του γονιδιώματος των *Polio1* στελεχών (Kats, Hal, Kar). Η θέση βασίζεται στο πρότυπο στέλεχος *Polio1 Mahoney*.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Βιβλιογραφία
72437	001-020	Sense	TTAAAACAGCTCTGGGGTTG	Mulders et al., 1999
216616	545-565	Antisense	GAAACACGGACACCCAAAGTA	Blomqvist et al. 1999
0340F	310-333	Sense	TAGATCAGGCYCATGAGTCACCGC	Lukashev et al., 2005
1200R	1177-1196	Antisense	GGGAATTTCCACCACCACCC	Lukashev et al., 2005
AL897	897-1007	Sense	GGAAGTTTACCGAGCCAGTT	Παρούσα εργασία
AR3091	3071-3091	Antisense	TTGTTACAGAGCGTTGTAGGC	Παρούσα εργασία
AL939	939-959	Sense	TGCCTGCTCTAAACTCACCA	Παρούσα εργασία
AR2751	2731-2751	Antisense	GCACCATCCTTCTTGCAATT	Παρούσα εργασία
AL1632	1632-1652	Sense	GCACCTTGGATTACACTGC	Παρούσα εργασία
AR2180	2160-2180	Antisense	CATTGCCTGTTTCCTGTTCG	Παρούσα εργασία
292	2612-2627	Sense	MIGCIGYIGARACNGG	Oberste et al., 2003
222	2969-2951	Antisense	CICIGIGGIIAYRWACAT	Oberste et al., 2003
ZL2550	2550-2570	Sense	AGACGGGGCATACATCACAG	Παρούσα εργασία
ZR3040	3040-3060	Antisense	TACCCCATTTTTCGAGAAGT	Παρούσα εργασία
EUG3a	2946-2965	Sense	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	Caro et al., 2001
EUG3b	2946-2965	Sense	TGGCAAACATCTTCMAATCC	Caro et al., 2001
EUG3c	2946-2965	Sense	TGGCAGACTTCAACHAACCC	Caro et al., 2001
EUC2	4413-4433	Antisense	TTTGCACTTGAAGTGTATGTA	Caro et al., 2001
EUC2a	4428-4448	Antisense	GGTTCAATACGGCATTTC	Caro et al., 2001
EUC2b	4428-4448	Antisense	GGTTCAATACGGTGTTCCT	Caro et al., 2001
CHR1	4284-4308	Sense	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT	Kottaridi et al., 2007
CHR2	5084-5081	Antisense	GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKA	Kottaridi et al., 2007
AL4872	4872-4892	Sense	CCTGTGATGAGGAGTGTTGC	Παρούσα εργασία
AR5275	5255-5275	Antisense	GAGACAAACGTGGTGAGTGC	Παρούσα εργασία
CHR3	5047-5065	Sense	CIACYCTWGARGCRCTVTT	Παρούσα εργασία
CHR4	5860-5841	Antisense	GACRTGAGIACHCCRCCRCA	Παρούσα εργασία
5850F	5837-5859	Sense	CAGTGYGGIGGIGTICTATGTC	Lukashev et al., 2003
6500R	6506-6531	Antisense	AGRTTGCCAAAYGTYTGCTCATTGC	Lukashev et al., 2003
CHR5	6485-6507	Sense	ATCCAGYTTGAAAGAYTCIGIRG	Παρούσα εργασία
CHR6	7227-7250	Antisense	GAAYTCYTCRTAYTCKTGCTCYCC	Παρούσα εργασία

Πίνακας 2.8. Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του γονιδιώματος του στελέχους LR11F7. Η θέση βασίζεται στο πρότυπο στέλεχος του *Echo 7 Wallace*.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Βιβλιογραφία
72437	001-020	Sense	TTAAAACAGCTCTGGGGTTG	Mulders et al., 1999
216616	545-565	Antisense	GAAACACGGACACCCAAAGTA	Blomqvist et al., 1999
0340F	310-333	Sense	TAGATCAGGCYGATGAGTCACCGC	Lukashev et al., 2005
1200R	1177-1196	Antisense	GGGAATTTCCACCACCACCC	Lukashev et al., 2005
BL870	870-890	Sense	CGACAGGATTTACACAGGA	Παρούσα εργασία
BR3231	3231-3211	Antisense	GCTTTTCACATACGGGCTAA	Παρούσα εργασία
BL1369	1369-1389	Sense	GAGGTTGTCGCAGCTTCTCT	Παρούσα εργασία
BR2580	2580-2560	Antisense	GGGAACCACTTGTGAGGTGT	Παρούσα εργασία
292	2612-2627	Sense	MIGCIGYIGARACNGG	Oberste et al., 2003
222	2969-2951	Antisense	CICIGIGGIIAYRWACAT	Oberste et al., 2003
EUG3a	2946-2965	Sense	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	Caro et al., 2001
EUG3b	2946-2965	Sense	TGGCAAACATCTTCMAATCC	Caro et al., 2001
EUG3c	2946-2965	Sense	TGGCAGACTTCAACHAACCC	Caro et al., 2001
EUC2	4413-4433	Antisense	TTTGCACCTGAACCTGTATGTA	Caro et al., 2001
EUC2a	4428-4448	Antisense	GGTTCAATACGGCATTG	Caro et al., 2001
EUC2b	4428-4448	Antisense	GGTTCAATACGGTGTGCT	Caro et al., 2001
CHR1	4284-4308	Sense	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT	Kottaridi et al., 2007
CHR2	5084-5081	Antisense	GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKA	Kottaridi et al., 2007
BL4709	4709-4729	Sense	TACATCCCCATTTGTGTTGG	Παρούσα εργασία
BR6063	6063-6043	Antisense	TGCTGGCTCCTTGTTACCTT	Παρούσα εργασία
CHR3	5047-5065	Sense	CIACYCTWGARGCRCTVIT	Παρούσα εργασία
CHR4	5860-5841	Antisense	GACRTGAGIACHCCRCCRA	Παρούσα εργασία
5850F	5837-5859	Sense	CAGTGYGGIGGIGTICTCATGTC	Lukashev et al., 2003
6500R	6531-6506	Antisense	AGRTTGCCAAAYGTYTGCTCATTGC	Lukashev et al., 2003
CHR5	6485-6507	Sense	ATCCAGYTTGAAYGAYTCIGIRG	Παρούσα εργασία
CHR6	7250-7227	Antisense	GAAYTCYTCRTAYTCKTGCTCYCC	Παρούσα εργασία

Πίνακας 2.9. Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του γονιδιώματος του στελέχους LR31G7. Η θέση βασίζεται στο πρότυπο στέλεχος του Echo 3 Morissey.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Βιβλιογραφία
72437	001-020	Sense	TTAAAAACAGCTCTGGGGTTG	Mulders et al., 1999
216616	545-565	Antisense	GAAACACGGACACCCAAAGTA	Blomqvist et al., 1999
0340F	310-333	Sense	TAGATCAGGCYGATGAGTCACCGC	Lukashev et al., 2005
1200R	1177-1196	Antisense	GGGAATTTCCACCACCACCC	Lukashev et al., 2005
CL995	995-1015	Sense	CATCACTCTCGGCAACTCAA	Παρούσα εργασία
CR3152	3132-3152	Antisense	CTTGCTGGTAATCGGGCTAA	Παρούσα εργασία
CL1653	1653-1676	Sense	CATCAACCTACATCCCAATAACC	Παρούσα εργασία
CR2648	2626-2648	Antisense	GAAGTTTTCCTGACGATTCC	Παρούσα εργασία
292	2612-2627	Sense	MIGCIGYIGARACNGG	Oberste et al., 2003
222	2969-2951	Antisense	CICCIGGIGGIA YRWACAT	Oberste et al., 2003
EUG3a	2946-2965	Sense	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	Caro et al., 2001
EUG3b	2946-2965	Sense	TGGCAAACATCTCMAATCC	Caro et al., 2001
EUG3c	2946-2965	Sense	TGGCAGACTTCAACHAACCC	Caro et al., 2001
EUC2	4413-4433	Antisense	TTTGCACTTGAACGTATGTA	Caro et al., 2001
EUC2a	4428-4448	Antisense	GGTCAATACGGCATTG	Caro et al., 2001
EUC2b	4428-4448	Antisense	GGTCAATACGGTGTGCT	Caro et al., 2001
CL4058	4058-4078	Sense	CAAAACAACGGGTGGCTAAA	Παρούσα εργασία
CR6052	6032-6952	Antisense	GCTGGTTCCTTATTGCCTTC	Παρούσα εργασία
CL4703	4703-4723	Sense	TCGCCATTTGTTCTTGCTTC	Παρούσα εργασία
CR5487	5467-5487	Antisense	CCGCCCACCTGTCATAGATA	Παρούσα εργασία
CHR3	5047-5065	Sense	CIACYCTWGARGCRCTVTT	Παρούσα εργασία
CHR4	5860-5841	Antisense	GACRTGAGIACHCCRCRCA	Παρούσα εργασία
5850F	5837-5859	Sense	CAGTGYGGIGGIGTICTCATGTC	Lukashev et al., 2003
6500R	6531-6506	Antisense	AGRTTGCCAAAYGYTYGYCTCATTGC	Lukashev et al., 2003
CL6333	6333-6364	Sense	CCAAAGACCTCACCAAACTGA	Παρούσα εργασία
CR6789	6768-6789	Antisense	TGCCACCTCTCACAAGTAGT	Παρούσα εργασία
CHR5	6485-6507	Sense	ATCCAGYTTGAAYGAYTCIGIRG	Παρούσα εργασία
CHR6	7250-7227	Antisense	GAAATCYTCRTAYTCKTGCTCYCC	Παρούσα εργασία

Πίνακας 2.10. Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση του γονιδιώματος των στελεχών LR51A5 και LR61G3. Η θέση βασίζεται στο πρότυπο στέλεχος του Echo 6 D'Amori.

2.9 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Τμήματα του παραγόμενου cDNA ενισχύθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Στο πίνακα 2.11 παρουσιάζονται οι συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης, και επιμήκυνσης που πραγματοποιήθηκαν για κάθε ζευγάρι εκκινητών.

2.9.1 PCR

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl cDNA του κάθε δείγματος, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50 pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10 mM, Invitrogen, UK), 2 μl MgCl₂ (50 mM), 2 units Taq DNA πολυμεράσης (Paq 5.000, Stratagene, USA) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μl. Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του cDNA μορίου στόχου στους 95°C για 5 min και ακολουθεί η εφαρμογή των διαφορετικών, για κάθε ζεύγος εκκινητών, συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης (πίνακας 2.11). Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 10 min στους 74°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

2.9.2 semi-nested PCR

Το προϊόν της PCR με τα εκκινητικά μόρια TS1-TS3 υποβλήθηκε σε semi-nested PCR χρησιμοποιώντας ως κωδικό εκκινητή τον TS1 και εσωτερικό αντικωδικό τον HEV-C-9 (πίνακας 2.5). Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl προϊόντος της PCR με τα εκκινητικά μόρια TS1-TS3, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα με συγκέντρωση 25 pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10 mM, Invitrogen, UK), 2 μl MgCl₂ (50 mM), 2 units Taq DNA πολυμεράσης (Paq 5.000, Stratagene, USA) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 5 min και ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης (πίνακας 2.11). Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει επώαση για 10 min στους 74°C.

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
72437-21661 UG16-UC12	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50 °C για 10sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 20sec 40 κύκλοι
Z752-Z1461 Z1814-Z2478 Z4202-Z4809 Z6206-Z6643 P11P-P13P	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 60 °C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 30sec 35 κύκλοι
Z1196-Z1941 Z2378-Z3021 Z4677-Z5309 Z5228-Z5890	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 57 °C για 10sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 20sec 35 κύκλοι
EUC2- EUG3a,EUG3b,EUG3c CHR3-CHR4 CHR5-CHR6	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 45°C για 1min Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 1min 40 κύκλοι
S ₂ 107-S ₂ 872	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 10sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 10sec 40 κύκλοι
AL1632-AR2180 ZL2550-ZR3040	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 10sec 35 κύκλοι
AL939-AR2751 BL1369-BR2580 BL4709-BR6063 CL4058-CR6052	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 1,5min 35 κύκλοι
AL897-AR3091	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 2min 35 κύκλοι
AL4872-AR5275 BL870-BR3231 CL4703-CR5487	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 58°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 30sec 35 κύκλοι
CL1653-CR2648	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 60°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 1min 35 κύκλοι
CL995-CR3152	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 58°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 2min 35 κύκλοι
TS1-TS3	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 54°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 30sec 20 κύκλοι
TS1- HEV-C-9	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 40°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74 °C για 30sec 40 κύκλοι

Πίνακας 2.11. Συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για κάθε ζεύγος βάσεων.

2.10 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ RT-PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της RT-PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 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 στους 40°C). Προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂), ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Ύστερα από καλή ανάδευση το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει η αγαρόζη.

Από το προϊόν της PCR 10 µl αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης σε 40% w/v σουκρόζης σε TBE) και μεταφέρονται στο πήκτωμα αγαρόζης. Για τον προσδιορισμό του μήκους των RT-PCR προϊόντων χρησιμοποιείται μάρτυρας μοριακού βάρους, στη συγκεκριμένη περίπτωση ο ΦX174 HaeIII (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένταση 120 Volts, 50 mA για περίπου 1 h. Στη συνέχεια, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne, Hartland WI), όπου ελέγχεται και φωτογραφίζεται με Olympus digital camera.

Διαλύματα :

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

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

2.11 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Από τα προϊόντα της κάθε RT-PCR 40 µl ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1 µg/ml. Οι αντίστοιχες ζώνες των προϊόντων της RT-PCR κόβονται από το πήκτωμα και μεταφέρονται σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου eppendorf των 1.5 ml. Ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων της RT-PCR από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας το PCR clean up Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

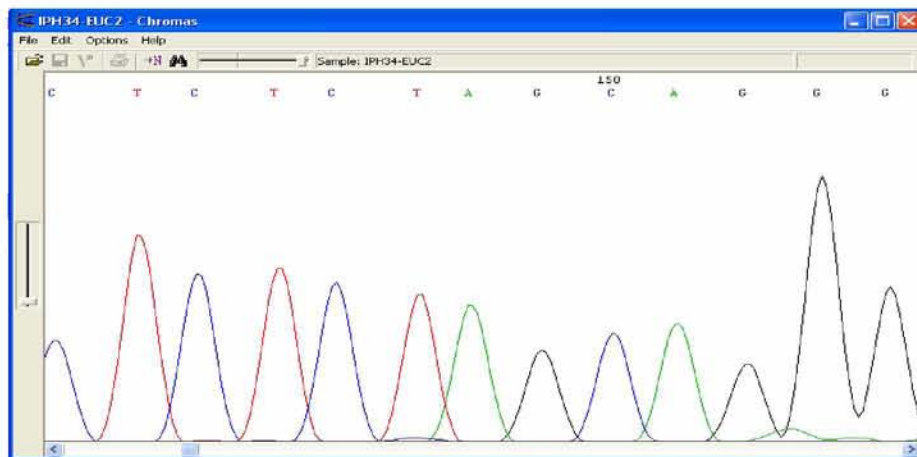
Ακολουθεί αλληλούχιση και των δυο κλώνων του καθαρού πλέον DNA από τη MacroGen Inc, (Seoul, Korea). Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές των αντίστοιχων αντιδράσεων PCR.

2.12 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα και εξελικτική τους σχέση συγκριτικά με τις αλληλουχίες προτύπων και κλινικών στελεχών εντεροϊών, που είναι καταχωρημένες στη παγκόσμια γονιδιακή τράπεζα δεδομένων (GenBank). Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε γενωμική περιοχή. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής που διατίθενται στο διαδίκτυο.

2.12.1 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παραλαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος (εικόνα 2.2). Πριν την επεξεργασία των αλληλουχιών απαιτείται ο έλεγχος και η διόρθωση των πιθανών λαθών.



Εικόνα 2.2. Χρωματογράφημα αλληλούχισης

2.12.2 Αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας

Η αναζήτηση της κοντινότερης ή όμοιας αλληλουχίας πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990), το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το BLAST για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης, καθώς επίσης και για την ταυτοποίηση των απομονωθέντων ιικών στελεχών. Η μοριακή ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε βάση της αλληλουχίας του VP1 γονιδίου, σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιεύσεις (Oberste et al., 2003, Caro et al., 2001). Τέλος, στις περιπτώσεις όπου αναγνωρίστηκε ανασυνδυασμός, το στέλεχος «δότης» της αλληλουχίας αναζητήθηκε από το BLAST.

2.12.3 Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών

Το πρώτο βήμα στην ανάλυση των αλληλουχιών και τη κατασκευή φυλογενετικών δέντρων είναι η στοίχιση των υπό μελέτη γενωμικών τμημάτων. Στη παρούσα εργασία η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW, το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>). Το αποτέλεσμα κάθε στοίχισης διασώθηκε με την μορφή αρχείου κατάληξης «.aln» για περαιτέρω χρήση.

Ιδιαίτερη σημασία έχει η διαχείριση των κενών. Στη παρούσα εργασία η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με τη παρουσία των κενών, μιας και τα αποτελέσματα του ClustalW χρησιμοποιήθηκαν για φυλογενετική μελέτη, η οποία απαιτεί τοπολογική ομολογία. Αυτό σημαίνει ότι τα νουκλεοτίδια που παρατηρούνται σε μία συγκεκριμένη θέση στις διάφορες ταξινομικές βαθμίδες «κατάγονται» από μία συγκεκριμένη θέση ενός κοινού προγόνου. Όταν λοιπόν, δύο ή περισσότερες, υποθετικά ομόλογες αλληλουχίες έχουν διαφορετικό μήκος, τότε η τοποθέτηση των κενών επιτρέπει την ανάκτηση αυτής της τοπολογικής ομολογίας.

2.12.4 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων

Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έγινε με τη μέθοδο Ένωσης Γειτόνων (Neighbor Joining-NJ). Ανήκει στις μεθόδους που υπολογίζουν ανά ζεύγη αποστάσεις, βάση των οποίων κατασκευάζεται το φυλογενετικό δέντρο. Πιο συγκεκριμένα ο αλγόριθμος Neighbor Joining-NJ εισάγει διαδοχικά κλαδιά σε ένα ζεύγος κοντινότερων γειτόνων, οι οποίοι ουσιαστικά είναι οι πιο απομονωμένοι.

Τα φυλογενετικά δέντρα, που προέκυψαν, αξιολογήθηκαν με την ανάλυση bootstrap. Η bootstrap είναι μια μέθοδος επαναδειγματοληπτικής αξιολόγησης δέντρων. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι τυπικά ένας αριθμός που σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο κλάδο στο φυλογενετικό δέντρο και δίνει την αναλογία των αντιγράφων bootstrap που υποστηρίζουν τη μονοφυλετική προέλευση του κλάδου. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή bootstrap δείχνει το πόσες φορές ένας συγκεκριμένος κλάδος (π.χ. taxon) εμφανίζεται στο δέντρο ύστερα από τη δημιουργία πολλών συνόλων δεδομένων από το αυθεντικό σύνολο.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη κατασκευή και αξιολόγηση των φυλογενετικών δέντρων και για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων είναι το MEGA 3 (Kumar et al., 2004).

2.12.5 Ανάλυση ανασυνδυασμών

Η αναζήτηση και μελέτη των ανασυνδυασμένων στελεχών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Simplot (Ray S. C. 1998), το οποίο διατίθεται στην ιστοσελίδα <http://sray.med.som.jhmi.edu/RaySoft/SimPlot/>. Η ανάλυση των πιθανά ανασυνδυασμένων αλληλουχιών έγινε, χρησιμοποιώντας ως παράμετρο την τιμή της ομοιότητας (sim – similarity value), που υπολογίζεται μεταξύ της εξεταζόμενης αλληλουχίας (query sequence) και κάθε μίας εκ των αλληλουχιών αναφοράς (reference sequences). Τα δεδομένα για την ανάλυση εισάγονται στο πρόγραμμα υπό τη μορφή αρχείου κατάληξης «.aln» και το αποτέλεσμα δίνεται υπό τη μορφή γραφήματος το οποίο παρουσιάζει τη μεταβολή της ομοιότητας μεταξύ των στελεχών, κατά μήκος της αλληλουχίας τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ semi nested-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Με στόχο την ευαίσθητη μοριακή ανίχνευση όλων των οροτύπων εντεροϊών σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια (πίνακας 2.5) σε συντηρημένα τμήματα της 5'UTR γενωμικής περιοχής, για την εφαρμογή semi nested-PCR (sn-PCR). Η ειδικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε σε πρότυπα και κλινικά στελέχη εντεροϊών, διαφόρων οροτύπων, τα οποία παρουσιάζονται στους πίνακες 2.1 και 2.2 αντίστοιχα. Σε όλα τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν ανιχνεύτηκε εντεροϊός.

3.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Για την απομόνωση εντεροϊών από περιβαλλοντικά δείγματα εξετάστηκαν τρεις μέθοδοι συγκέντρωσης: α) η μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων, η οποία προτείνεται από την ΠΟΥ, β) η μέθοδος καθίζησης με PEG, και γ) η μέθοδος προσρόφησης - έκλουσης από ηλεκτρarνητικά φίλτρα. Η ευαισθησία της κάθε μεθόδου ελέγχθηκε σε αποστειρωμένο νερό, στο οποίο ενοφθαλμίστηκαν γνωστές ποσότητες από το εμβολιακό στέλεχος πολιοϊού Sabin2.

Η ανίχνευση εντεροϊών σε δείγματα που επεξεργάστηκαν με τις μεθόδους διαχωρισμού δύο φάσεων και καθίζησης με PEG, πραγματοποιήθηκε με ενοφθαλμισμό σε κυτταροκαλλιέργειες μέχρι τρία περάσματα. Η μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων μπορεί να ανιχνεύσει 0,1TCID₅₀/0,1ml στο νερό, ενώ η ευαισθησία για τη μέθοδο καθίζησης με PEG είναι 1TCID₅₀/0,1ml.

Η ανίχνευση εντεροϊών σε δείγματα που συγκεντρώθηκαν με τη μέθοδο προσρόφησης-έκλουσης από ηλεκτρarνητικά φίλτρα, πραγματοποιήθηκε με sn-PCR. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 0,1TCID₅₀/0,1ml.

Έλεγχος ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε και σε περιβαλλοντικά δείγματα. Η ευαισθησία δεν ήταν κοινή για όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν, ενδεχομένως

λόγω της παρουσίας διαφορετικών τοξικών και ανασταλτικών παραγόντων σε καθένα από αυτά.

3.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ - ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Για την ανίχνευση εντεροϊών από λύματα πραγματοποιήθηκαν οι εξής διαδικασίες:

α) **2psm-cc** (2 phase separation method-cell culture), κατά την οποία η συγκέντρωση του δείγματος έγινε με τη μέθοδο διαχωρισμού δύο φάσεων και η απομόνωση των εντεροϊών με κυτταροκαλλιέργειες. Η διαδικασία αυτή προτείνεται από την ΠΟΥ. Από τα 24 δείγματα που μελετήθηκαν, θετικά για εντεροϊό βρέθηκαν τα 4 (16,6%).

β) **2psm-snPCR** (2 phase separation method-semi nested PCR), κατά την οποία η συγκέντρωση του δείγματος έγινε με τη μέθοδο διαχωρισμού δύο φάσεων και η ανίχνευση των εντεροϊών με την εφαρμογή snPCR. Από κάθε συγκεντρωμένο δείγμα η διαδικασία της εκχύλισης – αντίστροφης μεταγραφής - snPCR πραγματοποιήθηκε 10 φορές. Ελέγχθηκαν 24 δείγματα από τα οποία τα 5 βρέθηκαν θετικά για εντεροϊό (20,8%).

γ) **enF-snPCR** (electronegative Filter-semi nested PCR), κατά την οποία η συγκέντρωση του δείγματος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο προσρόφησης - έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα και η ανίχνευση των εντεροϊών με sn-PCR. Από κάθε συγκεντρωμένο δείγμα η διαδικασία της εκχύλισης – αντίστροφης μεταγραφής - snPCR πραγματοποιήθηκε 5 φορές. Με τη συγκεκριμένη διαδικασία ελέγχθηκαν 23 δείγματα εκ των οποίων τα 7 ήταν θετικά για εντεροϊό (30,4%).

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.1, όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για κάθε δείγμα, η μέθοδος enF-snPCR ανίχνευσε εντεροϊούς σε περισσότερα δείγματα σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους.

Για τον έλεγχο της παρουσίας εντεροϊών από τα δείγματα του Πηνειού πραγματοποιήθηκε η διαδικασία 2psm-cc. Από τα 18 δείγματα που μελετήθηκαν μόνο το B1 (πίνακας 2.4) βρέθηκε θετικό για εντεροϊούς.

Δείγμα	Ημερομηνία δειγματοληψίας	2psm-cc	2psm-snPCR	enF- snPCR
LR1	07/2005	+	+	*
LR2	09/2005	-	-	+
LR3	10/2005	+	+	+
LR5	05/2006	+	-	+
LR6	06/2006	+	+	+
LR7	07/2006	-	+	-
LR8	07/2006	-	-	-
LR9	07/2006	-	-	-
LR10	08/2006	-	-	-
TR1	09/2006	-	-	+
LR11	09/2006	-	-	-
GN2	09/2006	-	-	-
GN1	09/2006	-	-	+
TR2	11/2006	-	-	-
TR3	01/2007	-	-	-
LR12	02/2007	-	-	-
LR13	02/2007	-	+	-
TR4	04/2007	-	-	-
TR5	06/2007	-	-	-
LR14	07/2007	-	-	-
LR15	07/2007	-	-	-
LRB1	07/2007	-	-	-
LR16	08/2007	-	-	-
LRB2	08/2007	-	-	+
Σύνολο θετικών δειγμάτων		4	5	7
Ποσοστό θετικών δειγμάτων		16,6%	20,8%	30,4%

Πίνακας 3.1. Ανίχνευση εντεροϊών σε λύματα με τρεις διαδικασίες.

*δεν πραγματοποιήθηκε λόγω έλλειψης επαρκούς ποσότητας δείγματος.

3.3.1 Ταυτοποίηση απομονωθέντων στελεχών

Συνολικά απομονώθηκαν 9 στελέχη εντεροϊών, 2 από το Πηνεϊό και 7 από αστικά λύματα από το βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας, τα οποία ύστερα από σειριακές αραιώσεις για την αποφυγή μειγμάτων, ταυτοποιήθηκαν μοριακά. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με αλληλούχιση τμήματος της VP1 καψιδιακής περιοχής. Η αλληλουχία του κάθε στελέχους συγκρίθηκε με αντίστοιχες των πρότυπων στελεχών. Σύμφωνα με την εργασία των Oberste και συν. (Oberste et al., 1999), νουκλεοτιδική ομοιότητα >75% της VP1 περιοχής ή τμήματος αυτής με το πρότυπο στέλεχος κατατάσσει το υπό μελέτη στέλεχος στον ομόλογο ορότυπο, με την προϋπόθεση ότι η ομολογία με άλλο πρότυπο στέλεχος δε ξεπερνά το 70%. Βάση του προαναφερθέντος κριτηρίου ομολογίας τα στελέχη

που απομονώθηκαν κατατάσσονται στους οροτύπους Echo3, Echo6 και Echo7. Τα στελέχη που απομονώθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2, όπου αναφέρεται η ημερομηνία δειγματοληψίας, η προέλευσή τους, το ποσοστό νουκλεοτιδικής ομοιότητας με το πρότυπο στέλεχος και ο ορότυπός τους.

Τα στελέχη Echo7 που απομονώθηκαν από τον Πηνειό και από το βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας τον Ιούλιο του 2005, παρουσίασαν ομολογία στη VP1 γενωμική περιοχή 99-100%, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα στελέχη αυτά μοιράζονται τον ίδιο γονότυπο. Για το λόγο αυτό, αλληλουχήθηκε σε ολόκληρο το γένωμα το στέλεχος LR11F7.

Επίσης, η σύγκριση των αλληλουχιών της VP1 γενωμικής περιοχής των Ε6 στελεχών που απομονώθηκαν το Μάιο και τον Ιούνιο του 2006 έδειξε ομολογία 99-100%. Η υψηλή αυτή ομοιότητα είναι απόδειξη ότι ο ίδιος ιός κυκλοφόρησε στον πληθυσμό της Λάρισας για δύο μήνες.

Στέλεχος	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Προέλευση	Ορότυπος	% νουκλεοτιδική ομολογία με το αντίστοιχο πρότυπο
B11D2	13/07/2005	Αισθητικό δάσος	Echo7	78%
B11D6	13/07/2005	Αισθητικό δάσος	Echo7	78%
LR11D9	14/07/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Echo7	78%
LR11E2	14/07/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Echo7	78%
LR11E7	14/07/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Echo7	78%
LR11F7	14/07/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Echo7	78%
LR31G7	06/10/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Echo3	79%
LR51A5	25/05/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Echo6	77%
LR61G3	16/06/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Echo6	77%

Πίνακας 3.2. Στελέχη εντεροϊών που απομονώθηκαν από τον Πηνειό και από αστικά λύματα.

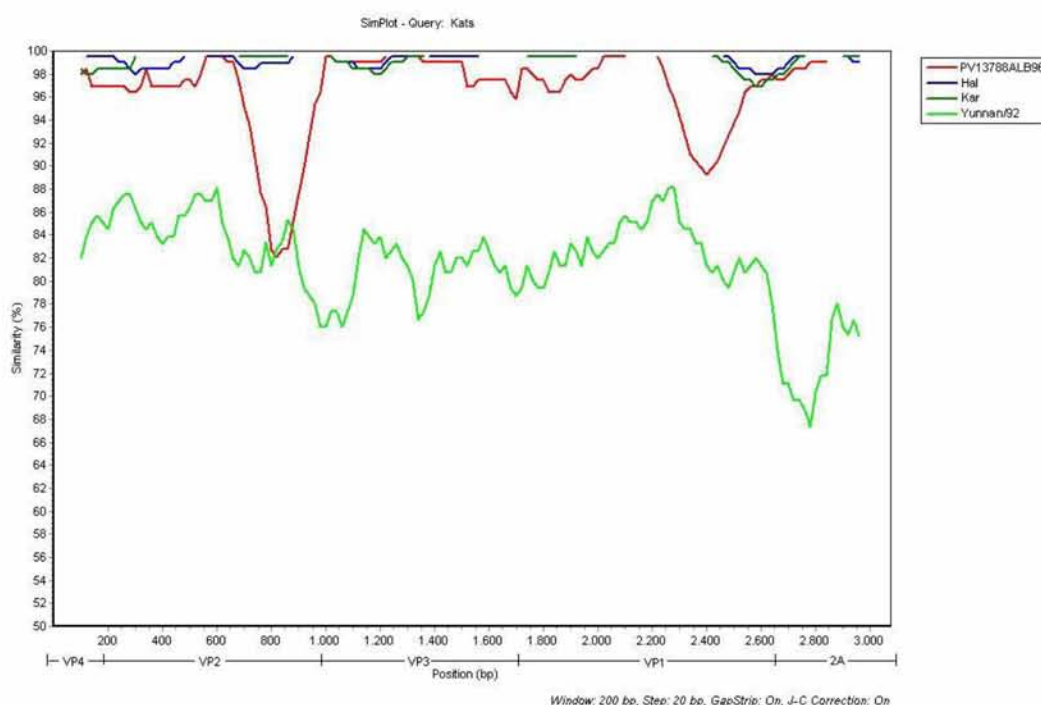
3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ Kats, Hal ΚΑΙ Kar

Η μοριακή ταυτοποίηση των τριών στελεχών Kats, Hal και Kar πραγματοποιήθηκε με αλληλούχηση της VP1 γενωμικής περιοχής του γενώματός τους. Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως αγρίου τύπου πολιοϊού 1 (PV1), παρουσιάζοντας νουκλεοτιδική ομολογία με το πρότυπο στέλεχος Mahoney 81% (>75%). Τα τρία στελέχη παρουσιάζουν νουκλεοτιδική ομοιότητα μεταξύ τους 99-100% σε όλες τις γενωμικές περιοχές.

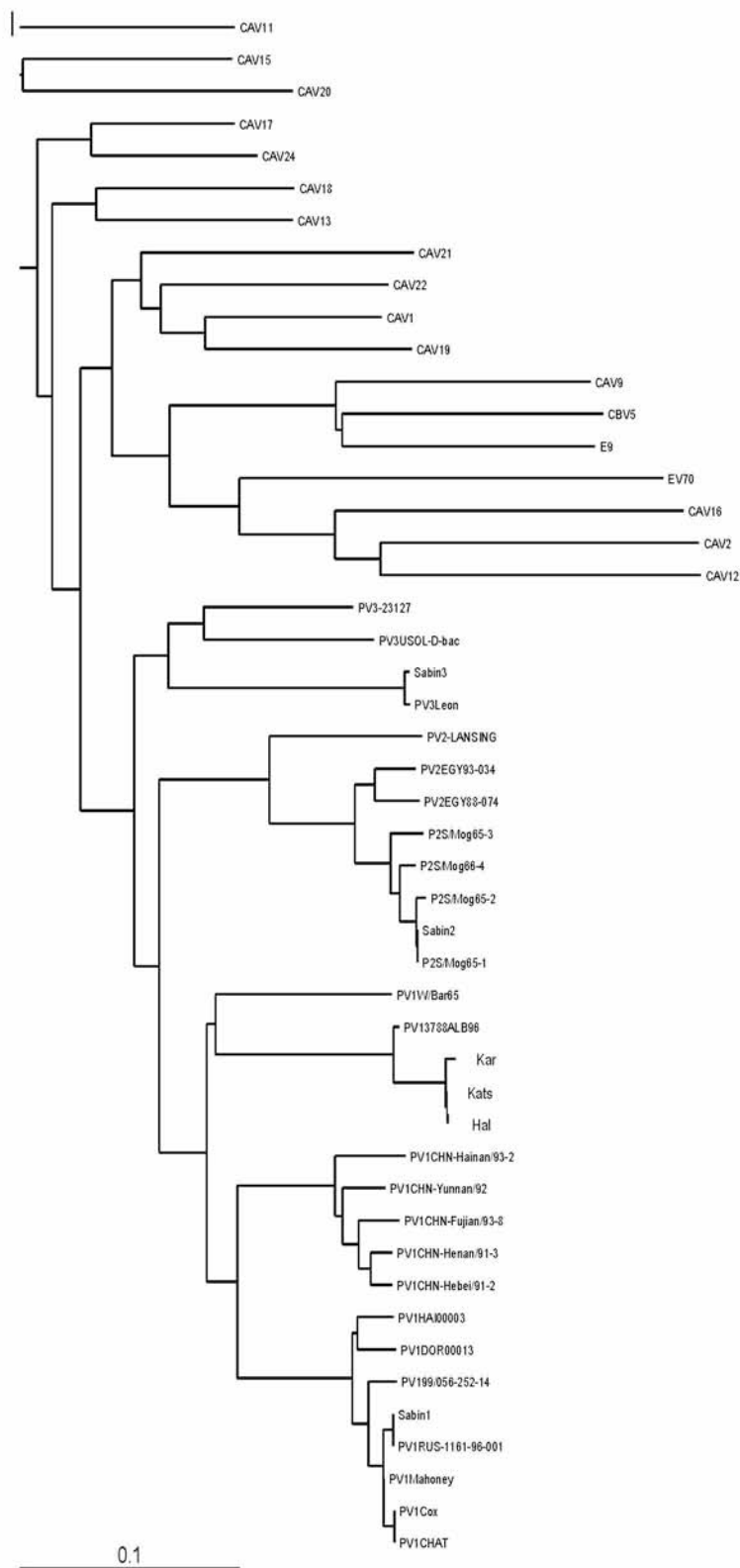
Η νουκλεοτιδική σύγκριση των τριών στελεχών με άλλους πολιοϊούς έδειξε υψηλή ομοιότητα, σε όλες τις αλληλουχημένες περιοχές, με τα στελέχη PV1 3788ALB96, 4019ALB96 και 3914ALB96, τα οποία απομονώθηκαν στην επιδημία της Αλβανίας το 1996 (Fiore et al., 1998). Τα Αλβανικά στελέχη παρουσιάζουν μεταξύ τους ομοιότητα 99-100%. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε για την περαιτέρω μελέτη τυχαία το στέλεχος 3788ALB96, του οποίου σχεδόν ολόκληρη η αλληλουχία είναι κατατεθειμένη στη GenBank (Marturano and Fiore, 2002). Η νουκλεοτιδική ομοιότητα των τριών ελληνικών στελεχών με τα Αλβανικά, κυμαίνεται από 95-100% σε όλες τις αλληλουχημένες γενωμικές περιοχές. Εντούτοις, όπως φαίνεται και από τη SimPlot ανάλυση (εικόνα 3.1.) υπάρχει μια περιοχή 200nt περίπου στη VP2 καψιδιακή περιοχή, όπου τα στελέχη Kats, Hal και Kar διαφέρουν αρκετά από το αλβανικό στέλεχος, γεγονός που υποδεικνύει ανασυνδυασμό. Η αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών στη GenBank για το συγκεκριμένο τμήμα της VP2 αποκάλυψε μέγιστη ομοιότητα με το PV1 στέλεχος CHN-Yunnan/92, που απομονώθηκε στην Κίνα το 1991. Η νουκλεοτιδική σύγκριση από το 550nt έως 700nt της VP2 γενωμικής περιοχής των ελληνικών στελεχών με την αντίστοιχη περιοχή του κινέζικου και του αλβανικού στελέχους ανέδειξε 89% και 78% ομοιότητα αντίστοιχα. Από τη SimPlot ανάλυση παρουσιάζεται επίσης, άλλη μια περιοχή περίπου 240nt στη VP1 (620nt-860nt της VP1) όπου η ομοιότητα των ελληνικών με τα αλβανικά στελέχη πέφτει στο 92%.

Η συσχέτιση των ελληνικών στελεχών με τα Αλβανικά επιβεβαιώνεται στα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν για όλες τις γενωμικές περιοχές. Οι φυλογενετικές σχέσεις των Kats, Hal και Kar με άλλους πολιοϊούς καθώς και με αντιπροσωπευτικά μέλη όλων των ομάδων των εντεροϊών παρουσιάζονται στις

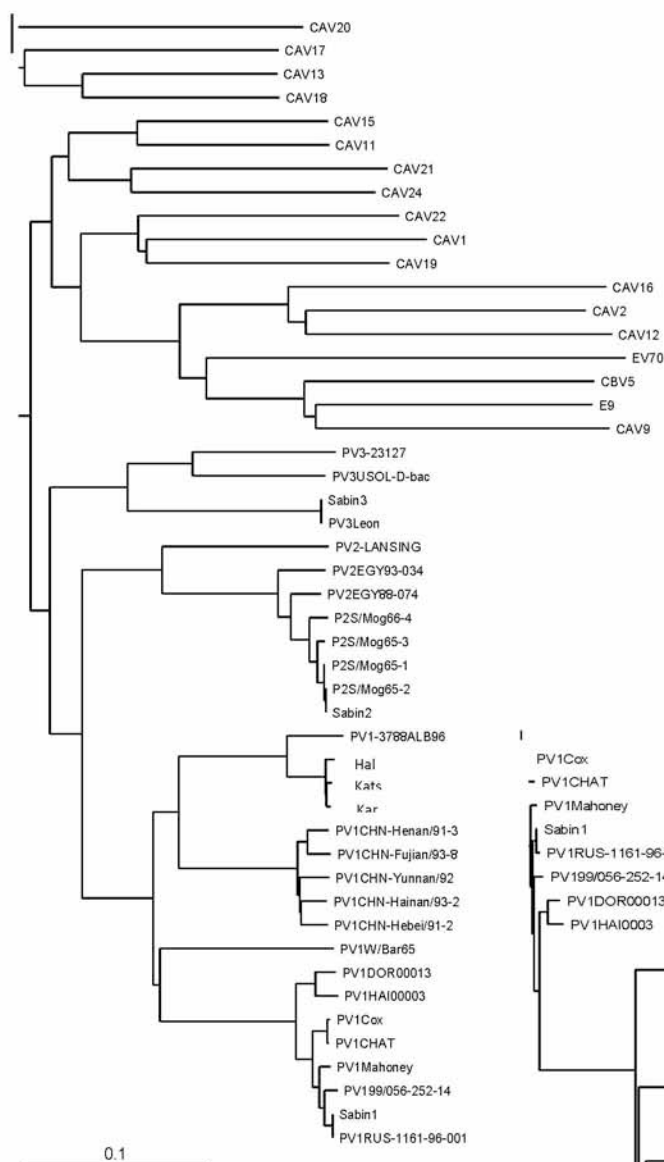
εικόνες 3.2 έως 3.12. Στα περισσότερα φυλογενετικά δέντρα η ομάδα των ελληνικών και αλβανικών στελεχών ταξινομείται με τα στελέχη PV1 Yunnan/92 και Henan/91-3 που απομονώθηκαν στην Κίνα την περίοδο 1991-1993 (Liu et al., 2000, Liu et al., 2003). Στις καψιδιακές περιοχές (VP4, VP2, VP3 και VP1) παρατηρείται ταξινόμηση των Kats, Hal και Kar με τους υπόλοιπους PV1 καθώς επίσης και με το πρότυπο στέλεχος Mahoney, επιβεβαιώνοντας την ταυτοποίηση των στελεχών μας. Η συσχέτιση οροτύπου γενοτύπου που παρατηρείται στα δέντρα των καψιδιακών περιοχών διακόπτεται στις λειτουργικές πρωτεΐνες, όπου οι πολιοϊοί ταξινομούνται με τα στελέχη των HEV-C.



Εικόνα 3.1. SimPlot ανάλυση της VP4 - 2A περιοχής των στελεχών Kats, Hal και Kar.

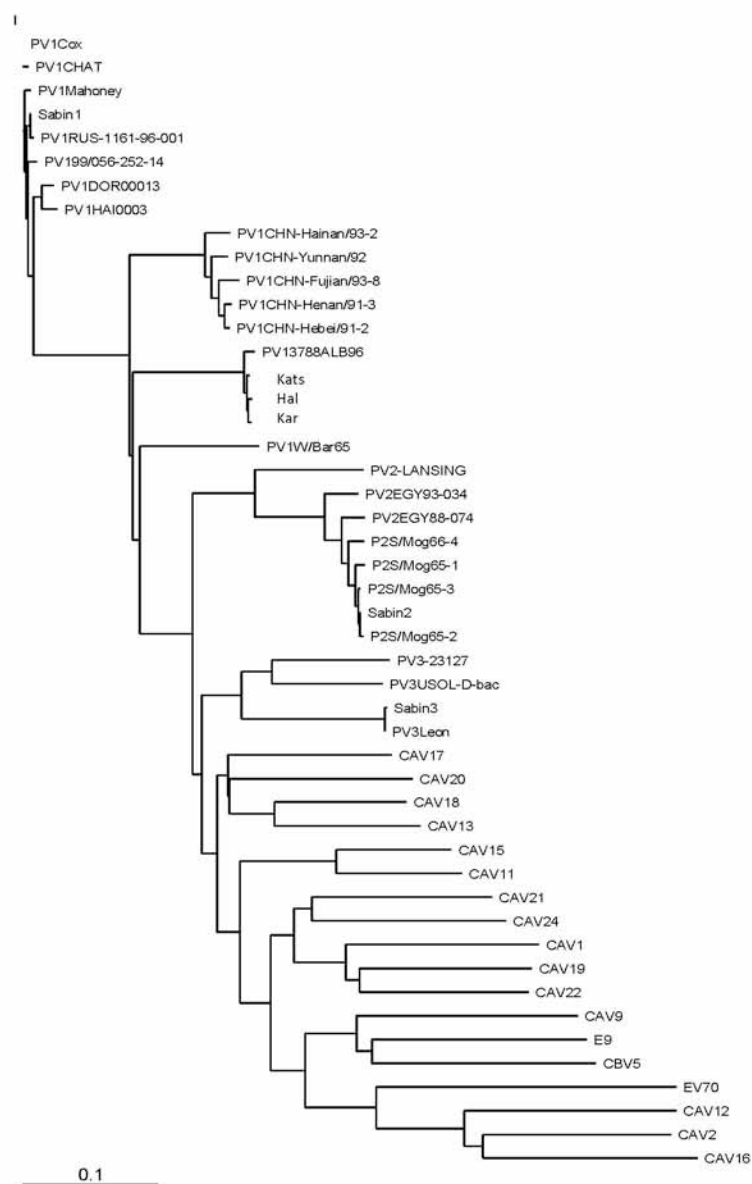


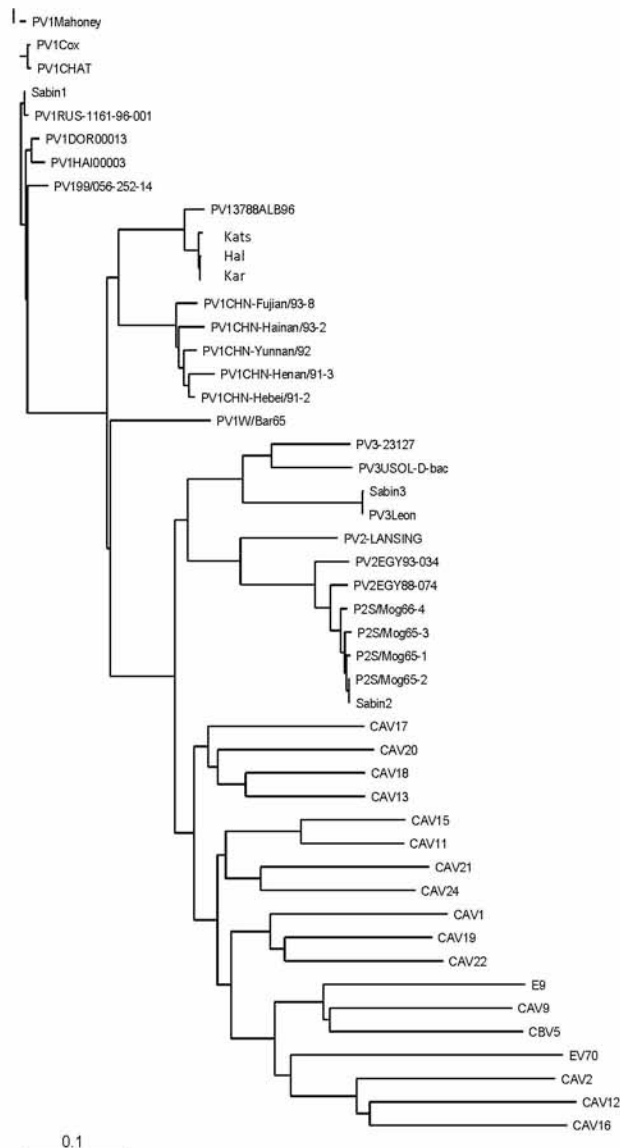
Εικόνα 3.2. Φυλογενετικό δέντρο της *VP4* γενωμικής περιοχής για τα στελέχη *Kats*, *Hal* και *Kar*.



Εικόνα 3.3. Φυλογενετικό δέντρο της VP2 γενομικής περιοχής για τα στελέχη Kats, Hal και Kar.

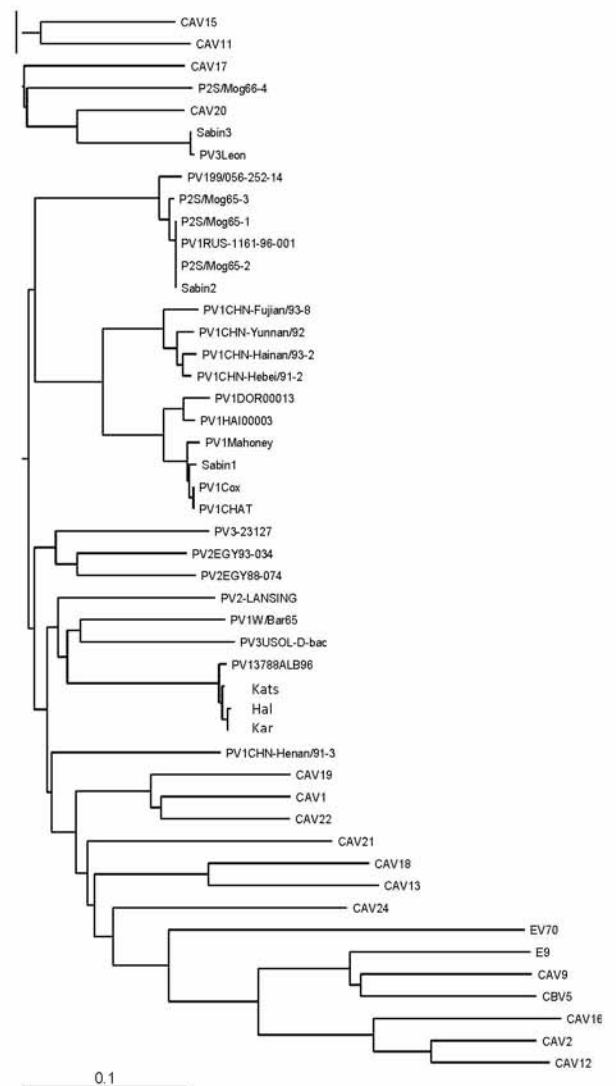
Εικόνα 3.4. Φυλογενετικό δέντρο της VP3 γενομικής περιοχής για τα στελέχη Kats, Hal και Kar.

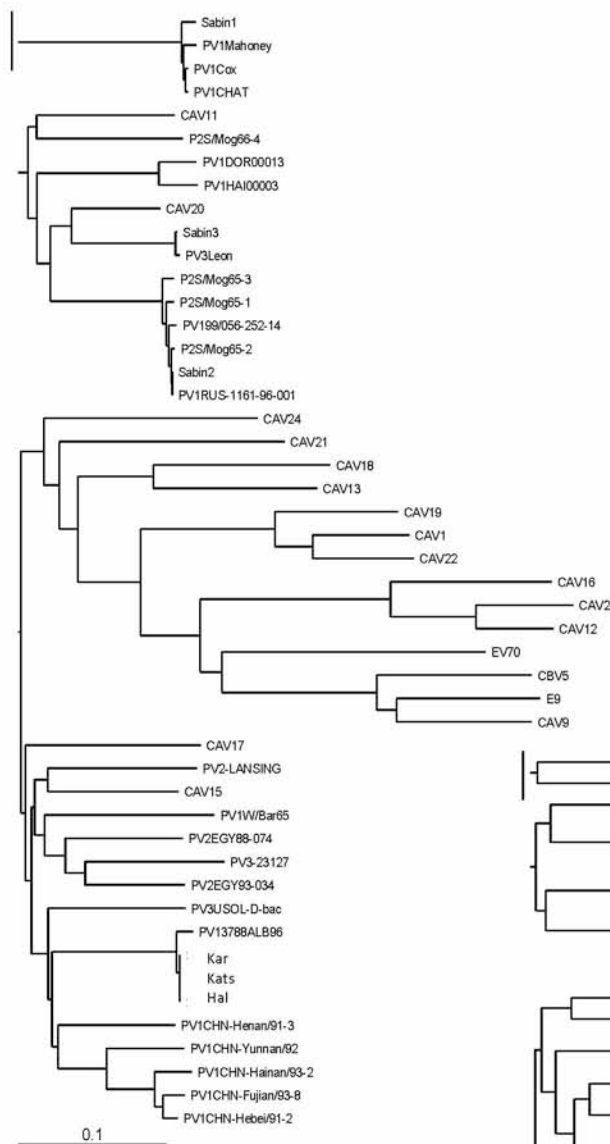




Εικόνα 3.6. Φυλογενετικό δέντρο της 2A γενωμικής περιοχής για τα στελέχη Kats, Hal και Kar.

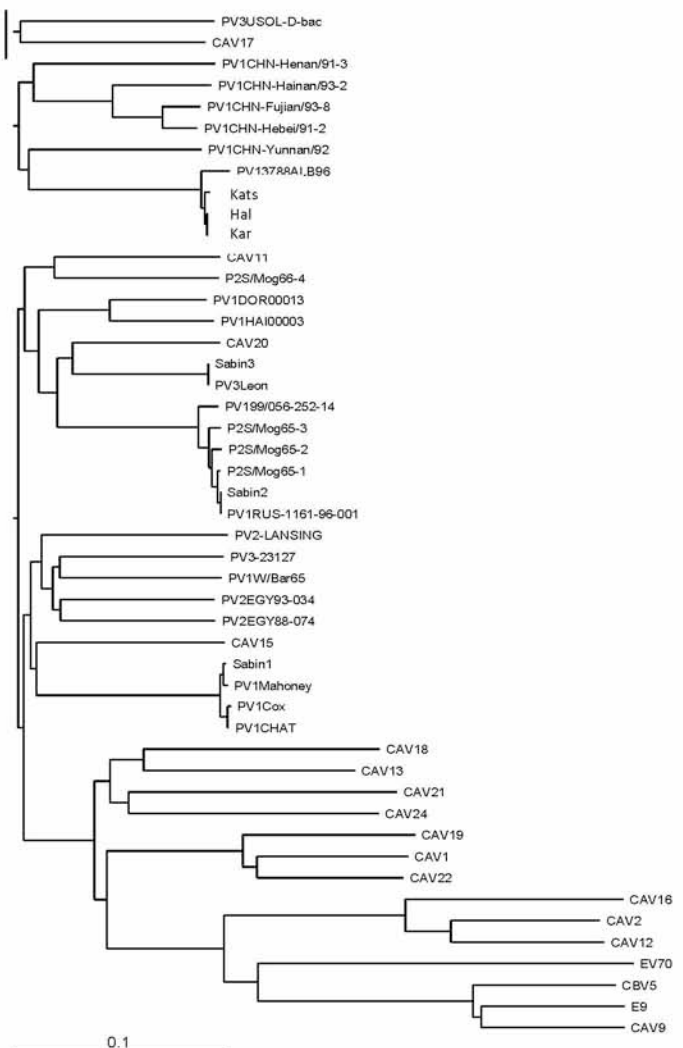
Εικόνα 3.5. Φυλογενετικό δέντρο της VP1 γενωμικής περιοχής για τα στελέχη Kats, Hal και Kar.

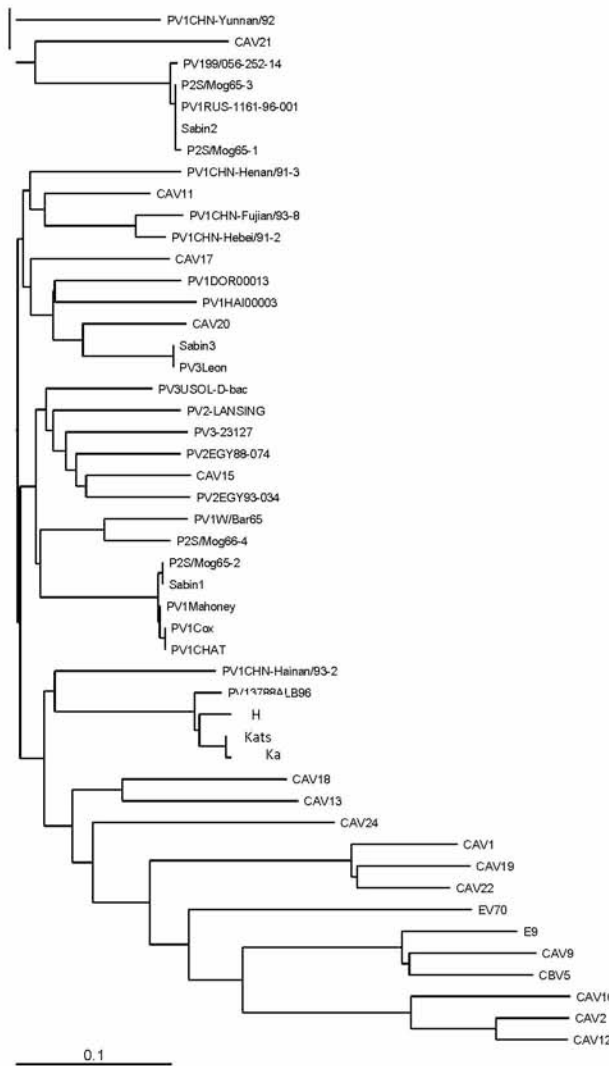




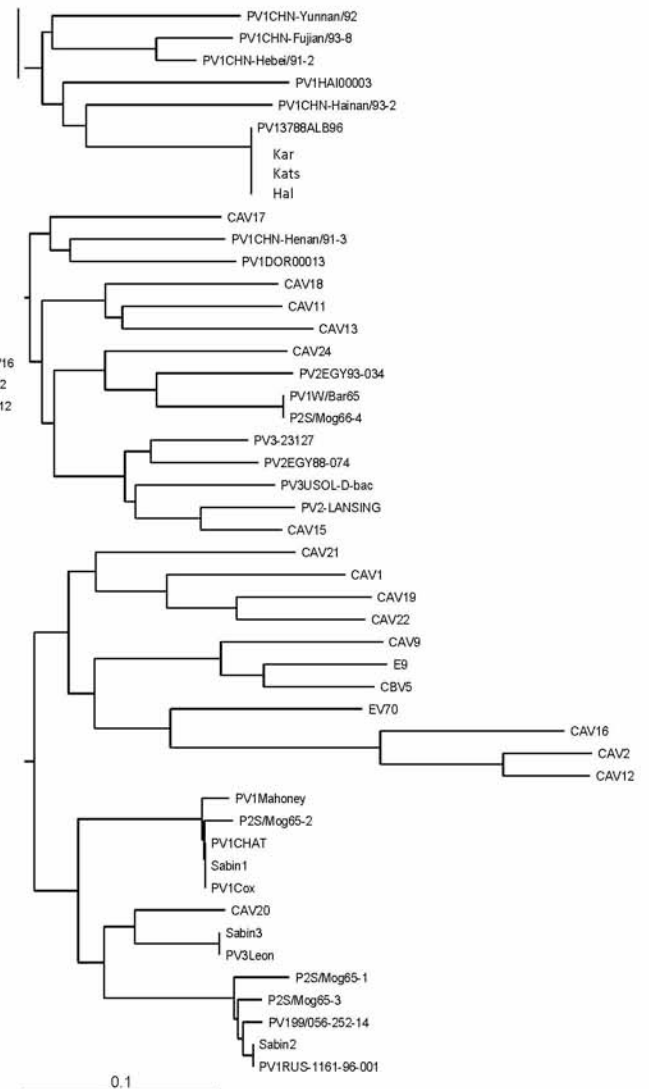
Εικόνα 3.7. Φυλογενετικό δέντρο της 2B γενομικής περιοχής για τα στελέχη Kats, Hal και Kar.

Εικόνα 3.8. Φυλογενετικό δέντρο της 2C γενομικής περιοχής για τα στελέχη Kats, Hal και Kar.

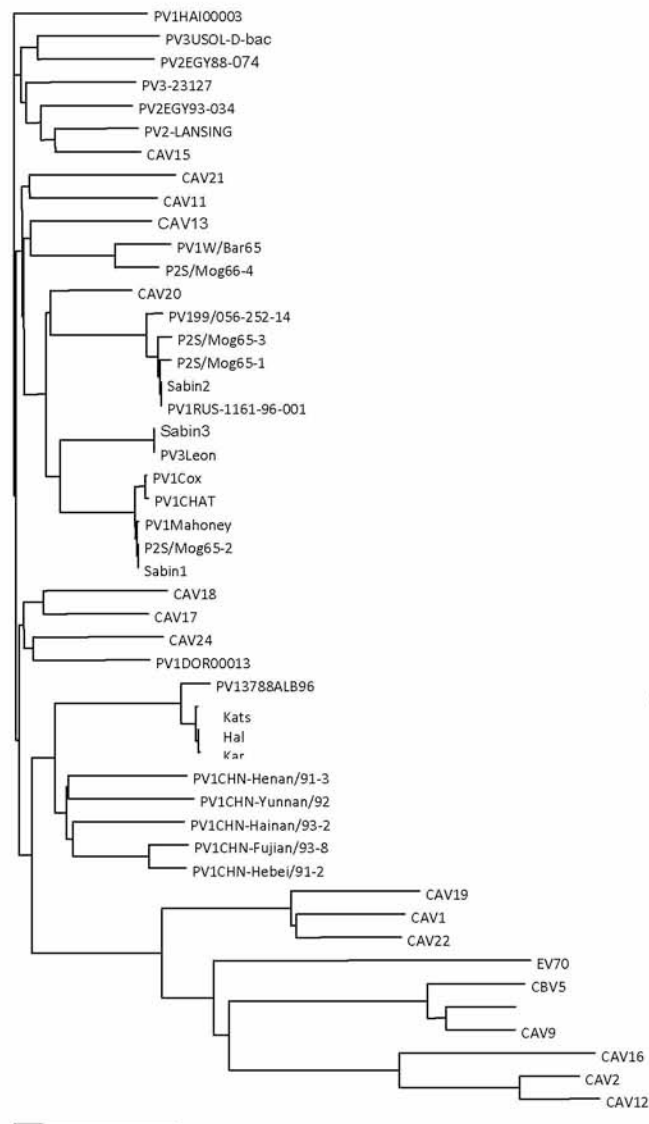




Εικόνα 3.9. Φυλογενετικό δέντρο της 3Α γενομικής περιοχής για τα στελέχη Kats, Hal και Kar.

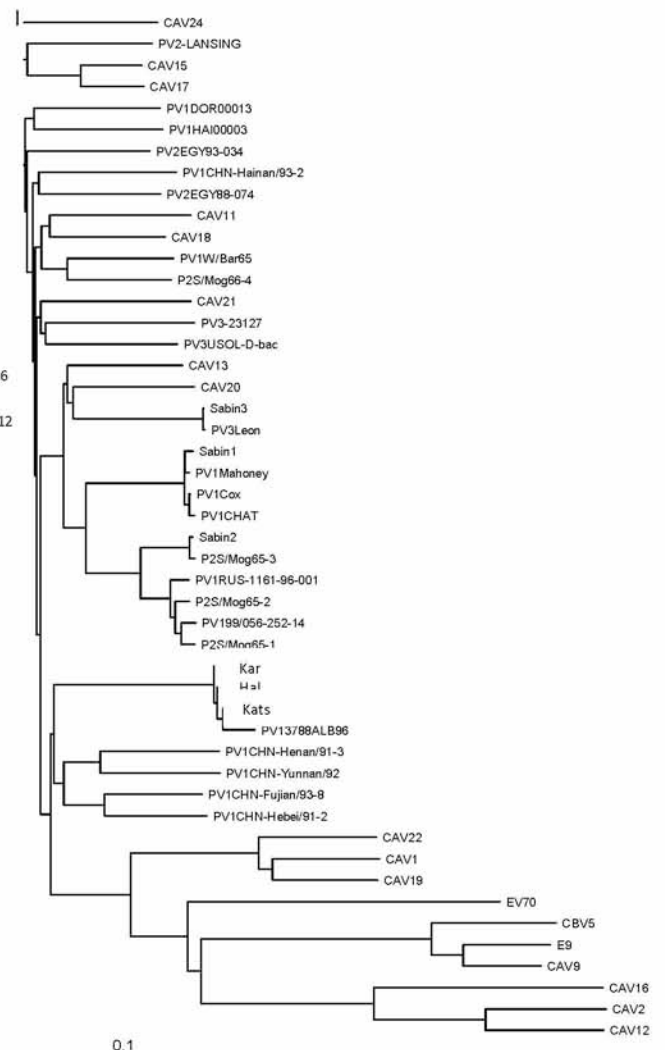


Εικόνα 3.10. Φυλογενετικό δέντρο της 3Β γενομικής περιοχής για τα στελέχη Kats, Hal και Kar.



Εικόνα 3.12. Φυλογενετικό δέντρο της 3D γενομικής περιοχής για τα στελέχη Kats, Hal και Kar.

Εικόνα 3.11. Φυλογενετικό δέντρο της 3C γενομικής περιοχής για τα στελέχη Kats, Hal και Kar.



3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LR11F7

Το στέλεχος LR11F7 αλληλουχήθηκε στο μεγαλύτερο τμήμα του γονιδιώματός του (1-7179nt).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της νουκλεοτιδικής (nt) και αμινοξικής (aa) αλληλουχίας του LR11F7 με το πρότυπο στέλεχος E7 Wallace, ξεχωριστά για κάθε γενωμική περιοχή. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.3, όπου παρουσιάζεται η % νουκλεοτιδική και αμινοξική ομοιότητα μεταξύ των δυο στελεχών, η περιοχή με την υψηλότερη ομολογία είναι η P3 (nt 79%, aa 96%). Ακολουθούν οι περιοχές P2 (nt 79%, aa 95%) και P1 (nt 78%, aa 94%). Το γονίδιο με το μεγαλύτερο ποσοστό νουκλεοτιδικής ομοιότητας μεταξύ των δυο στελεχών είναι το 2C (81%), ενώ αυτό με το χαμηλότερο είναι το 2A (76%). Στην 5'UTR η νουκλεοτιδική σύγκριση μεταξύ των δυο στελεχών έδειξε ομοιότητα 85%.

Ακολούθησε νουκλεοτιδική σύγκριση της αλληλουχίας του LR11F7 με όλα πρότυπα στελέχη HEV-B, καθώς και με τα μοναδικά στελέχη E7, UMMC και EV7-15936-01, των οποίων οι αλληλουχίες είναι κατατεθειμένες στη GenBank. Οι περιοχές 5'UTR, P1, P2 και P3 μελετήθηκαν ξεχωριστά. Στη 5'UTR το στέλεχος LR11F7 παρουσίασε υψηλότερη νουκλεοτιδική ομοιότητα (88%) με το πρότυπο στέλεχος EV75. Στην P1 καψιδιακή περιοχή η υψηλότερη ομοιότητα (82%) ήταν με τα στελέχη E7, UMMC και EV7-15936-01. Η καψιδιακή περιοχή με τη μεγαλύτερη ομολογία μεταξύ των E7 στελεχών ήταν η VP4, με ποσοστό ομοιότητας (85%). Η σύγκριση της P2 περιοχής του LR11F7 με άλλους HEV-B, ανέδειξε ομοιότητα με το στέλεχος TN94-0349 (84%), ενώ της P3 περιοχής με τον EV86 (87%).

Στις εικόνες 3.13 έως 3.24 παρουσιάζονται τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν ξεχωριστά για κάθε περιοχή. Στα δέντρα για τις καψιδιακές περιοχές παρατηρείται ότι το στέλεχος LR11F7 ταξινομείται με τα στελέχη E7 UMMC και EV7-15936-01, καθώς επίσης και με το πρότυπο E7 Wallace, επιβεβαιώνοντας έτσι την ταυτοποίησή του στο συγκεκριμένο ορότυπο. Εξαίρεση αποτελεί η VP4 καψιδιακή περιοχή όπου το πρότυπο στέλεχος ταξινομείται χωριστά, γεγονός που υποδηλώνει ότι στη συγκεκριμένη περιοχή δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση μεταξύ γενοτύπου και οροτύπου (Oberste et al., 1998).

Στα φυλογενετικά δέντρα των μη καψιδιακών περιοχών παρατηρείται διακοπή της συσχέτισης γενοτύπου-οροτύπου. Επίσης, παρατηρείται ότι το LR11F7 ταξινομείται διαφορετικά για κάθε γονίδιο. Εντούτοις όμως, από τη 2B περιοχή φαίνεται να υπάρχει η τάση για ομαδοποίηση με στελέχη εντεροϊών τα οποία απομονώθηκαν μετά το 1999. Στη 2A περιοχή το στέλεχος LR11F7 ταξινομείται με τα πρότυπα στελέχη CBV4 και E25, τα οποία απομονώθηκαν το 1951 και 1957 αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, στις περιοχές 2C, 3A και 3B παρατηρείται μια συνεχής φυλογενετική συσχέτιση με το στέλεχος TN95-0601, η αλληλουχία του οποίου κατατέθηκε πρόσφατα στη GenBank και οι μόνες πληροφορίες που έχουμε είναι ότι απομονώθηκε από Ιάπωνες που επέστρεφαν από τη Νότια Ασία.

Για το στέλεχος LR11F7 πραγματοποιήθηκε ανάλυση SimPlot για ολόκληρο το γονιδίωμα, η οποία παρουσιάζεται στην εικόνα 3.25. Στην καψιδιακή περιοχή είναι εμφανής η ομοιότητα του LR11F7 με το πρότυπο στέλεχος Wallace καθώς και με τα άλλα δυο στελέχη E7. Στην περιοχή των λειτουργικών γονιδίων παρατηρείται μια σύγκλιση με τα υπόλοιπα στελέχη HEV-B. Εντούτοις, παρατηρείται η αύξηση της ομοιότητας του ελληνικού στελέχους με το στέλεχος TN95-0601, η οποία ξεκινά στην 3A και τελειώνει στην αρχή της 3C περιοχής. Η νουκλεοτιδική ομοιότητα του LR11F7 με τον προτεινόμενο νέο εντεροϊό αγγίζει το 93% στην 3B γενωμική περιοχή. Τέλος, στην 3D αυξάνει η ομοιότητα του υπό μελέτη στελέχους με το πρότυπο στέλεχος EV86 η οποία φτάνει στο 90%. Οι έντονες αυτές αλλαγές στην ομοιότητα των στελεχών προδίδουν την παρουσία δύο γεγονότων ανασυνδυασμού με δότες γενετικού υλικού τα στελέχη TN95-0601 και EV86 ή απογόνους αυτών.

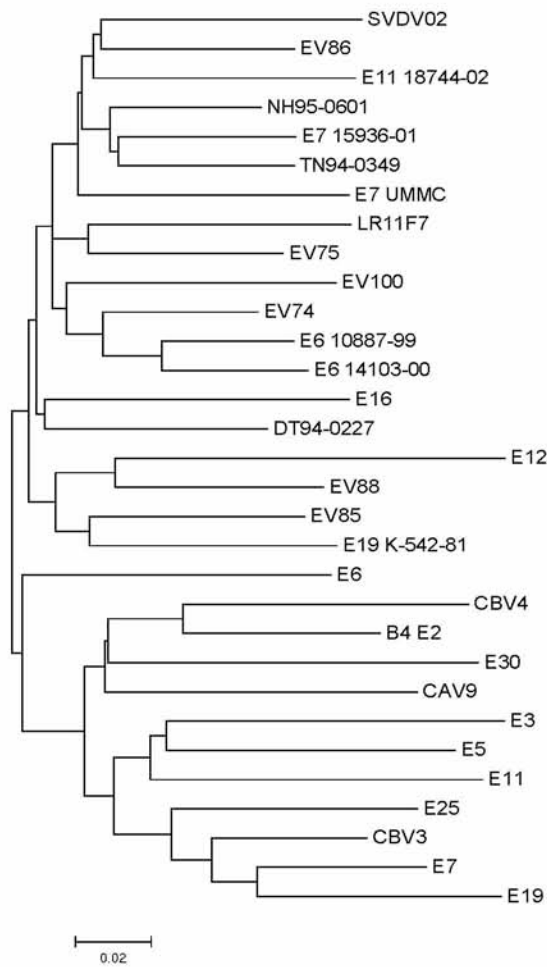
Στην GeneBank υπάρχει περιορισμένος αριθμός αλληλουχιών E7 στελεχών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα 293 (2996-3288nt) νουκλεοτιδίων της VP1 γενωμικής περιοχής, κοινό για τα περισσότερα στελέχη των οποίων τμήματα αλληλουχιών είναι κατατεθειμένα. Για να συσχετίσουμε το ελληνικό στέλεχος με άλλους E7 δημιουργήθηκε φυλογενετικό δέντρο, το οποίο παρουσιάζεται στην εικόνα 3.26. Το LR11F7, καθώς και τα υπόλοιπα στελέχη που απομονώθηκαν τον Ιούλιο του 2005 από το Πηνειό και τα λύματα, φαίνεται να ταξινομείται με τα στελέχη 95CF993 και T187-ARG96, για τα οποία όμως δεν υπάρχει κάποια πληροφορία για τον τόπο και το χρόνο απομόνωσής τους.

Εντούτοις, παρατηρείται ομαδοποίηση με στελέχη που απομονώθηκαν στην Κίνα την περίοδο 1997-2000.

Γενωμική περιοχή	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία
5' UTR	85	-
P1	78	94
VP4	79	100
VP2	78	93
VP3	79	94
VP1	78	93
P2	79	95
2A	76	91
2B	78	93
2C	81	98
P3	79	96
3A	79	96
3B	78	95
3C	79	96
3D*	79	97

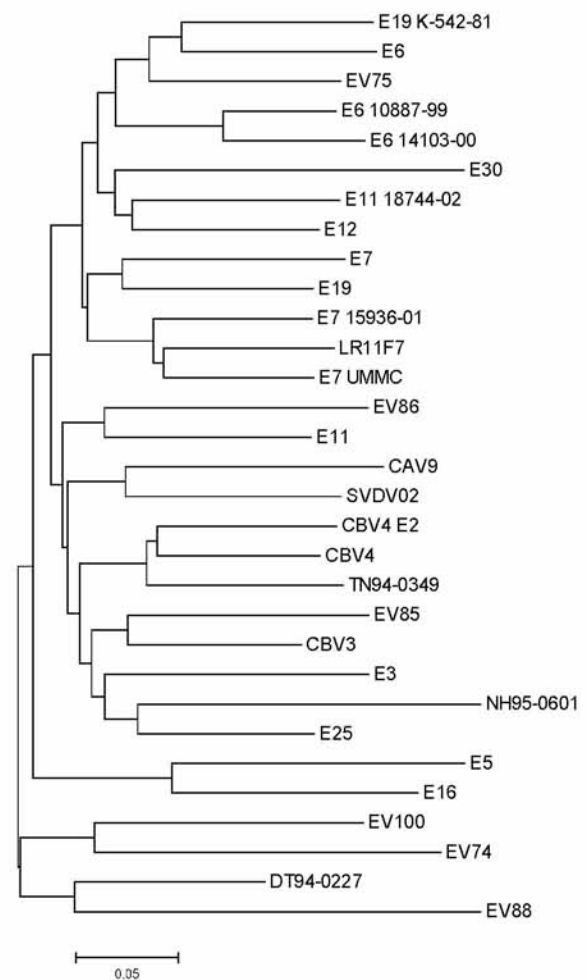
Πίνακας 3.3. Νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία μεταξύ του LR11F7 και του πρότυπου E7 στελέχους Wallace, για κάθε περιοχή.

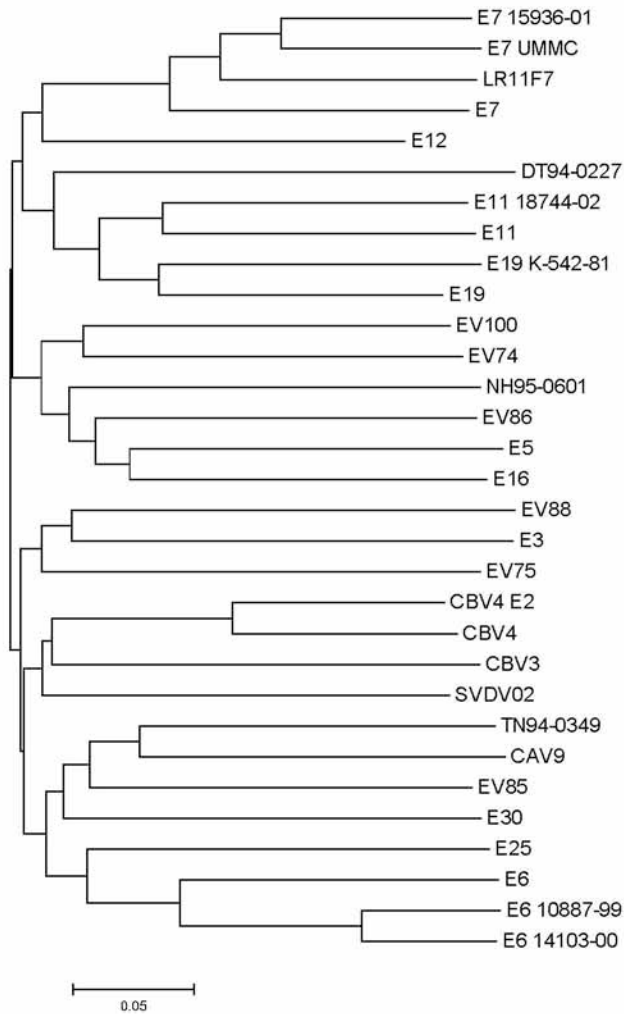
*1238nt της 3D γενωμικής περιοχής



Εικόνα 3.13. Φυλογενετικό δέντρο της 5'UTR περιοχής για το στέλεχος LR11F7.

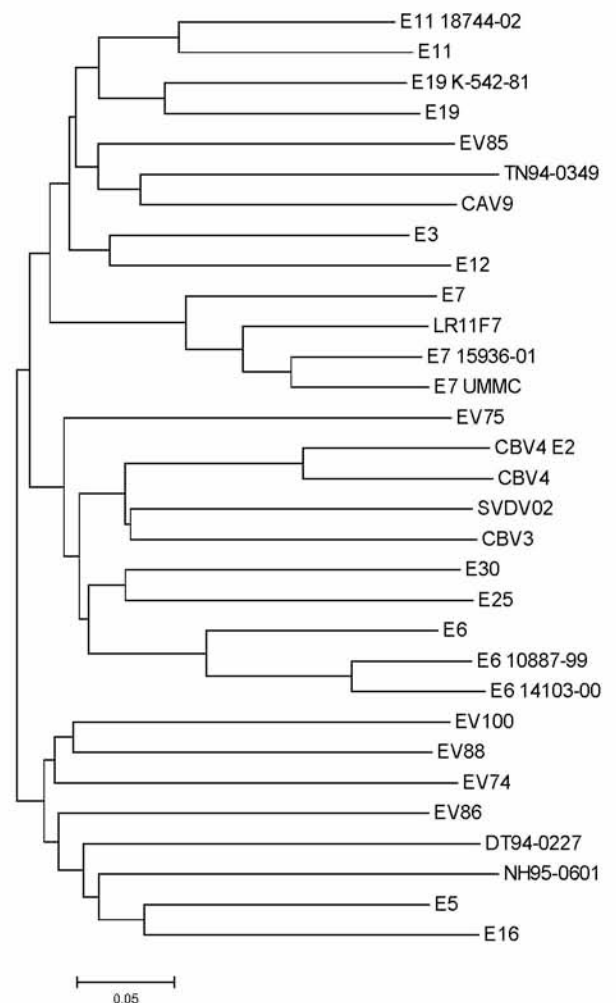
Εικόνα 3.14. Φυλογενετικό δέντρο της VP4 περιοχής για το στέλεχος LR11F7.

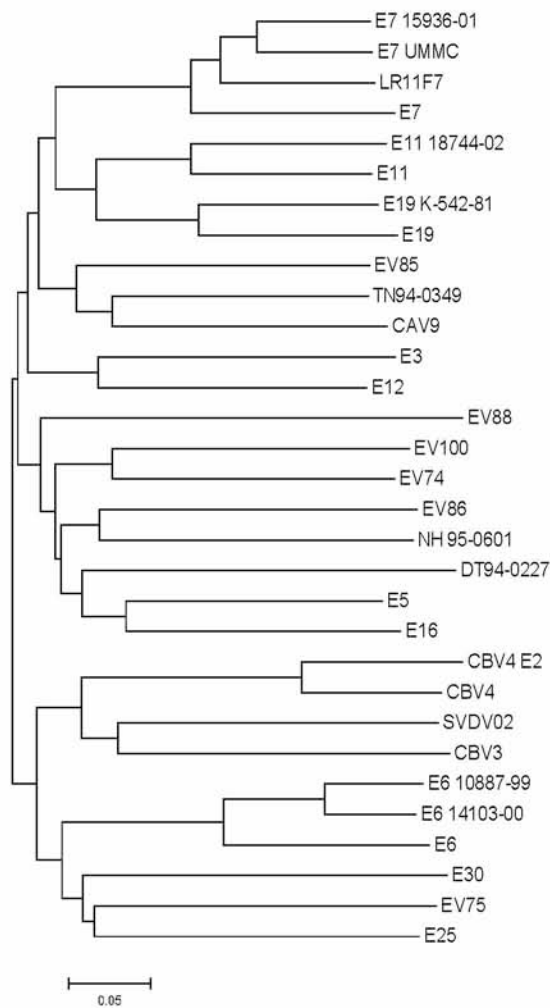




Εικόνα 3.16. Φυλογενετικό δέντρο της VP3 περιοχής για το στέλεχος LR11F7.

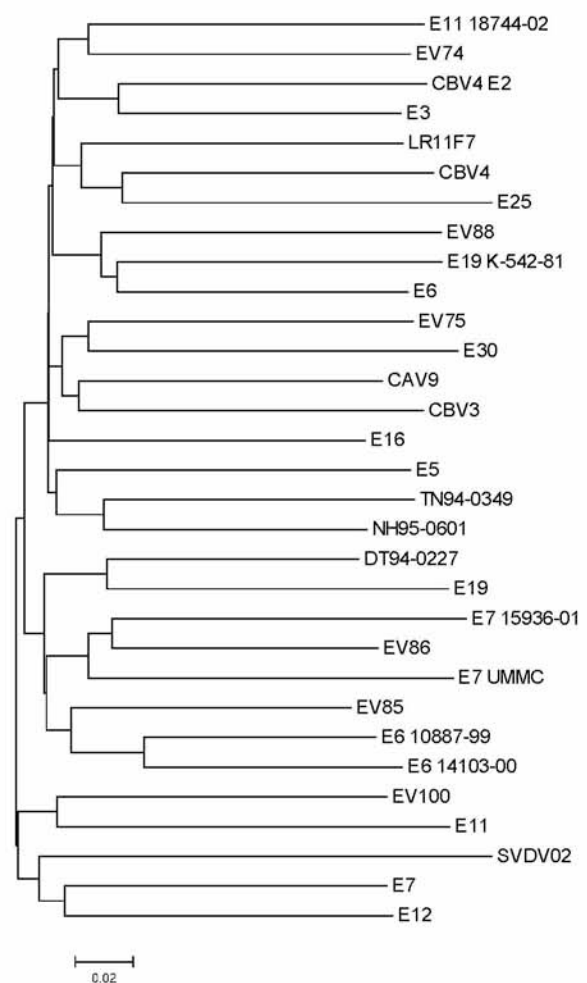
Εικόνα 3.15. Φυλογενετικό δέντρο της VP2 περιοχής για το στέλεχος LR11F7.

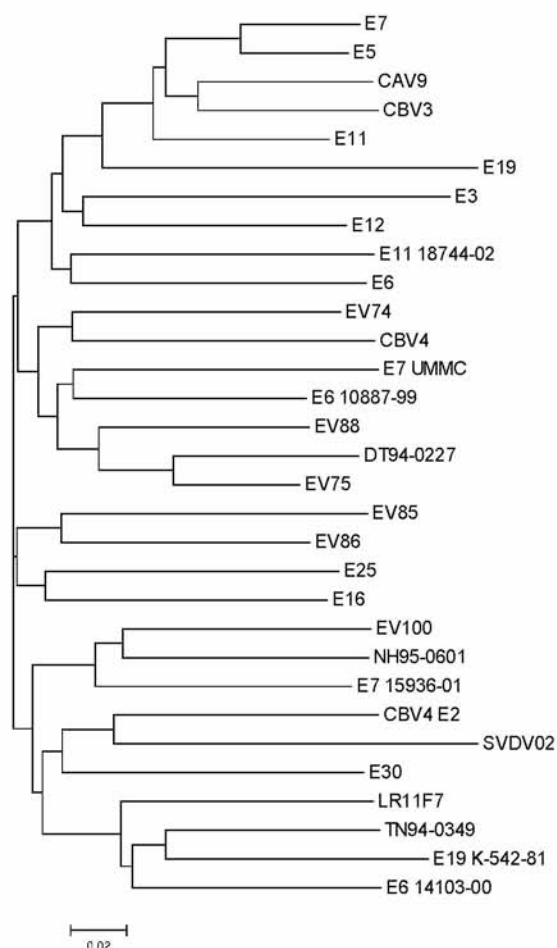




Εικόνα 3.18. Φυλογενετικό δέντρο της 2A περιοχής για το στέλεχος LR11F7.

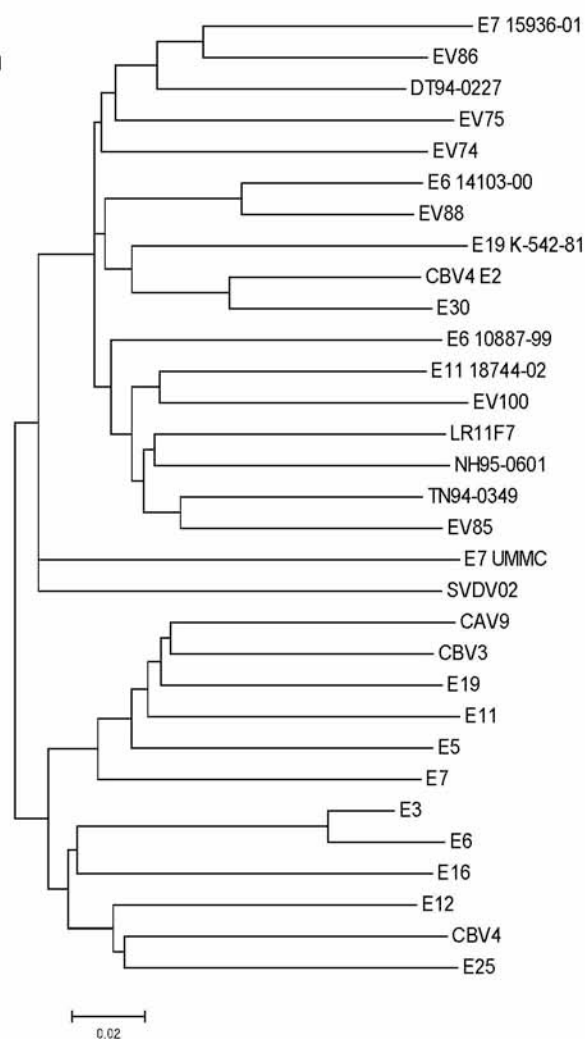
Εικόνα 3.17. Φυλογενετικό δέντρο της VP1 περιοχής για το στέλεχος LR11F7.

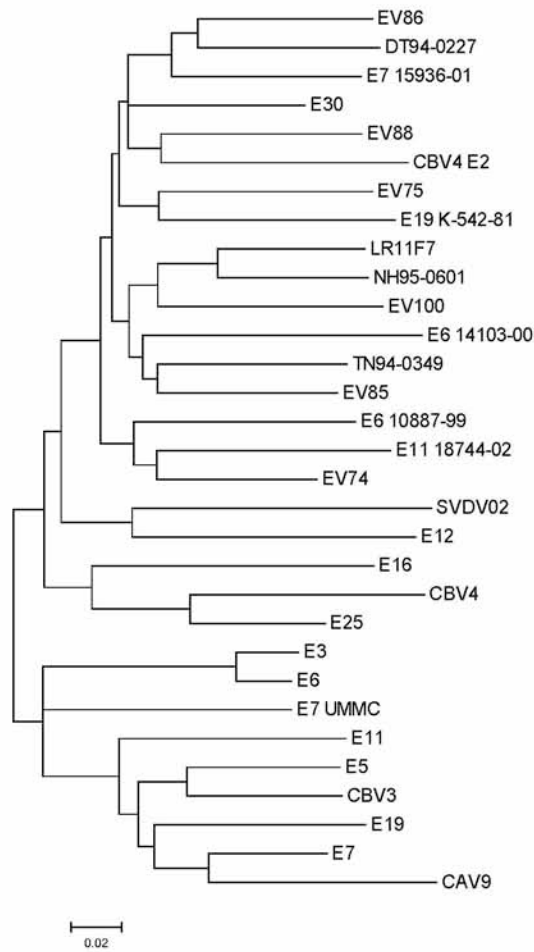




Εικόνα 3.19. Φυλογενετικό δέντρο της 2B περιοχής για το στέλεχος LR11F7.

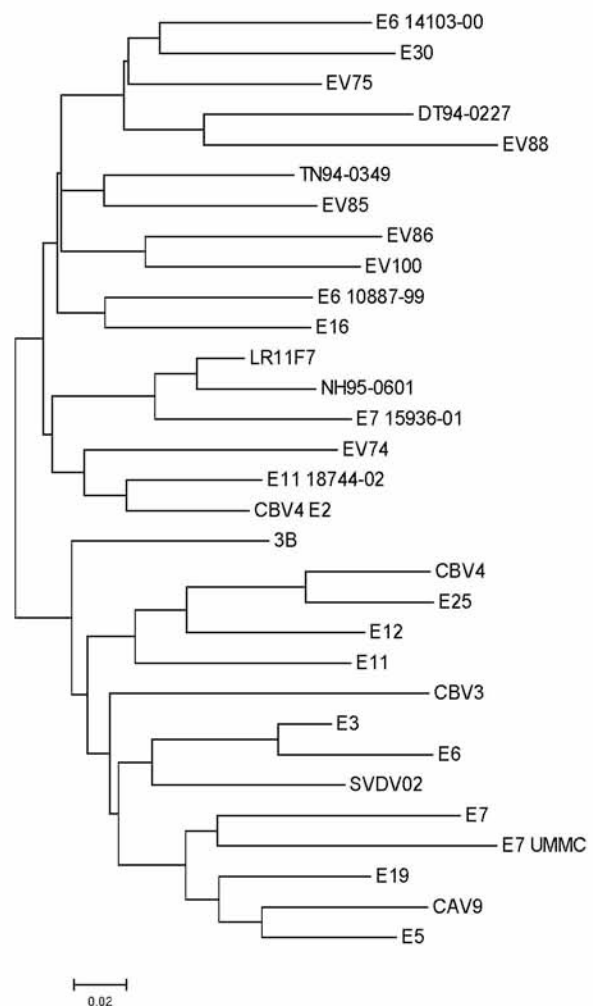
Εικόνα 3.20. Φυλογενετικό δέντρο της 2C περιοχής για το στέλεχος LR11F7.

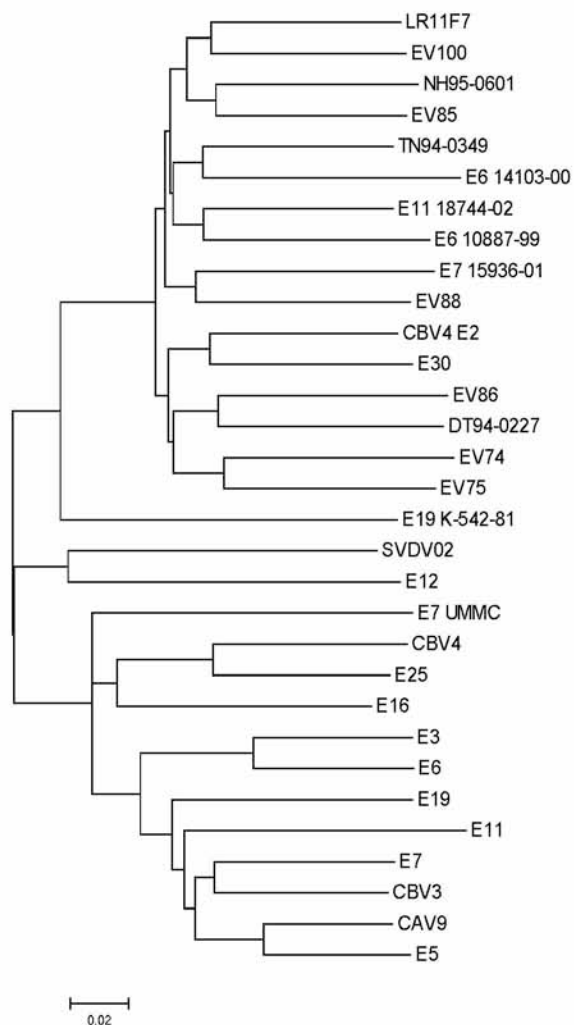




Εικόνα 3.21. Φυλογενετικό δέντρο της 3Α περιοχής για το στέλεχος LR11F7.

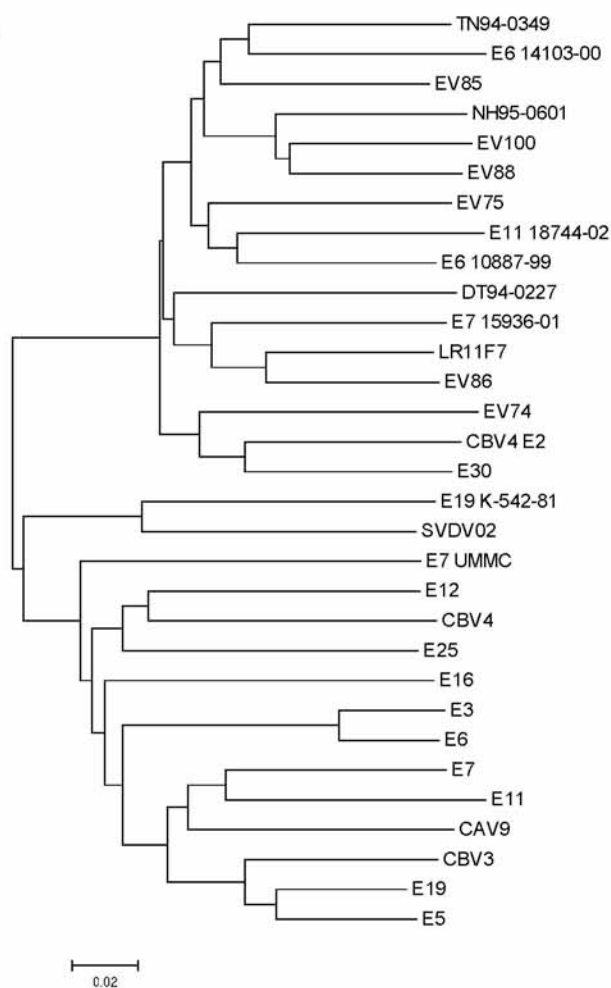
Εικόνα 3.22. Φυλογενετικό δέντρο της 3Β περιοχής για το στέλεχος LR11F7.

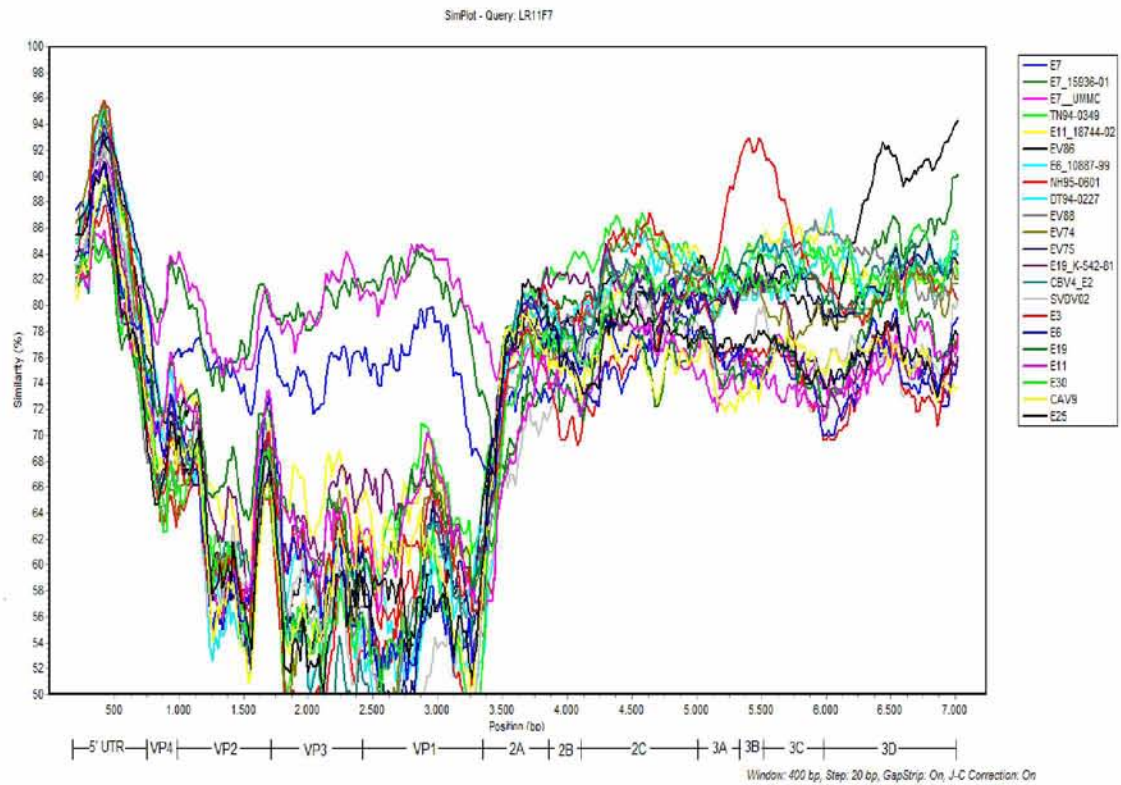




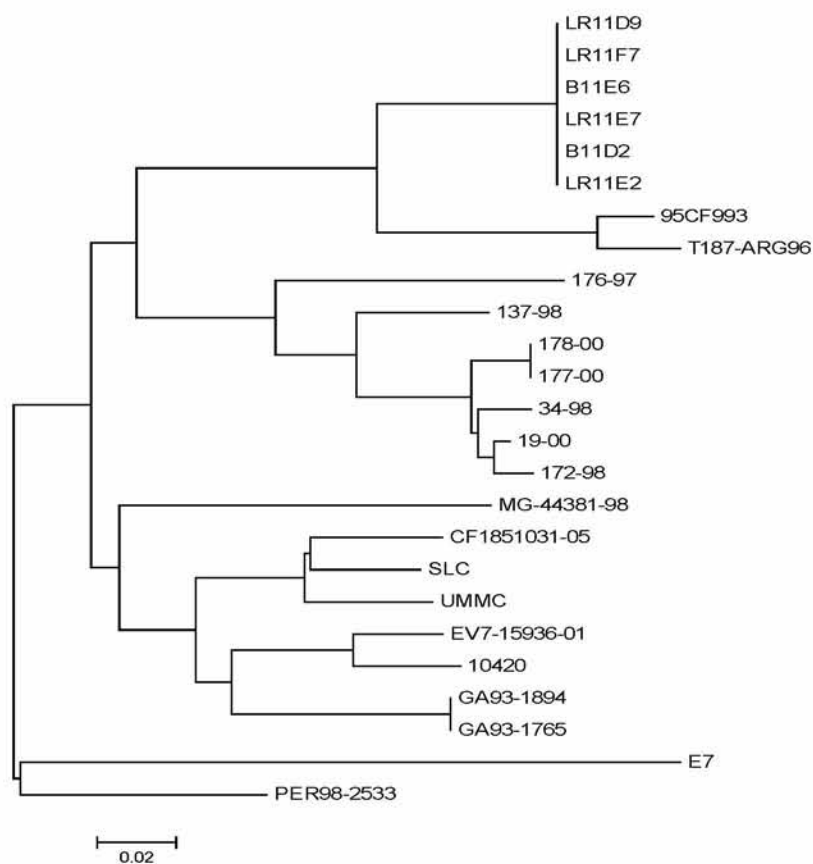
Εικόνα 3.23. Φυλογενετικό δέντρο της 3C περιοχής για το στέλεχος LR11F7.

Εικόνα 3.24. Φυλογενετικό δέντρο της 3D περιοχής για το στέλεχος LR11F7.





Εικόνα 3.25. SimPlot ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους LR11F7.



Εικόνα 3.26. Φυλογενετικό δέντρο σε τμήμα της 293nt της VP1 περιοχής για την επιδημιολογική μελέτη των E7 στελεχών που απομονώθηκαν τον Ιούλιο του 2005.

3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LR31G7

Αλληλουχήθηκαν 7189 βάσεις (1-7189nt) του γονιδιώματος του στελέχους LR31G7.

Η σύγκριση της αλληλουχίας του VP1 γονιδίου με τα πρότυπα στελέχη των εντεροϊών ταυτοποίησε το LR31G7 ως E3, έχοντας νουκλεοτιδική ομοιότητα με το πρότυπο στέλεχος 79% (>75%) στη συγκεκριμένη περιοχή.

Στον πίνακα 3.4 παρουσιάζεται η % νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία του LR31G7 με το πρότυπο στέλεχος E3 Morrissey και με το μοναδικό πλήρως αλληλουχημένο Echo3 στέλεχος PicoBankDM1E3. Το PicoBankDM1E3 απομονώθηκε το 1998 στη Φιλανδία από κόπρανα ασθενούς με διαβήτη, και έχει συσχετισθεί με τη συγκεκριμένη ασθένεια (Williams et al., 2006). Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.4 το στέλεχος LR31G7 διαφέρει αρκετά από το πρότυπο στέλεχος σε όλες τις περιοχές του γονιδιώματος. Τα δύο στελέχη παρουσιάζουν μεγαλύτερη νουκλεοτιδική ομολογία στην 5'UTR (86%), ακολουθώντας οι περιοχές P2 (81%), P1 (80%) και P3 (79%). Το γονίδιο με τη μέγιστη ομολογία μεταξύ των δύο στελεχών είναι το 3B (83%), ενώ αυτό με τη μικρότερη είναι το 2B (76%). Η νουκλεοτιδική σύγκριση του LR31G7 με το στέλεχος PicoBankDM1E3 παρουσίασε υψηλή ομοιότητα, 90-93%, στο 5' άκρο του γονιδιώματος (5'UTR-VP1), η οποία μειώνεται στο 79-82% στο 3' άκρο του γονιδιώματος (2A-3D).

Κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα για όλες τις περιοχές του γονιδιώματος (εικόνες 3.27 έως 3.38). Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκαν όλα τα πρότυπα στελέχη καθώς και στέλεχη HEV-B για τους οποίους υπήρχε κατατεθειμένη ολόκληρη η αλληλουχία. Στα φυλογενετικά δέντρα για την 5'UTR και τις καψιδιακές περιοχές, το LR31G7 ταξινομείται με το στέλεχος PicoBankDM1E3. Επίσης, στα δέντρα για τις καψιδιακές περιοχές παρατηρείται η συσχέτιση γονοτύπου οροτύπου, μιας και τα δυο E3 στελέχη (LR31G7 και PicoBankDM1E3) ταξινομούνται μαζί με το πρότυπο στέλεχος Morrissey. Όπως ήταν αναμενόμενο, η συσχέτιση οροτύπου-γονοτύπου διακόπτεται στα φυλογενετικά δέντρα των λειτουργικών περιοχών. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.32 το LR31G7 συνεχίζει να ομαδοποιείται και στη 2A περιοχή με το PicoBankDM1E3, όμως η φυλογενετική συσχέτιση των δύο E3 στελεχών διακόπτεται στο γονίδιο 2B. Στα δέντρα για τις 2C, 3A, 3C και 3D περιοχές, το LR31G7 μαζί με νεώτερους εντεροϊούς αποτελούν μια ξεχωριστή

ομάδα από τα υπόλοιπα πρότυπα στελέχη των HEV-B. Παρά το γεγονός ότι στις περιοχές 2B, 2C και 3A παρατηρείται διαφορετική ταξινόμηση για κάθε γονίδιο, τα φυλογενετικά δέντρα για τις 3B, 3C και 3D αναδεικνύουν φυλογενετική σχέση του LR31G7 με στελέχη CAV9 τα οποία απομονώθηκαν στην Κούβα την περίοδο 1990-2000. Η νουκλεοτιδική ομοιότητα του LR31G7 και των CAV9 στελεχών είναι 86%, 85% και 85-87% στα 3B, 3C και 3D γονίδια αντίστοιχα.

Για την επιδημιολογική συσχέτιση του LR31G7 με άλλους E3 ιούς κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο σε τμήμα 269nt (2692-2960nt) της VP1 περιοχής, κοινό για τις περισσότερες κατατεθειμένες αλληλουχίες E3 στελεχών. Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 3.39 το στέλεχος LR31G7 ταξινομείται μαζί με E3 τα οποία απομονώθηκαν το 2005 στη Γαλλία (CF1801081-05, CF1820181-05) και την Ιαπωνία (Fukuoka City2005-70, Fukuoka City2005-97). Η νουκλεοτιδική ομοιότητα μεταξύ των στελεχών της ομάδας του 2005, κυμαίνεται μεταξύ 95-98%. Η ομοιότητα του LR31G7 με τα στελέχη του cluster 1998-2002 του 1997-1998 είναι 86-91% και 75-78% αντίστοιχα.

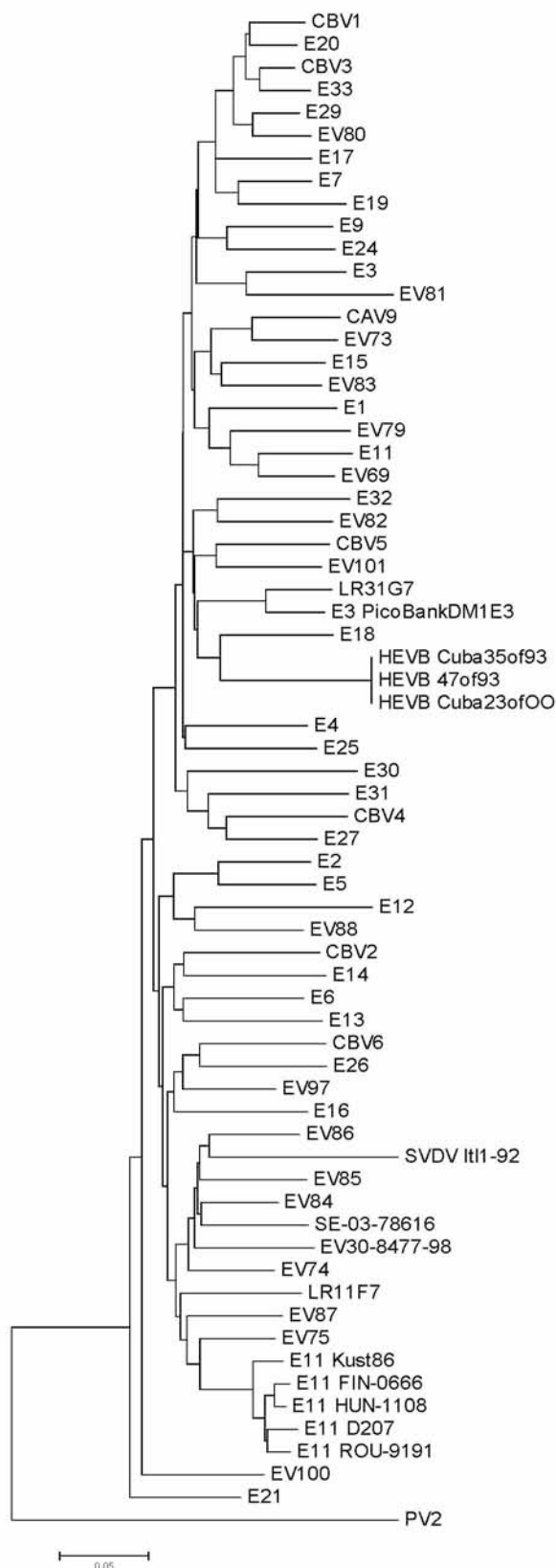
Στην εικόνα 3.40 παρουσιάζεται η SimPlot ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος του LR31G7. Στην 5'UTR και στην καψιδιακή περιοχή το στέλεχος με τη μεγαλύτερη ομοιότητα είναι το PicoBankDM1E3. Περνώντας όμως στη 2A περιοχή παρουσιάζεται μια απότομη αλλαγή στην ομοιότητα των δυο στελεχών, η οποία πέφτει στο 81%, υποδηλώνοντας εμφανώς την ύπαρξη ανασυνδυασμού έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός στελέχους το οποίο στην 5' περιοχή του γενώματος του είναι E3, ενώ το υπόλοιπο γονιδίωμα προέρχεται από κάποιον εντεροϊό της ομάδας B. Η SimPlot ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος δε μπόρεσε να μας δώσει στοιχεία για το δότη των λειτουργικών γονιδίων του LR31G7, μιας και είναι περιορισμένος ο αριθμός πλήρως αλληλουχημένων εντεροϊών. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε λεπτομερής ανάλυση της VP1-2A περιοχής όπου εντοπίστηκε ο ανασυνδυασμός. Τα 20 νουκλεοτίδια του 3' άκρου της VP1 και τα 20 νουκλεοτίδια του 5' άκρου της 2A παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα (92%) με το στέλεχος PicoBankDM1E3, ενώ στα 100 επόμενα νουκλεοτίδια το στέλεχος με τη μεγαλύτερη ομοιότητα (96%) είναι το NO-519, ένας εντεροϊός E25, που απομονώθηκε το 2003 στη Νορβηγία. Στην εικόνα 3.41 παρουσιάζεται η SimPlot ανάλυση όπου συγκρίνεται το LR31G7 με τα στελέχη PicoBankDM1E3 και NO-519 στην περιοχή του ανασυνδυασμού. Τα υψηλά ποσοστά ομοιότητας του LR31G7 με τα στελέχη PicoBankDM1E3 και NO-519

βοήθησαν στον εντοπισμό της ακριβής θέσης του ανασυνδυασμού. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.42 ο ανασυνδυασμός εντοπίστηκε στα νουκλεοτίδια 3357nt-3364nt.

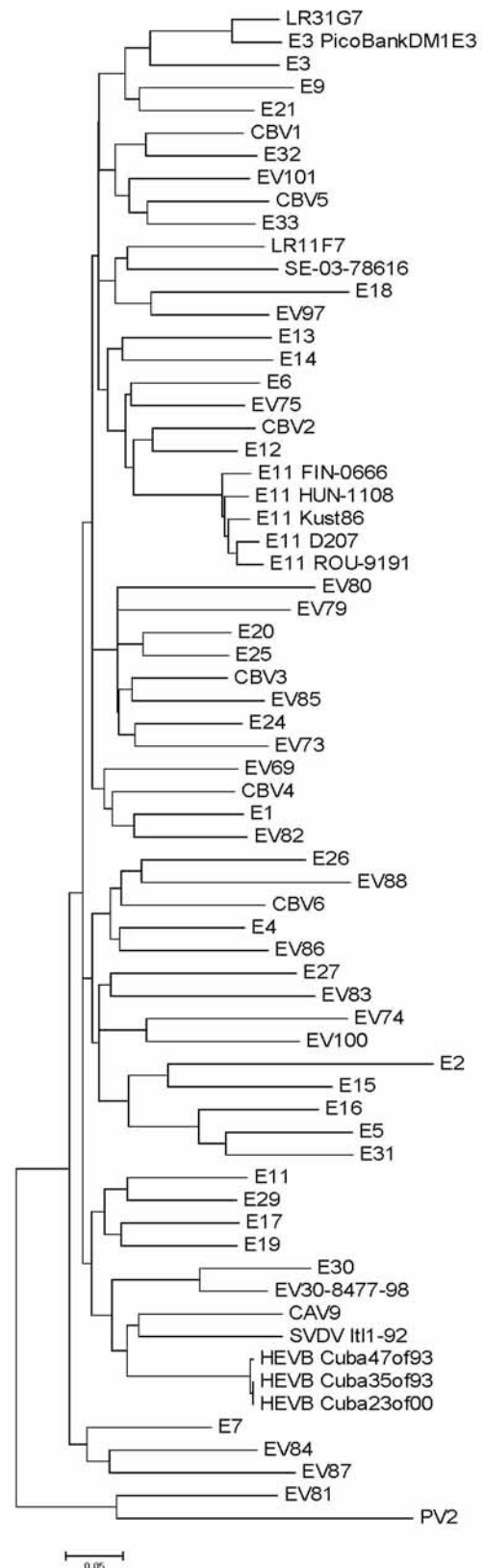
Γενωμική περιοχή	Morrisey		PicoBankDM1E3	
	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία
5' UTR	86	-	93	-
P1	80	97	90	99
VP4	80	98	92	100
VP2	79	97	90	99
VP3	82	97	91	99
VP1	79	96	90	98
P2	81	96	81	96
2A	82	94	82	94
2B	76	94	79	98
2C	81	98	82	97
P3	79	95	81	97
3A	79	97	80	97
3B	83	95	80	95
3C	78	93	81	97
3D*	78	96	80	97

Πίνακας 3.4. Νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία του LR31G7 με τον πρότυπο E3 στέλεχος Morrisey και το στέλεχος PicoBankDM1E3 για κάθε περιοχή.

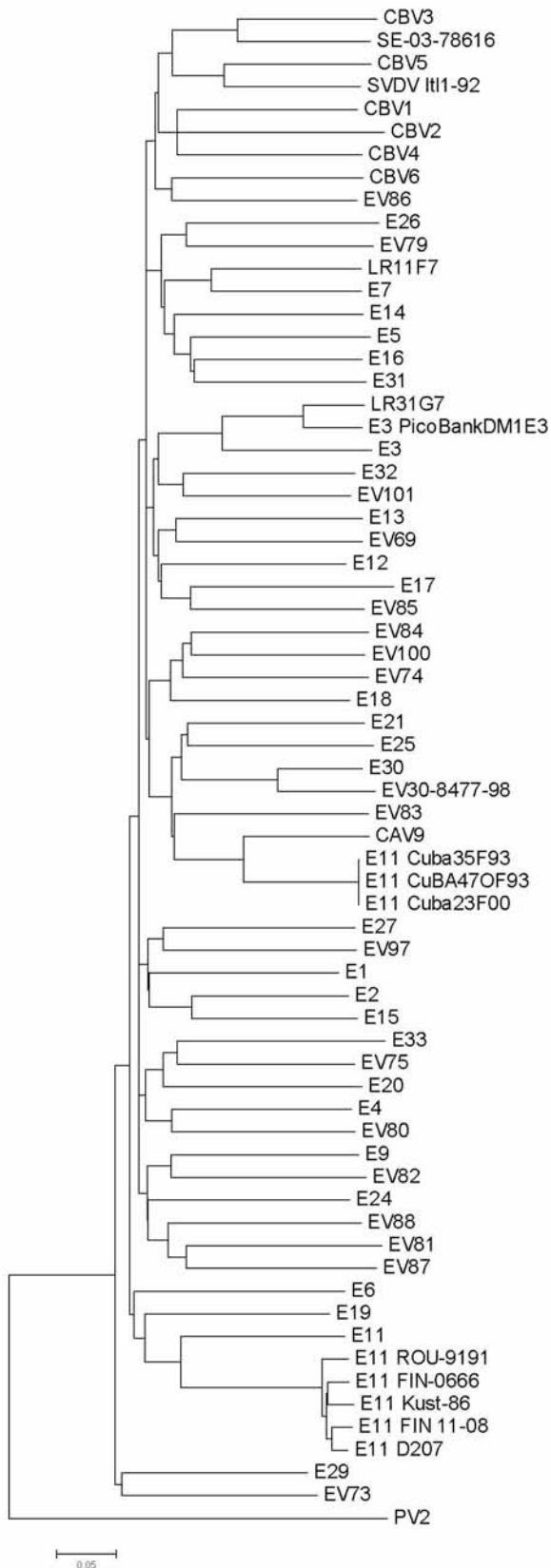
*1251nt της 3D γενωμικής περιοχής.



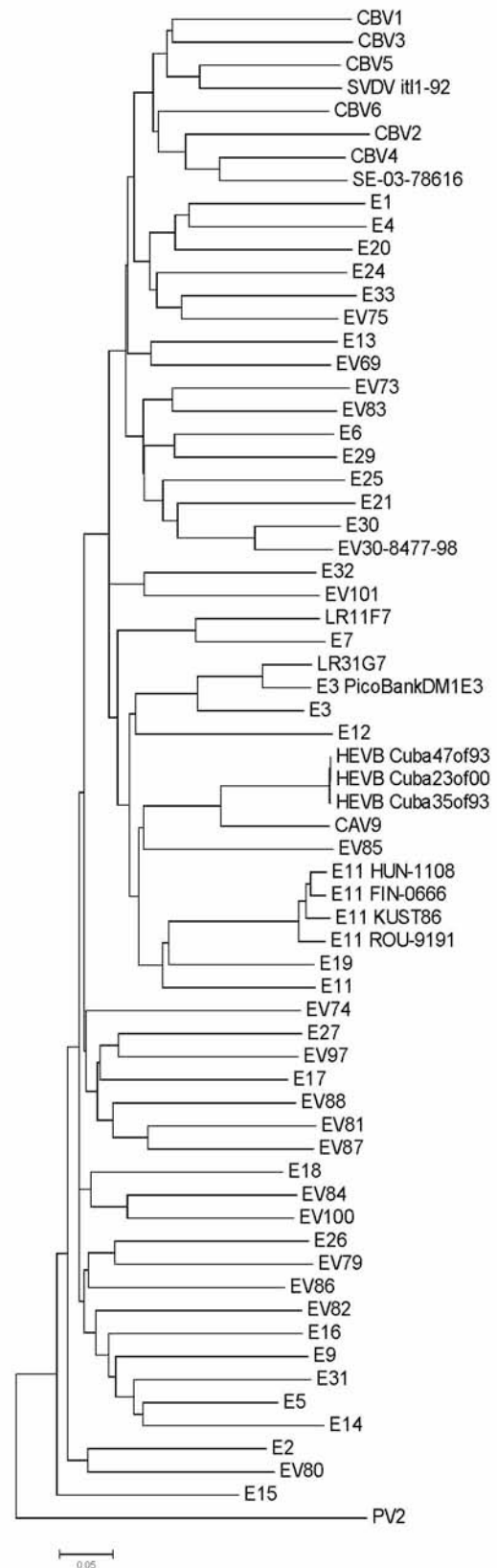
Εικόνα 3.27. Φυλογενετικό δέντρο της 5'UTR περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



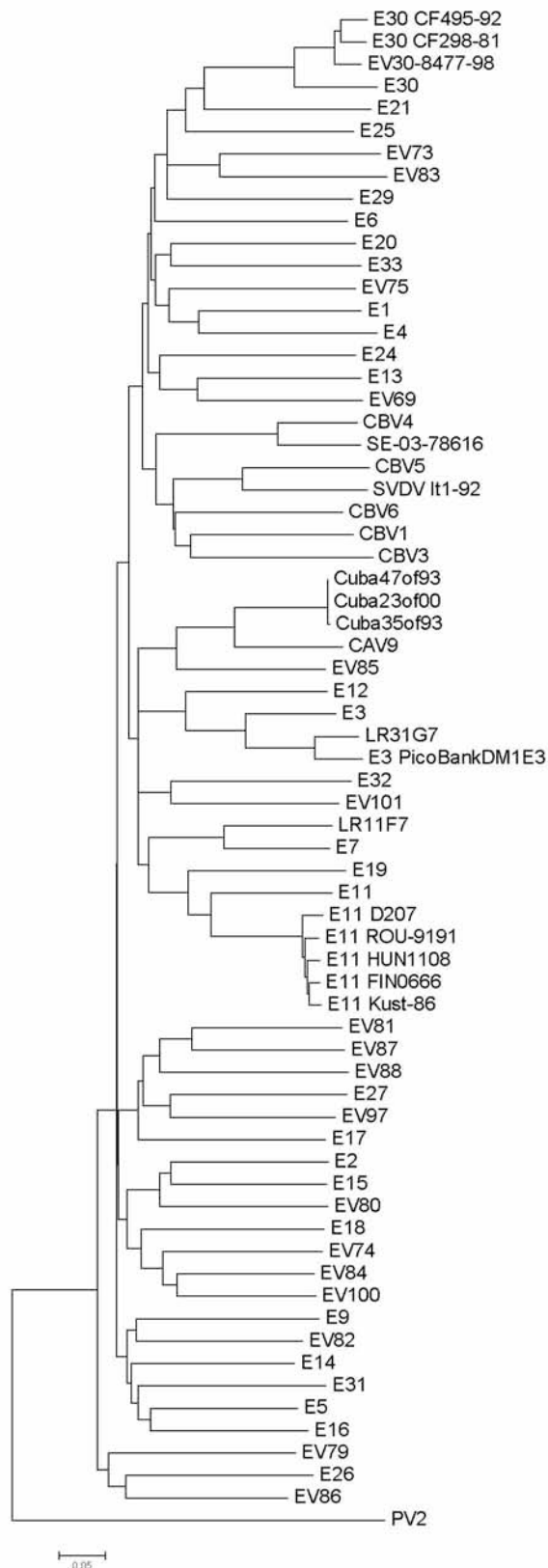
Εικόνα 3.28. Φυλογενετικό δέντρο της VP4 περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



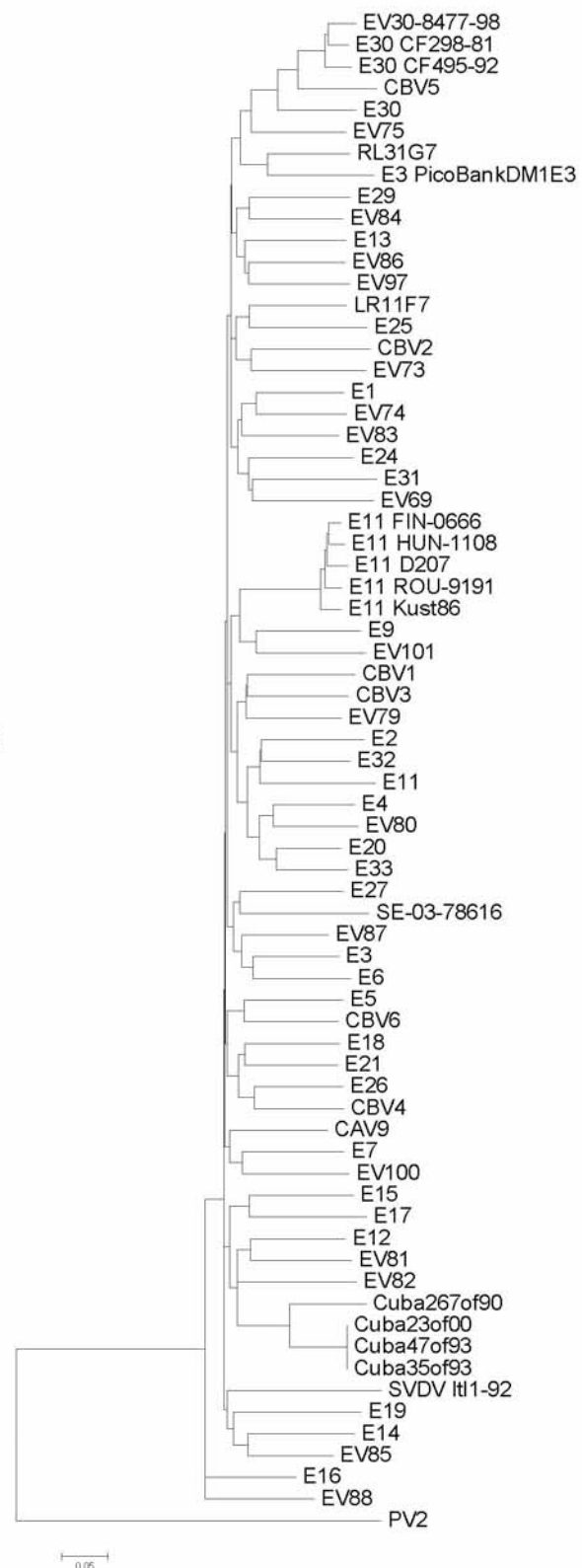
Εικόνα 3.29. Φυλογενετικό δέντρο της VP2 περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



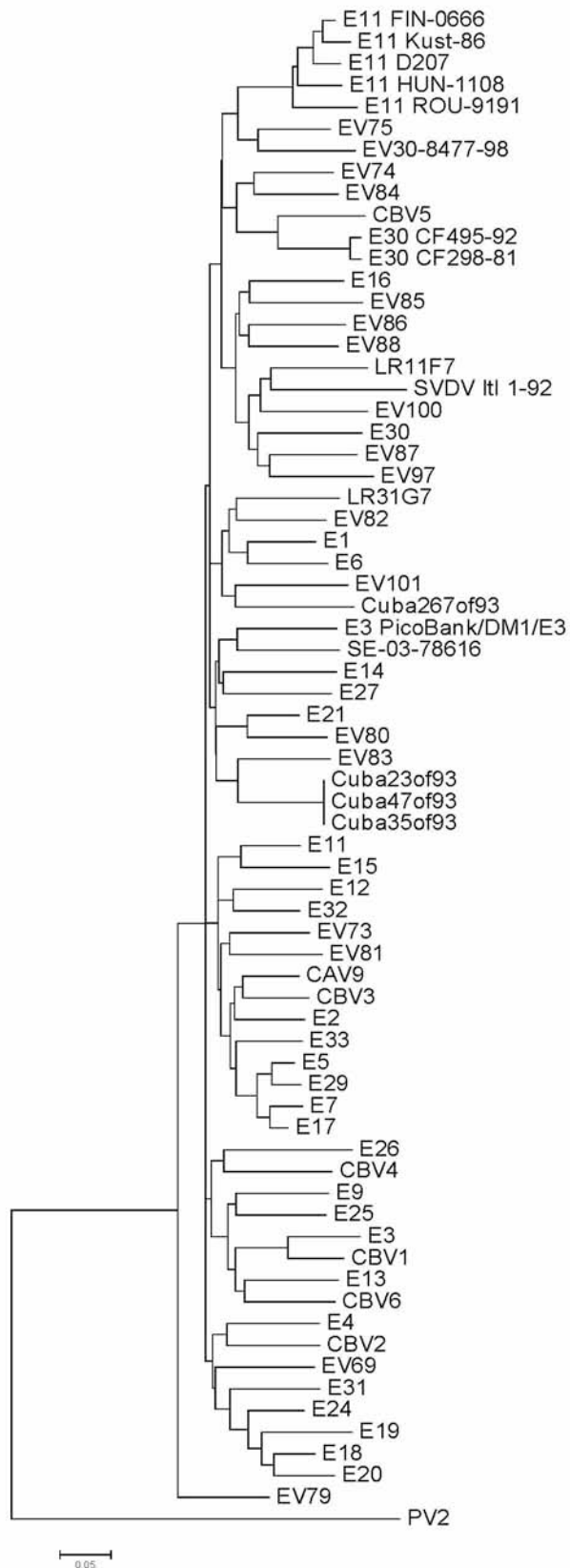
Εικόνα 3.30. Φυλογενετικό δέντρο της VP3 περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



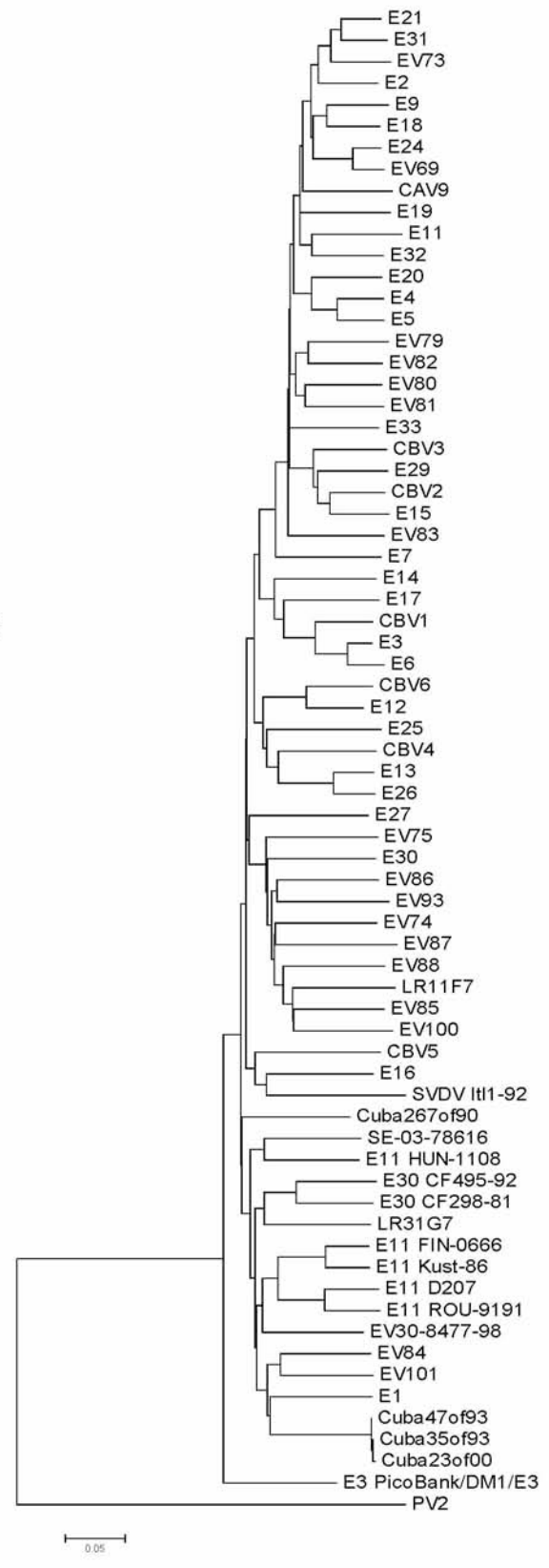
Εικόνα 3.31. Φυλογενετικό δέντρο της VP1 περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



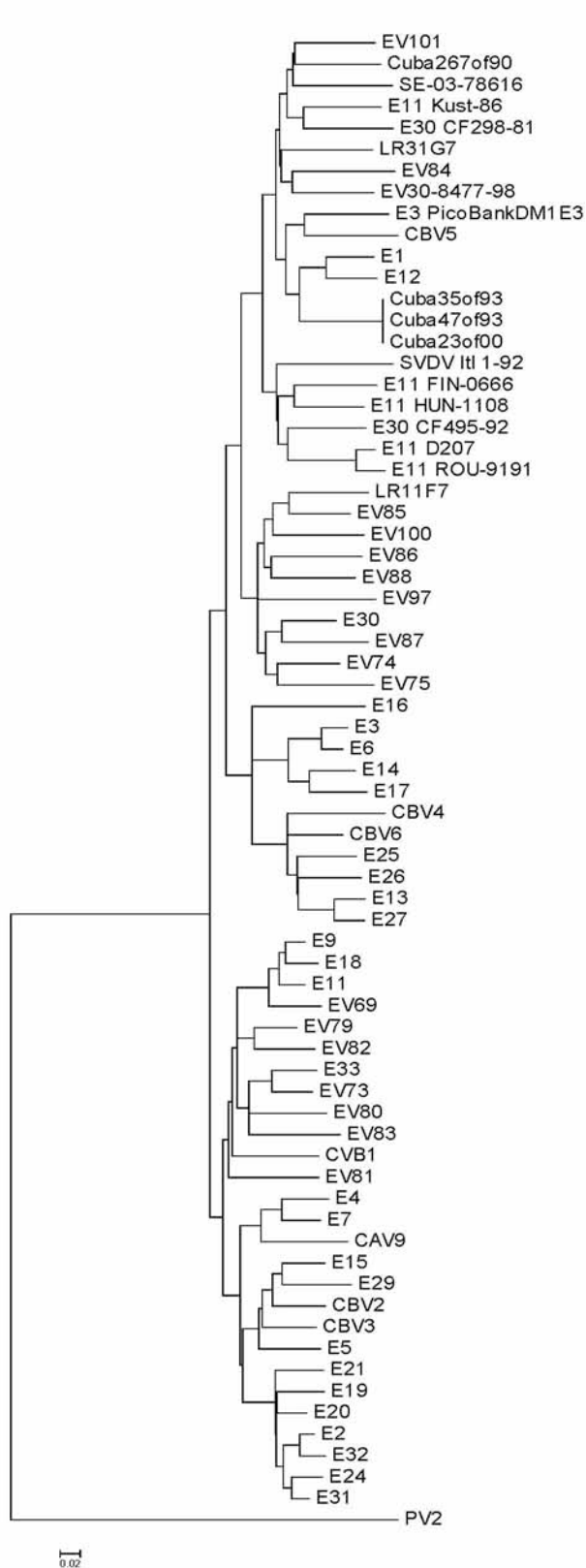
Εικόνα 3.32. Φυλογενετικό δέντρο της 2A περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



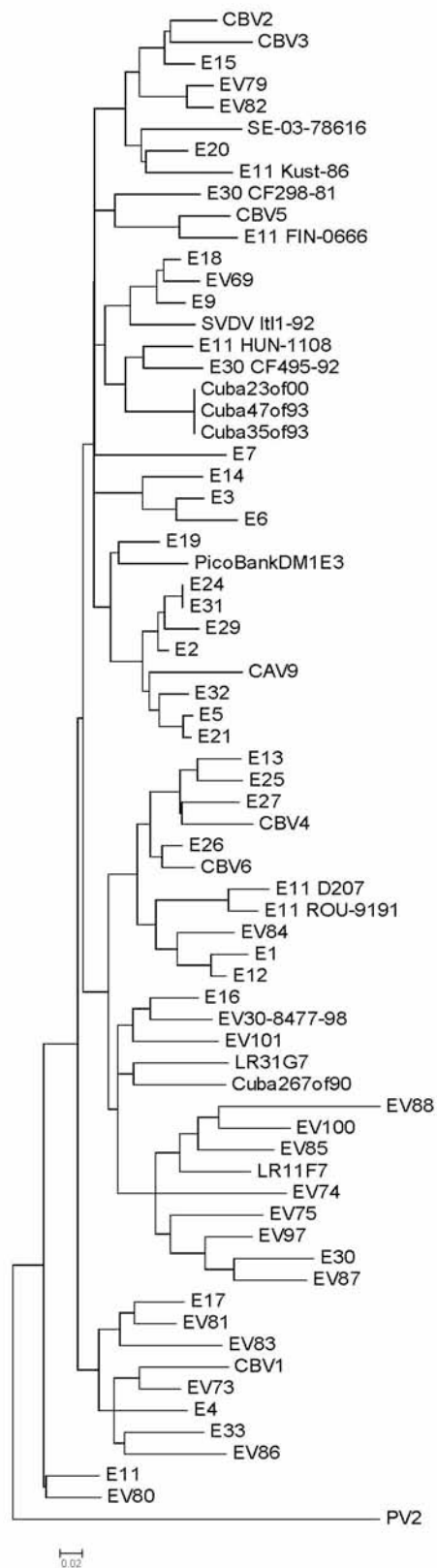
Εικόνα 3.33. Φυλογενετικό δέντρο της 2B περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



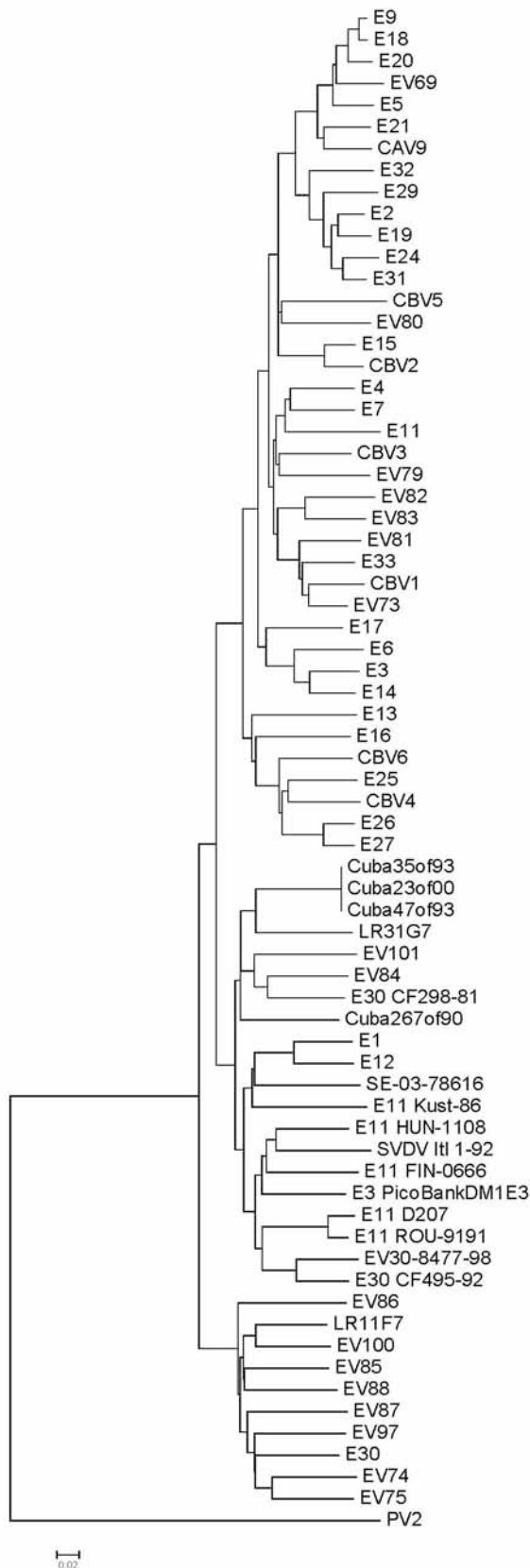
Εικόνα 3.34. Φυλογενετικό δέντρο της 2C περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



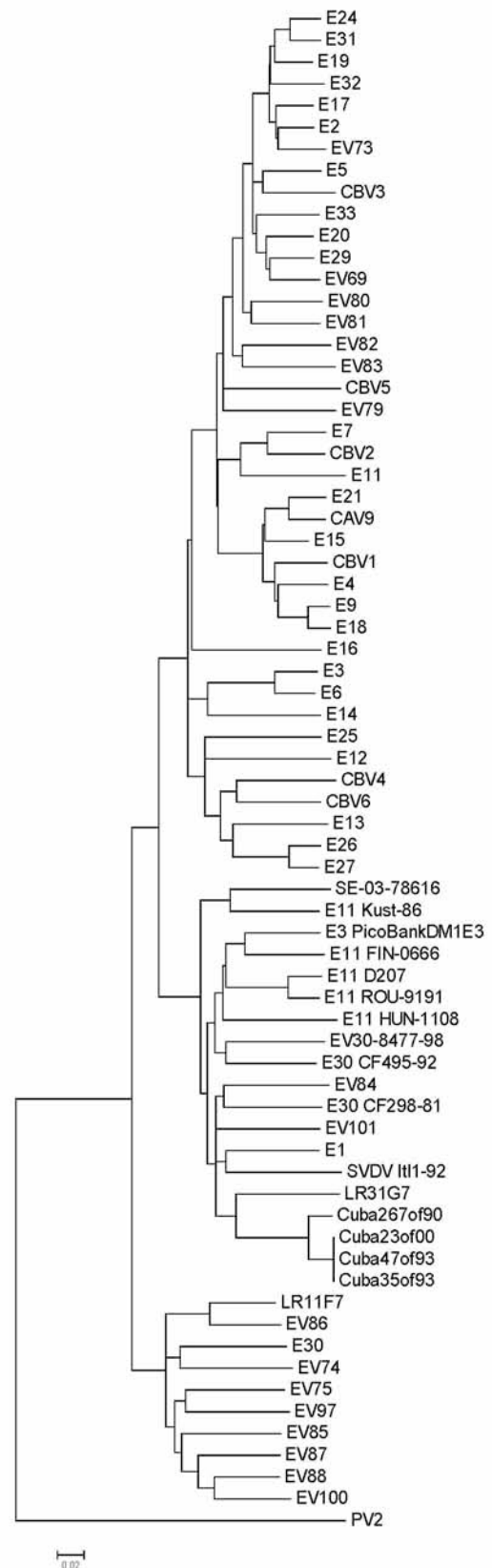
Εικόνα 3.35. Φυλογενετικό δέντρο της 3A περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



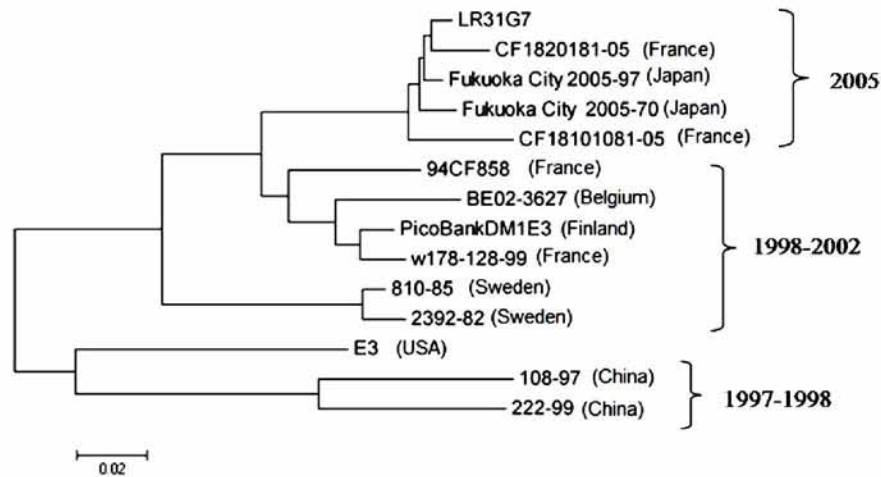
Εικόνα 3.36. Φυλογενετικό δέντρο της 3B περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



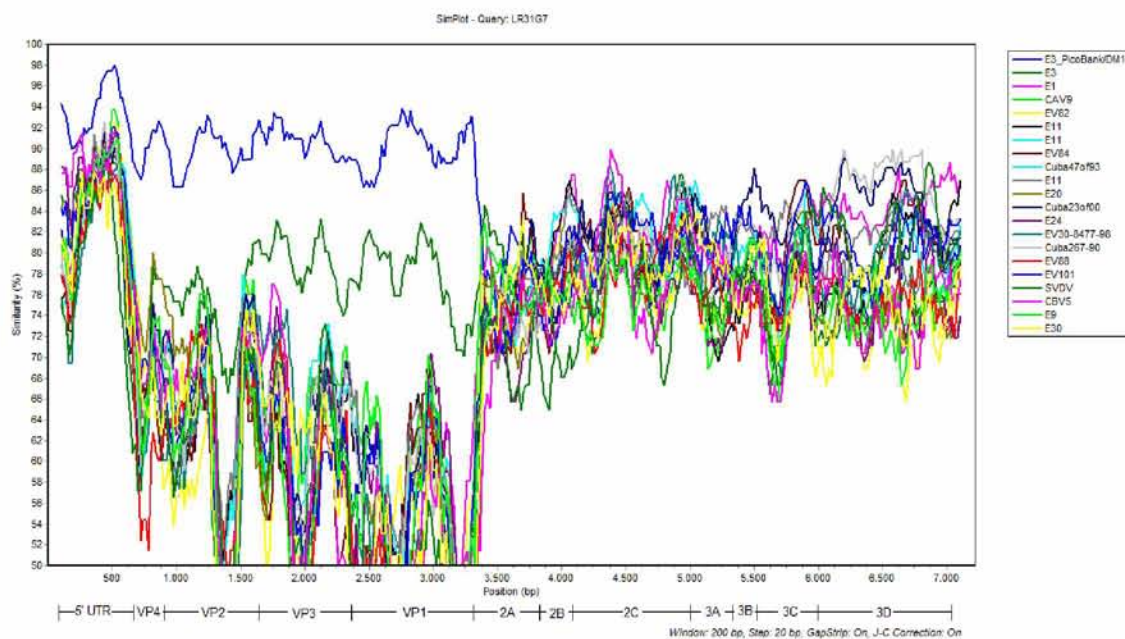
Εικόνα 3.37. Φυλογενετικό δέντρο της 3C περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



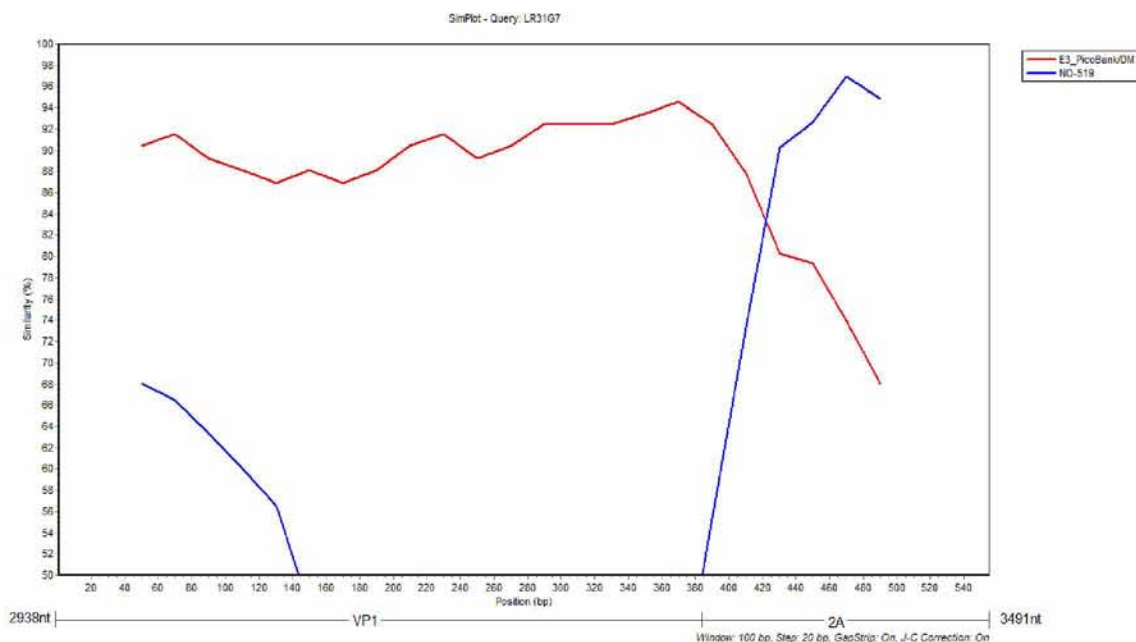
Εικόνα 3.38. Φυλογενετικό δέντρο της 3D περιοχής για το στέλεχος LR31G7.



Εικόνα 3.39. Φυλογενετικό δέντρο 269nt (2692-2960nt) της VP1 περιοχής του LR31G7 και άλλων E3 στελεχών.



Εικόνα 3.40. SimPlot ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους LR31G7.



Εικόνα 3.41. SimPlot ανάλυση της περιοχής του ανασυνδυασμού των *PicoBankDM1E3* και *NO-519* στελεχών.

PicoBank/DM1/E3	TATGGGGACGCTCCGCCCATGGGTATACCAGCCATGGGGCATTTCGGGCAGCAGTCTGG
LR31G7	TGTGGGGACGCTTCGCCCATGGGTATACCTAACCATGGAGCATTTCGGGCAGCAATCTGG
NO-519	AGAGAGATGACCATTTCGCCCTCAATGGCA--AACCATGGGGCGTTTCGGCCAGCAATCCGG
	* *
	3357 3364
PicoBank/DM1/E3	GGCTATCTATGTGGGTAACTACAGAGTAGTCAATAGGCACCTAGCCACGCATGTAGACTG
LR31G7	GGCTATCTATGTGGGTAACCTACAGAGTGGTCAACCGGCACCTAGCAACACACACTGACTG
NO-519	AGCTGTATATGTGGGTAACCTACAGAGTGGTCAACCGGCACCTAGCAACACACACTGATTG
	*** *
PicoBank/DM1/E3	GAGCAATTGTGTCTGGGAGGACTATAACAGAGATTTACTAATCAGCACCACCTACGGCCCT
LR31G7	GCAAAATTGTGTCTGGGAGAACTAACAGAGATCTCTAGTGAGCACAACACAGCACA
NO-519	GCAAAATTGTGTCTGGGAGAACTAACAGAGATCTCTAGTGAGCACAACCACTGCACA
	* *

Εικόνα 3.42. Απεικόνιση της περιοχής ανασυνδυασμού του *LR31G7*. Με κίτρινο παρουσιάζονται οι ομοιότητες του *LR31G7* με το *PicoBankDM1E3* και με πράσινο οι ομοιότητες μεταξύ του *LR31G7* και του *NO-519*.

3.7 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ LR51A5 ΚΑΙ LR61G3

Αλληλουχήθηκαν 7213 βάσεις (1-7213nt) του γονιδιώματος των στελεχών LR51A5 και LR61G3. Η νουκλεοτιδική ομοιότητα μεταξύ των δυο στελεχών είναι 99-100% σε όλες τις γενωμικές περιοχές.

Σύγκριση της VP1 γενωμικής περιοχής των LR51A5 και LR61G3 με την αντίστοιχη των πρότυπων στελεχών εντεροϊών κατέταξε τα στελέχη στον ορότυπο E6, με 77% και 93% νουκλεοτιδική και αμινοξική ομοιότητα αντίστοιχα.

Στον πίνακα 3.5 παρουσιάζεται η νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία των στελεχών LR51A5 και LR61G3 με το πρότυπο στέλεχος E6 D'Amorì, σε όλες τις γενωμικές περιοχές. Η περιοχή με το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας είναι η P2 (81% nt, 97% aa), ακολουθώντας οι περιοχές P3 (80% nt, 96-97% aa) και P1 (78% nt, 95% aa). Το γονίδιο με τη μέγιστη νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ των δύο απομονωθέντων στελεχών και του πρότυπου είναι το 2B (83%), ενώ αυτό με τη μικρότερη είναι το 2A (76%). Στην 5'UTR η νουκλεοτιδική ομοιότητα των LR51A5 και LR61G3 με το πρότυπο στέλεχος είναι 84% και 83% αντίστοιχα.

Για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων των στελεχών LR51A5 και LR61G3 με όλα τα πρότυπα στελέχη των HEV-B κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα ξεχωριστά για κάθε γενωμική περιοχή (εικόνες 3.43 έως 3.54). Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα E6 στελέχη EV6-14103-00 και EV6-10887-99 για τα οποία υπάρχει κατατεθειμένη ολόκληρη αλληλουχία στη GenBank, καθώς και στελέχη HEV-B τα οποία παρουσιάζουν υψηλή νουκλεοτιδική ομολογία με τα LR51A5 και LR61G3 σε ορισμένες γενωμικές περιοχές. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι αλληλουχίες των LR11F7 και LR31G7 στελεχών για την αναγνώριση πιθανών φυλογενετικών σχέσεων.

Στην 5'UTR παρατηρείται φυλογενετική συσχέτιση των LR51A5 και LR61G3 με το πρότυπο στέλεχος EV86, με νουκλεοτιδική ομοιότητα 88%. Στα φυλογενετικά δέντρα για τις καψιδιακές περιοχές τα στελέχη LR51A5 και LR61G3 ταξινομούνται με στελέχη καθώς και με το πρότυπο στέλεχος D' Amorì του οροτύπου E6, αποτελώντας μονοφυλετικό cluster. Εξαίρεση αποτελεί το φυλογενετικό δέντρο της VP4 γενωμικής περιοχής, όπου το πρότυπο E6 D'Amorì διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα E6 στελέχη. Για άλλη μια φορά συναντάμε τη

διακοπή της συσχέτιση οροτύπου-γονοτύπου στα φυλογενετικά δέντρα των λειτουργικών περιοχών. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.48, στη 2Α γενωμική περιοχή τα LR51A5 και LR61G3 ομαδοποιούνται με το πρότυπο στέλεχος CBV6, ενώ στη 2B με το πρότυπο στέλεχος EV82. Τα φυλογενετικά δέντρα για τις περιοχές 2C έως την 3D αναδεικνύουν φυλογενετική σχέση των LR51A5 και LR61G3 με στελέχη E30 (E30-CF1319-02, E30-CF1500801-05 και E30-CF1590401) τα οποία απομονώθηκαν στη Γαλλία την περίοδο 2002-2005, καθώς επίσης και με το στέλεχος SE-03-78616. Το SE-03-78616 απομονώθηκε στη Γαλλία το 2003, ανήκει στον ορότυπο CBV4 και είναι ανασυνδυασμένο στη 2Α με το στέλεχος E30 E30-CF1319-02 (Bouslama et al., 2007). Η νουκλεοτιδική ομοιότητα των LR51A5 και LR61G3 με τα προαναφερθέντα στελέχη κυμαίνεται από 83-84% στη 2C, 84-86% στην 3Α, 87-92% στην 3B, 89-91% στην 3C και 88-89% στην 3D.

Πραγματοποιήθηκε SimPlot ανάλυση των LR51A5 και LR61G3 για την περιοχή VP1-3D. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.55 τα δύο στελέχη παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα μεταξύ τους. Στη VP1 γενωμική περιοχή παρατηρείται υψηλή ομοιότητα με στελέχη του ίδιου οροτύπου, ενώ περνώντας στη λειτουργική περιοχή του γονιδιώματος εμφανίζονται υψηλά ποσοστά ομοιότητας με στελέχη HEV-B. Πιο συγκεκριμένα στη 2Α γενωμική περιοχή είναι εμφανής η ομοιότητα με το πρότυπο στέλεχος CBV6, ενώ από τη 2C περιοχή έως και το τέλος του γονιδιώματος φαίνεται η ομοιότητα με τα E30 στελέχη, υποδηλώνοντας την ύπαρξη πιθανού ανασυνδυασμού.

Για την επιδημιολογική συσχέτιση των LR51A5 και LR61G3 στελεχών με στελέχη του ίδιου οροτύπου κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο σε 358 βάσεων (2446 to 3307 nt) της VP1 γενωμικής περιοχής (εικόνα 3.56) κοινό για τις περισσότερες κατατεθειμένες αλληλουχίες Ε6 ελληνικών και άλλων στελεχών. Τα στελέχη LR51A5 και LR61G3 συσχετίζονται φυλογενετικά με τα στελέχη ECV6/51.07/2007/GRC and ECV6/82.07/2007/GRC, που απομονώθηκαν στην Ελλάδα από επιδημία άσηπτης μηνιγγίτιδας το καλοκαίρι του 2007. Η νουκλεοτιδική ομοιότητα των περιβαλλοντικών στελεχών με τα επιδημικά στελέχη του 2007 στη συγκεκριμένη περιοχή είναι 98%. Στην επιδημιολογική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επίσης Ε6 στελέχη που απομονώθηκαν από επιδημία άσηπτης μηνιγγίτιδας στην Ελλάδα το 2001 (Ver, Paran, Tsikan, Kras) τα οποία φυλογενετικά είναι απομακρυσμένα από τα στελέχη LR51A5 και LR61G3. Η

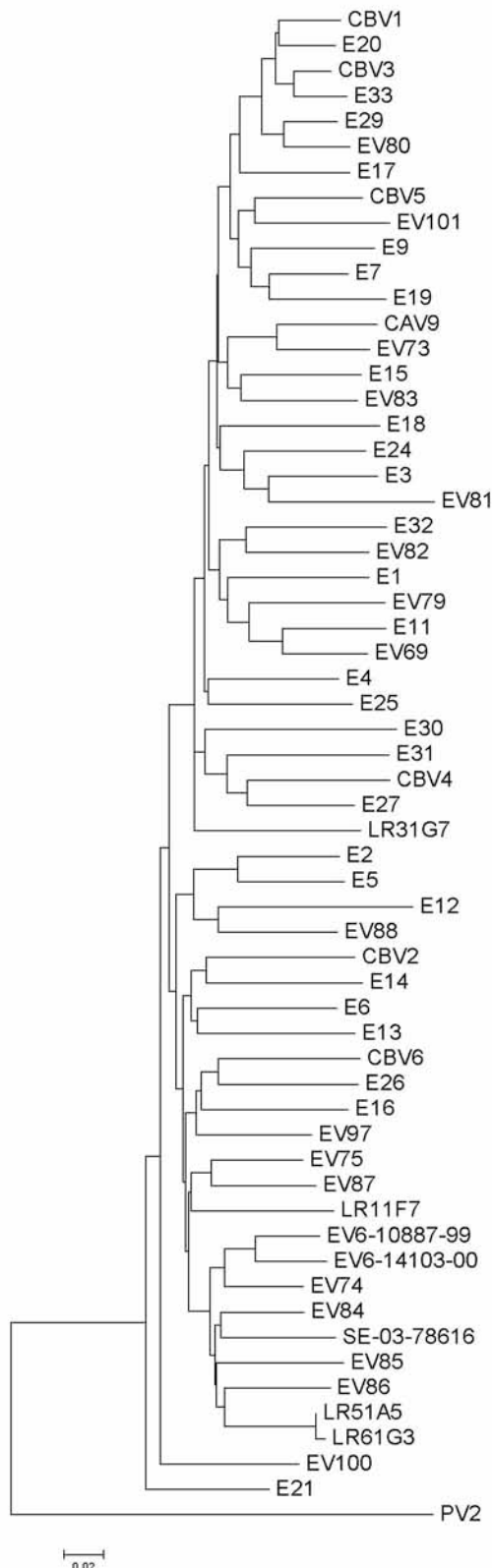
νουκλεοτιδική διαφορά μεταξύ των LR51A5 και LR61G3 και των επιδημικών στελεχών του 2001 είναι 18%. Επίσης, τα στελέχη LR51A5 και LR61G3 ταξινομούνται στην ίδια φυλογενετική ομάδα με στελέχη που απομονώθηκαν από τη Γαλλία το 2005 (87CF25eu), το Αζερμπαϊτζάν (25214_Aze_05) και τη Γεωργία (25308_GEO_05) το 2005, καθώς και με το 26345_Khab_06 που απομονώθηκε από τη Ρωσία το 2006. Η νουκλεοτιδική ομοιότητα με τα παραπάνω στελέχη κυμαίνεται μεταξύ 84% και 85%.

Στην εικόνα 3.58 παρουσιάζεται η SimPlot ανάλυση της VP1 περιοχής του LR51A5. Διακρίνονται τέσσερις περιοχές καθεμιά από τις οποίες παρουσιάζει μέγιστη ομοιότητα με διαφορετικό στέλεχος. Τα 260 nt στο 5' άκρο της VP1 παρουσιάζουν μέγιστη ομοιότητα (85%) με το στέλεχος 25781_Tumen_2006, η περιοχή από 261-490 nt της VP1 εμφανίζει μέγιστη ομοιότητα (89%) με το στέλεχος 87CF36eu, η περιοχή από 491-662 nt παρουσιάζει μέγιστη ομοιότητα (89%) με το στέλεχος 25685_Tambov_05, ενώ τα 205 nt στο 3' άκρο της VP1 παρουσιάζουν μέγιστη ομοιότητα (84%) με το 87CF36eu. Κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα μεταξύ E6 στελεχών ξεχωριστά για τα τέσσερα τμήματα της VP1 (εικόνα 3.57), όπου φαίνεται η διαφορά στις φυλογενετικές σχέσεις των LR51A5 και LR61G3 σε κάθε τμήμα της VP1.

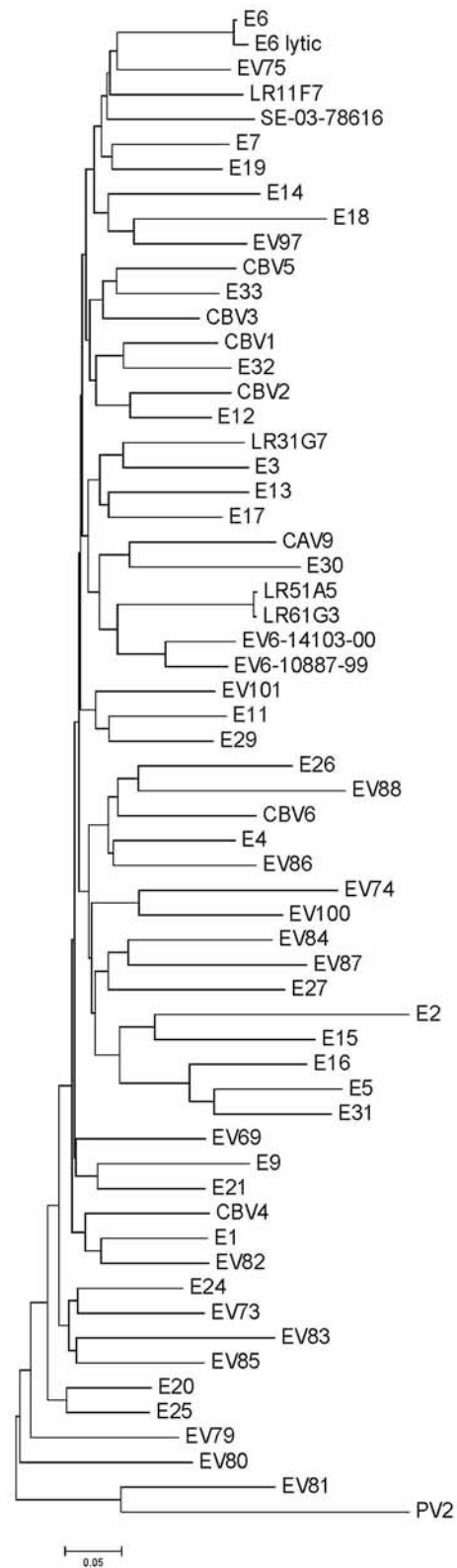
Γενωμική περιοχή	LR51A5		LR61G3	
	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία
5' UTR	84	-	83	-
P1	78	95	78	95
VP4	80	95	79	95
VP2	79	96	78	97
VP3	78	99	78	100
VP1	77	93	77	93
P2	81	97	81	97
2A	76	94	76	94
2B	83	96	83	95
2C	82	99	82	99
P3	80	97	80	96
3A	77	96	77	96
3B	78	95	78	95
3C	80	97	79	97
3D*	81	97	81	97

Πίνακας 3.5. Νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία των στελεχών LR51A5 και LR61G3 με το πρότυπο E6 D'Amorì στέλεχος για κάθε γενωμική περιοχή.

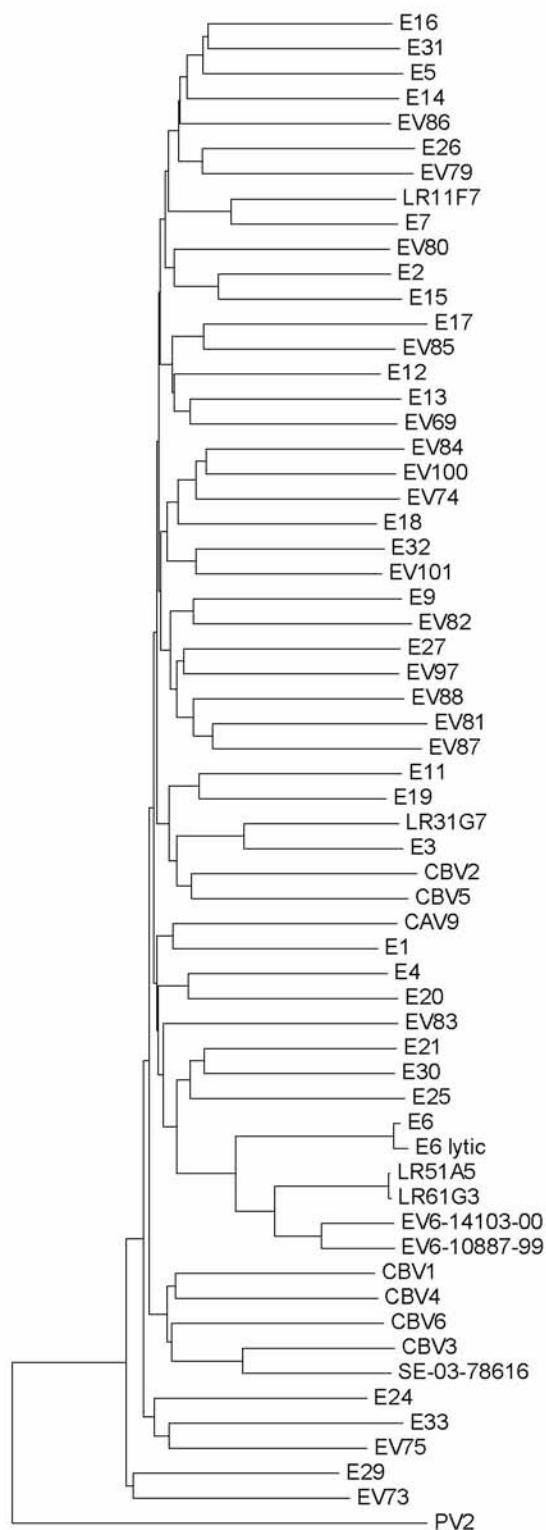
*1238nt της 3D γενωμικής περιοχής.



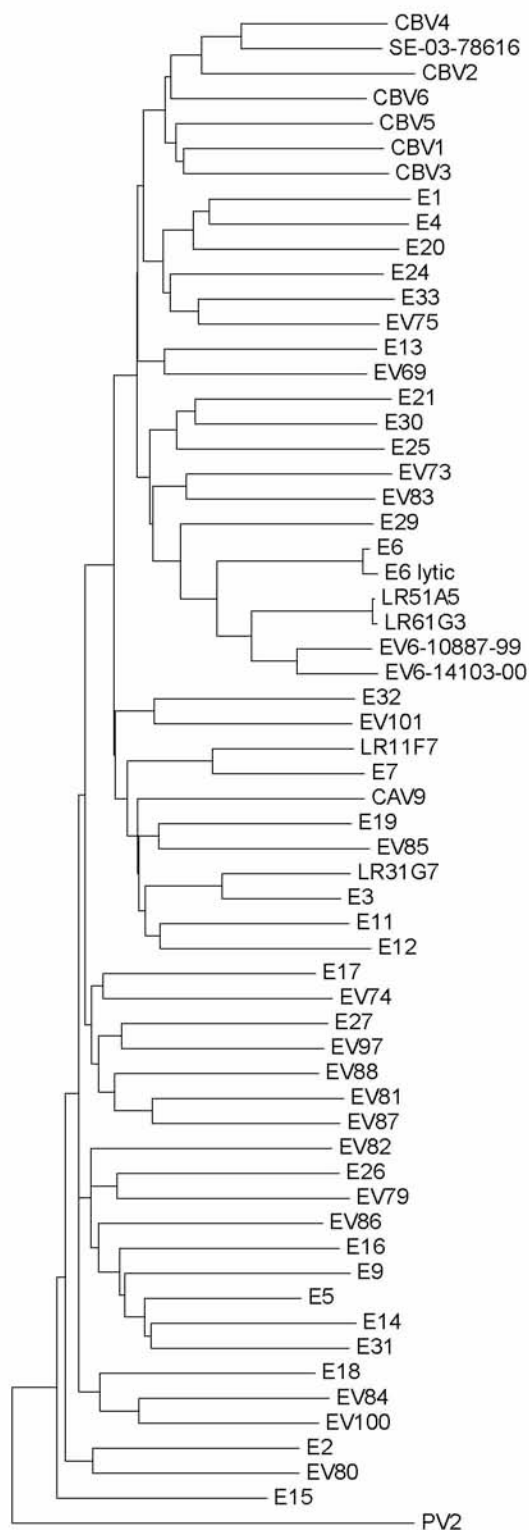
Εικόνα 3.43. Φυλογενετικό δέντρο της 5'UTR περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



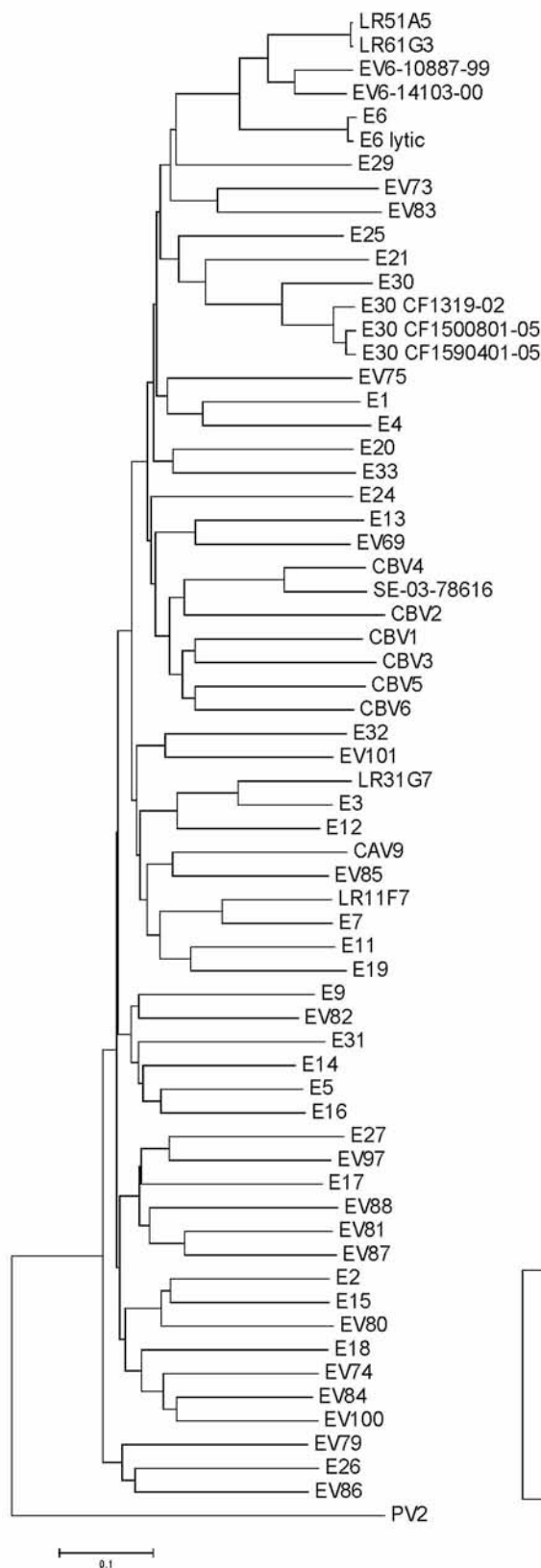
Εικόνα 3.44. Φυλογενετικό δέντρο της VP4 περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



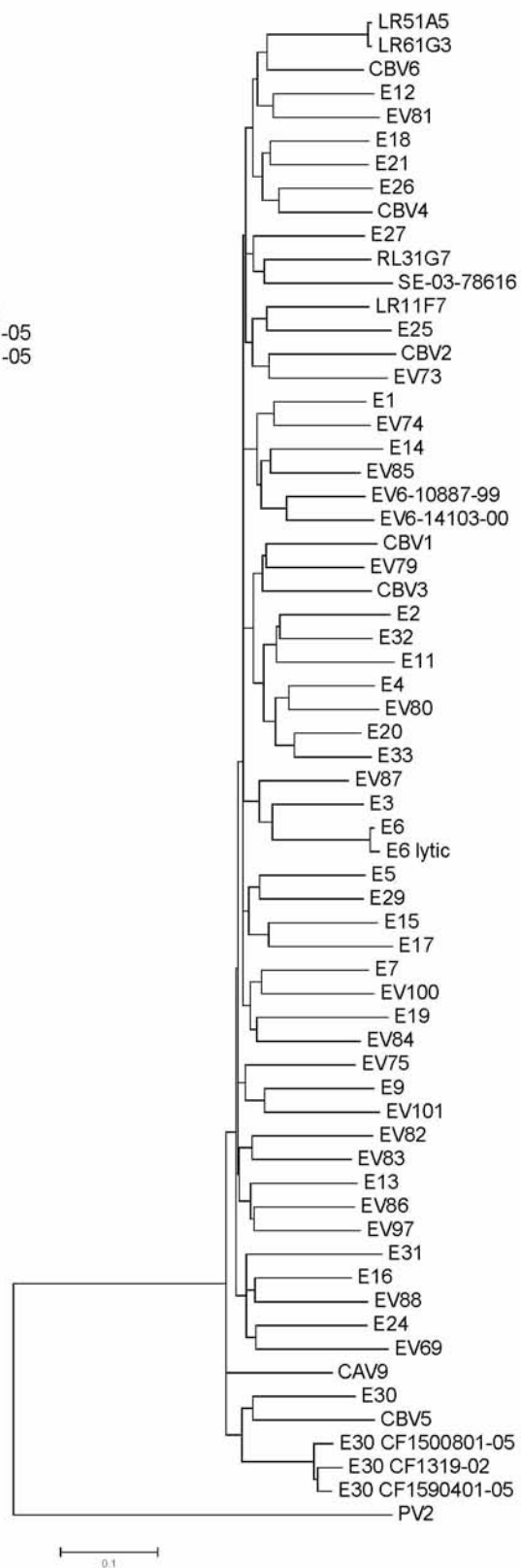
Εικόνα 3.45. Φυλογενετικό δέντρο της VP2 περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



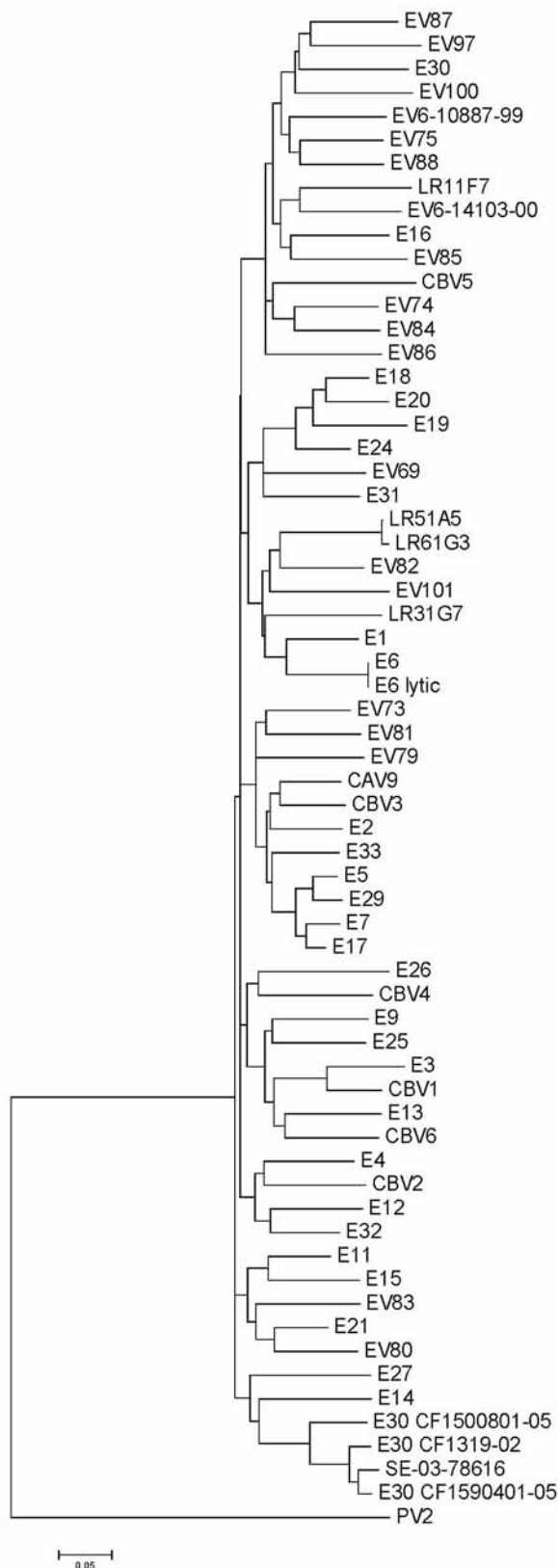
Εικόνα 3.46. Φυλογενετικό δέντρο της VP3 περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



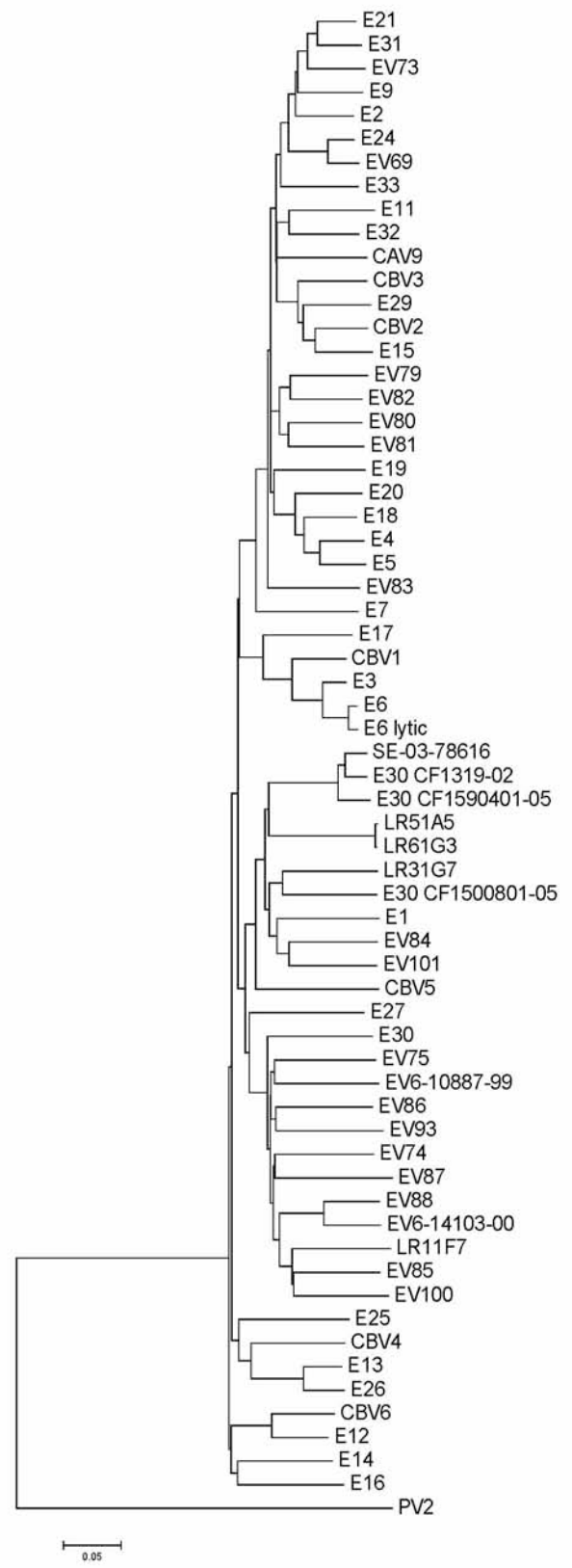
Εικόνα 3.47. Φυλογενετικό δέντρο της VP1 περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



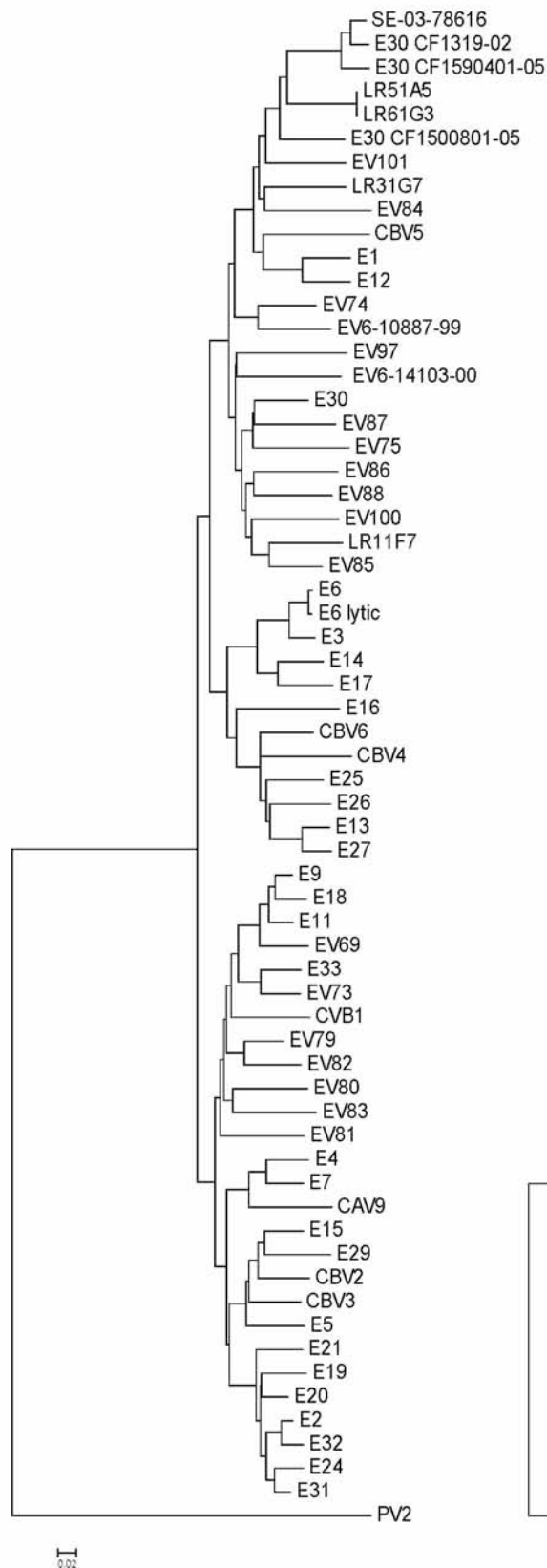
Εικόνα 3.48. Φυλογενετικό δέντρο της 2A περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



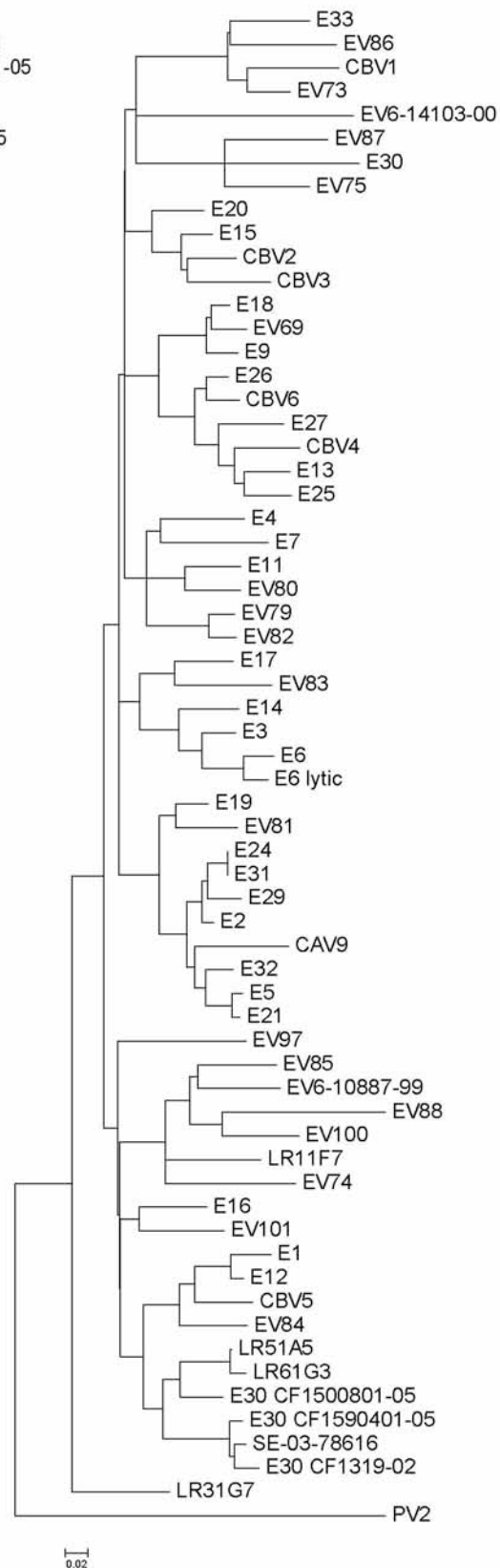
Εικόνα 3.49. Φυλογενετικό δέντρο της 2B περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



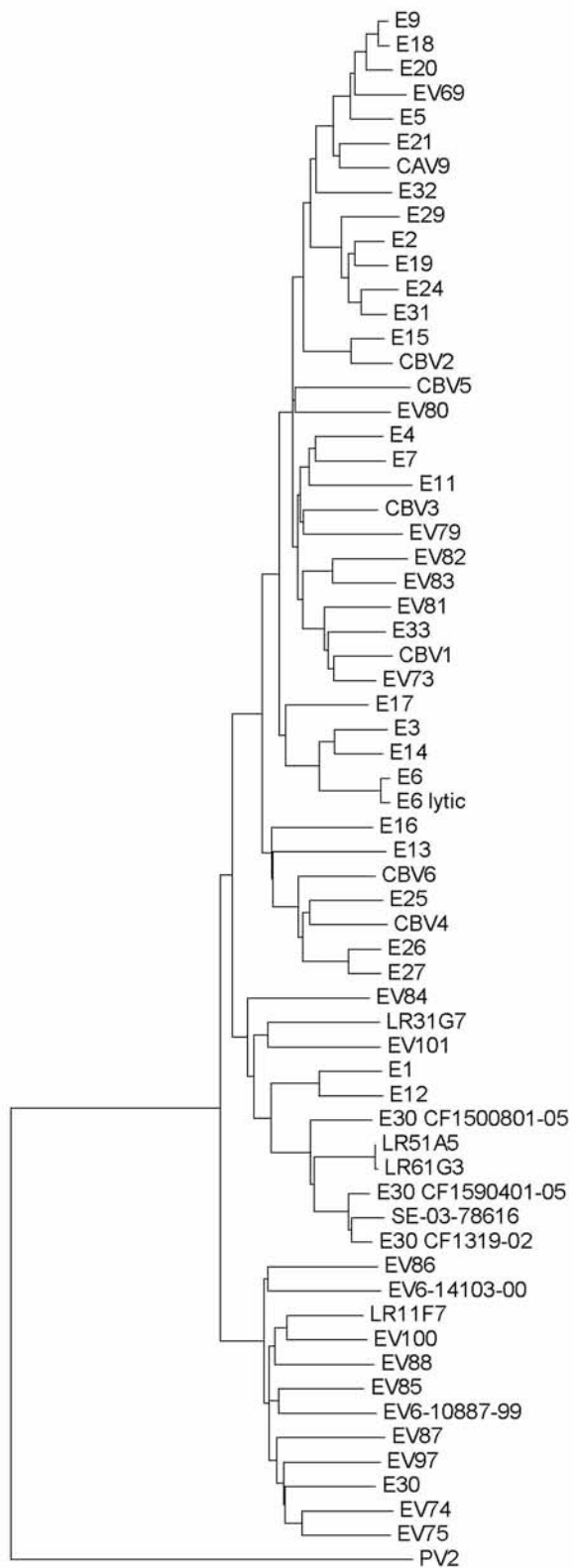
Εικόνα 3.50. Φυλογενετικό δέντρο της 2C περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



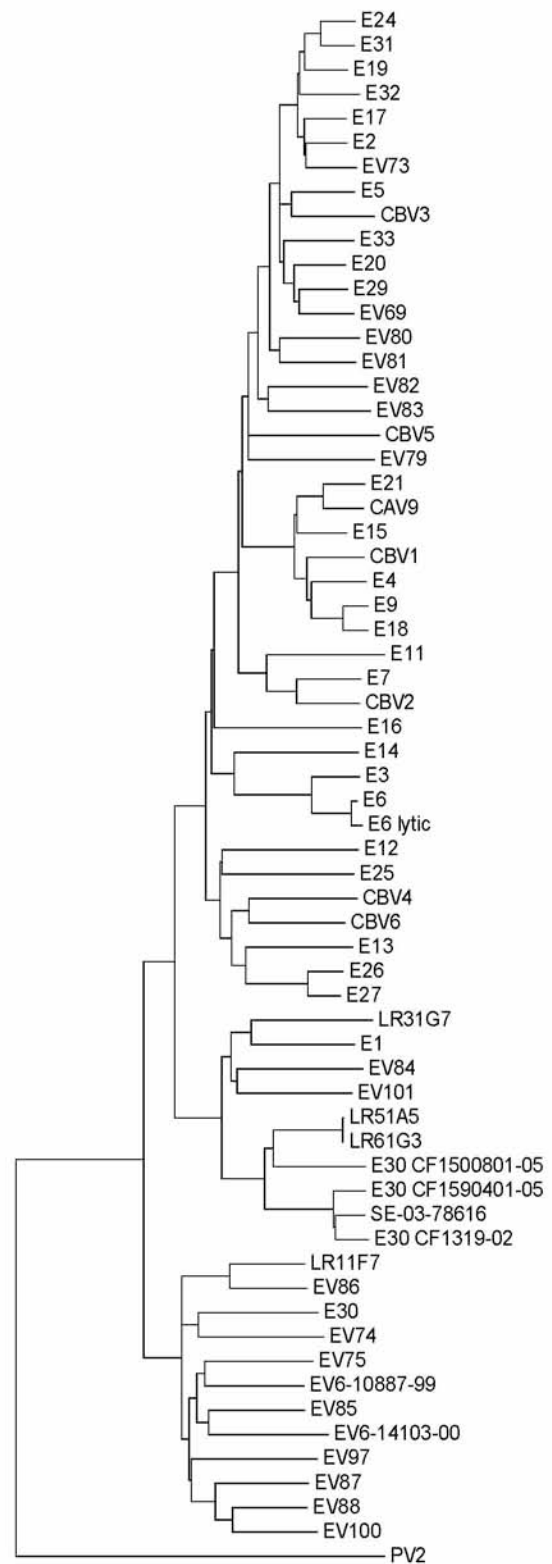
Εικόνα 3.51. Φυλογενετικό δέντρο της 3A περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



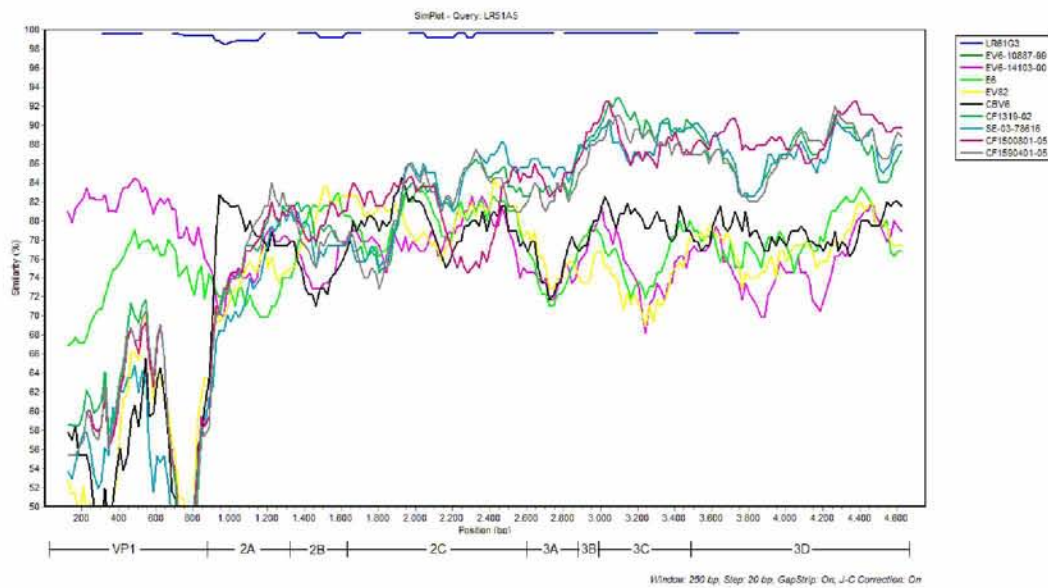
Εικόνα 3.52. Φυλογενετικό δέντρο της 3B περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



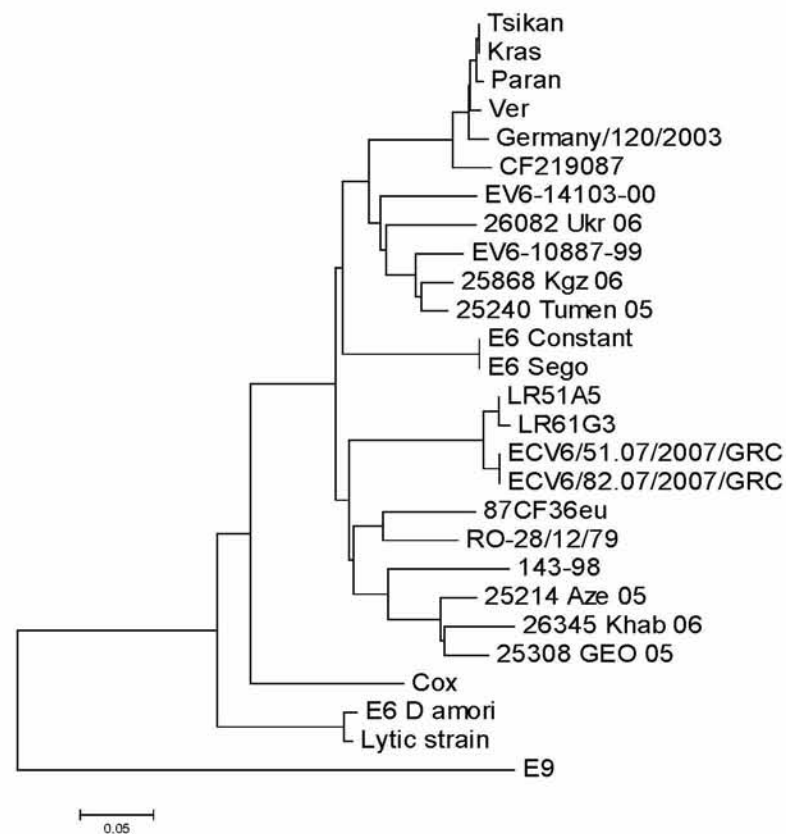
Εικόνα 3.53. Φυλογενετικό δέντρο της 3C περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



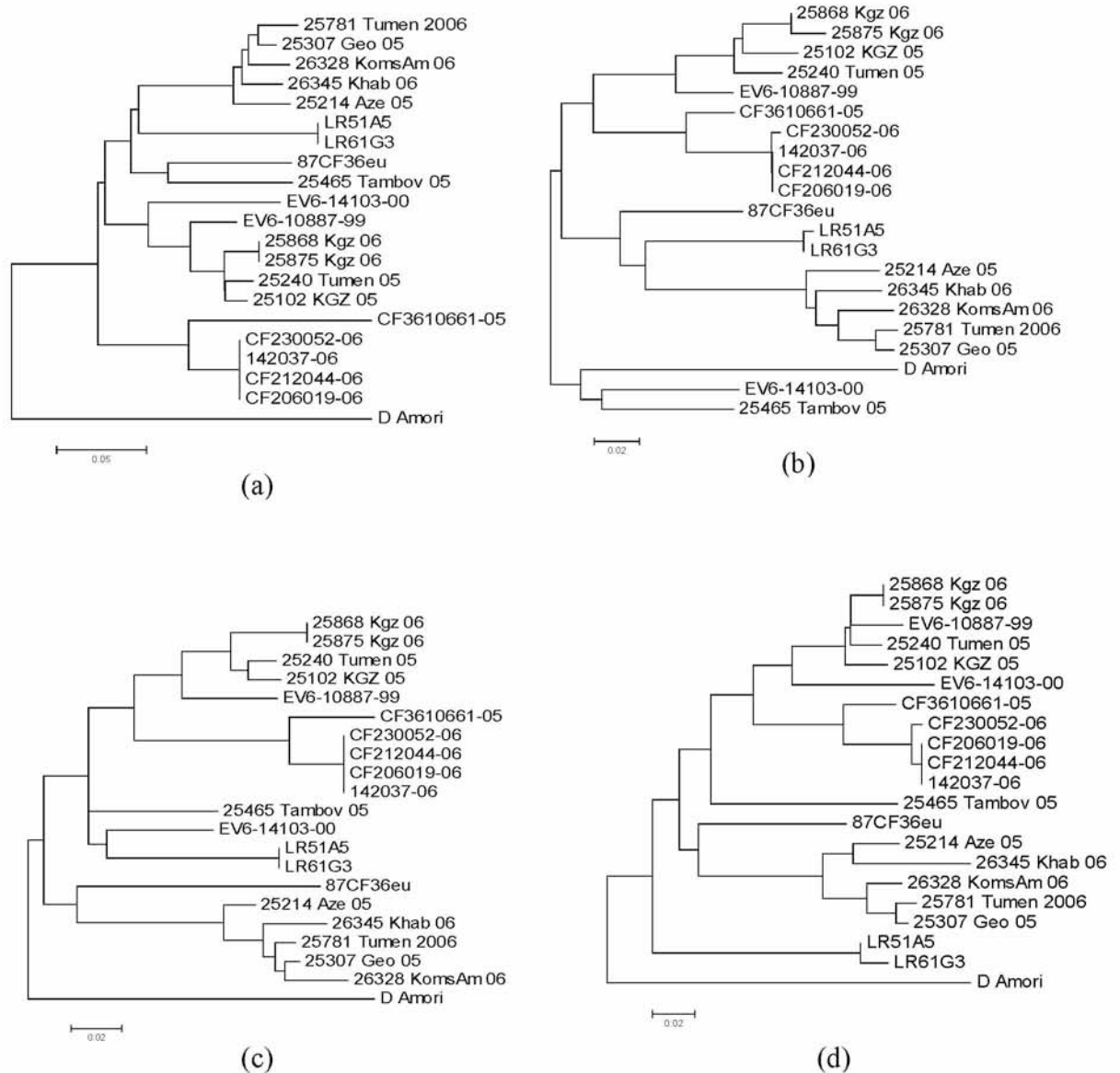
Εικόνα 3.54. Φυλογενετικό δέντρο της 3D περιοχής για τα στελέχη LR51A5 και LR61G3.



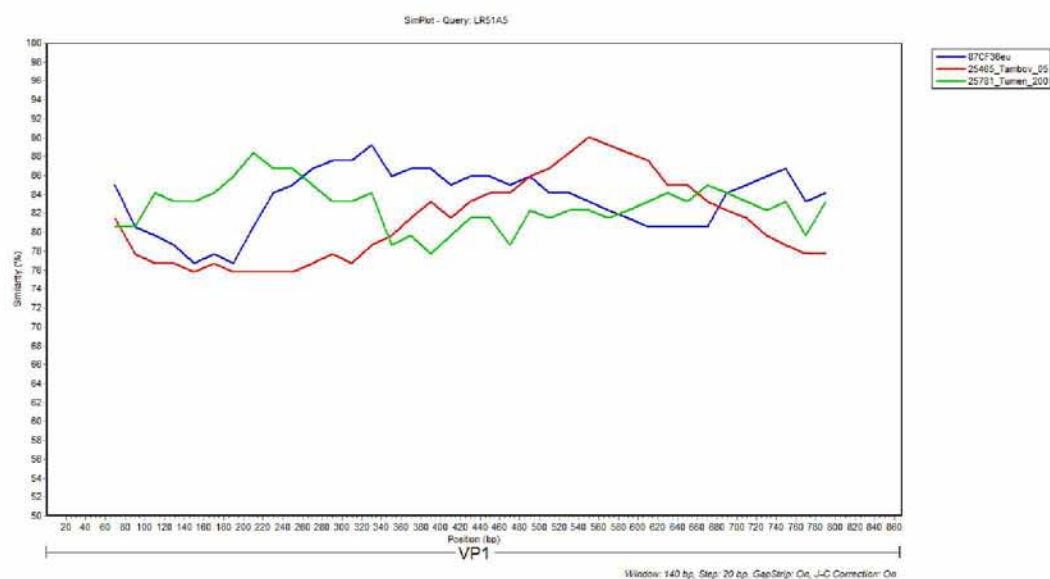
Εικόνα 3.55. SimPlot ανάλυση της γενωμικής περιοχής VP1-3D του στελέχους LR51A5.



Εικόνα 3.56. Φυλογενετικό δέντρο 358 νουκλεοτιδίων της VP1 γενωμικής περιοχής των LR51A5 και LR6G3 και άλλων E6 στελεχών.



Εικόνα 3.57. Φυλογενετικά δέντρα για τέσσερα τμήματα της VP1 γενομικής περιοχής των LR51A5 και LR61G3: (a) 1-261nt της VP1, (b) 261-490nt της VP1, (c) 491-662nt της VP1 και (d) 663-867 nt της VP1.



Εικόνα 3.58. SimPlot ανάλυση της VP1 γενομικής περιοχής του LR51A5 στελέχους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι εντερικοί ιοί -υπεύθυνοι για αρκετές ασθένειες του ανθρώπου- μεταφέρονται εύκολα σε υδάτινα περιβάλλοντα και είναι παρόντες σε ανεπαρκώς επεξεργασμένα νερά, υπόγεια ύδατα, λίμνες, ποτάμια και θάλασσες. Από τους εντερικούς ιούς, κύρια παθογόνα του ανθρώπου αποτελούν οι εντεροϊοί και η παρουσία τους στο περιβάλλον μπορεί να αποτελεί απειλή για τη δημόσια υγεία (Rajtar et al., 2008). Οι εντεροϊοί είναι εξαιρετικά ανθεκτικοί όχι μόνο στη χλωρίωση, κατά την επεξεργασία των λυμάτων, αλλά και σε μεγάλες διακυμάνσεις αλατότητας και θερμοκρασίας. Οι ιδιότητες αυτές διευκολύνουν την επιβίωσή τους σε υδάτινα περιβάλλοντα, αποτελώντας κύρια δεξαμενή αυτών των παθογόνων.

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια των Picorna ιών. Είναι μικροί μη ελντροφόροι ιοί και το γενετικό τους υλικό αποτελείται από μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας μεγέθους 7.500 βάσεων περίπου. Οι εντεροϊοί, όπως όλοι οι RNA ιοί, παρουσιάζουν πολύ υψηλούς ρυθμούς εξέλιξης με κύριους παράγοντες τις μεταλλάξεις και τους ανασυνδυασμούς.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής έχοντας ως στόχο τη μελέτη περιβαλλοντικών δειγμάτων, αναπτύχθηκαν τεχνικές συγκέντρωσης και ανίχνευσης εντεροϊών σε αυτά, οι οποίες εφαρμόστηκαν σε δείγματα μη επεξεργασμένων λυμάτων και ποταμού. Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, στα πλαίσια αναζήτησης ανασυνδυασμών ως ισχυρά γεγονότα εξέλιξης των εντεροϊών, μελετήθηκε ολόκληρο το γονιδίωμα των στελεχών που απομονώθηκαν από το περιβάλλον καθώς και τριών αγρίου τύπου πολιοϊών που απομονώθηκαν από κρούσματα πολιομυελίτιδας.

4.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ semi nested-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Για τη μοριακή ανίχνευση των εντεροϊών έχουν προταθεί αρκετά πρωτόκολλα PCR τα οποία στοχεύουν κυρίως σε υψηλά συντηρημένες περιοχές

του γονιδιώματός τους, όπως η 5'UTR ή η VP2 καψιδιακή περιοχή (Georgoroulou et al., 2000; Romero J.R. 1999; Poyry et al., 1996). Η αδυναμία όμως συσχέτισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των περιοχών αυτών με τον ορότυπο, οδήγησε στη χρήση εκκινητών που στοχεύουν σε διατηρημένα αμινοξικά μοτίβα της VP1 καψιδιακής περιοχής, η οποία φέρει τα κύρια αντιγονικά σημεία των εντεροϊών (Oberste et al., 1999; Caro et al., 2001; Oberste et al., 2003; Casas et al., 2001; Kilpatrick et al., 2001). Ωστόσο, μελέτες σε πρότυπα και κλινικά στελέχη Echo, CAV και CBV ιών που συγκρίνουν διάφορα πρωτόκολλα PCR, καταδεικνύουν την 5'UTR ως την πιο αξιόπιστη για την ανίχνευση όλων των οροτύπων εντεροϊών (Kottaridi et al., 2004; Bolanaki et al., 2005).

Για τη μοριακή ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων εντεροϊών αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο semi nested-PCR, το οποίο εφαρμόστηκε με απόλυτη επιτυχία σε 46 πρότυπα (46 ορότυποι) και 49 κλινικά στελέχη (19 ορότυποι). Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν σε συντηρημένα τμήματα της 5'UTR, τα οποία εντοπίζονται σε δευτεροταγείς δομές. Συγκεκριμένα, ο κωδικός εκκινητής TS1 αναγνωρίζει τμήμα της δομικής περιοχής I (δομή τριφυλλιού ή cloverleaf), ενώ οι αντικωδικοί εκκινητές TS3 και HEV-C-9 (εσωτερικός) στοχεύουν σε δευτεροταγή τμήματα του στοιχείου IRES, περιοχές VI και V, αντίστοιχα. Τελικά, το τμήμα που ενισχύεται κατά τη semi nested-PCR περιλαμβάνει τμήμα του στοιχείου cloverleaf και τις δομικές περιοχές II, III, IV και V του στοιχείου IRES.

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ - ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Οι εντεροϊοί μπορούν να απομονωθούν από μια πληθώρα περιβαλλοντικών δειγμάτων, όπως ποτάμι, θάλασσα, πόσιμο νερό, υπόγεια ύδατα και λύματα. Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομόνωση και ανίχνευση ιών αποτελείται από δύο κύρια βήματα, τη συγκέντρωσή τους από το δείγμα και στη συνέχεια την απομόνωση τους σε κυτταροκαλλιέργειες ή την ανίχνευσή τους με μοριακές τεχνικές.

Όσον αφορά στη συγκέντρωση των ιών από το δείγμα έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι ανάλογα με τη φύση του δείγματος και με σκοπό τη αύξησή του

τίτλου των ιών σε αυτό. Πολλές από αυτές βασίζονται στην προσρόφηση – έκλουση από φίλτρα ηλεκτραρνητικά ή ηλεκτροθετικά, αλλά τέτοιου είδους τεχνικές έχουν χαρακτηριστεί ως υψηλού κόστους και είναι πιο κατάλληλες για την ανίχνευση εντεροϊών σε μεγάλους όγκους δείγματος, κυρίως νερού (Abad et al., 1998; Crabtree et al., 1997; Katayama et al., 2002; Mocé-Llivina et al., 2002). Αντίθετα σε δείγματα που περιέχουν στερεά απόβλητα, όπως τα λύματα, θεωρούνται καταλληλότερες οι τεχνικές χημικής επεξεργασίας και φυγοκέντρωσης (Hovi et al., 2001; Shieh et al., 1997). Είναι προφανές ότι η επιτυχής ανίχνευση εντεροϊών από οποιοδήποτε τύπο περιβαλλοντικού δείγματος απαιτεί μία αποτελεσματική διαδικασία συγκέντρωσης.

Στην παρούσα διατριβή συγκρίθηκαν τρεις μέθοδοι συγκέντρωσης εντεροϊών από περιβαλλοντικά δείγματα: α) η μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων, β) η μέθοδος καθίζησης με PEG και γ) η μέθοδος προσρόφησης - έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα. Αρχικά, οι τρεις τεχνικές συγκρίθηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε αποστειρωμένο νερό, στο οποίο ενοφθαλμίστηκαν γνωστές ποσότητες από το εμβολιακό στέλεχος πολιοϊού Sabin2. Η μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων και η μέθοδος προσρόφησης - έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα απεδείχθησαν πιο αποτελεσματικές από ότι η καθίζηση με PEG στη συγκέντρωση εντεροϊών με δυνατότητα ανίχνευσης 0,1 TCID₅₀/ 0,1ml αρχικού δείγματος. Η μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων έχει επίσης αποδειχθεί ότι υπερτερεί από τη μέθοδο καθίζησης με PEG και σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση εμβολιακού στελέχους πολιοϊού τύπου 1 σε λύματα στο Ελσίνκι (Hovi et al., 2001). Επιπλέον, έλεγχος ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε για την κάθε τεχνική και σε περιβαλλοντικά δείγματα, με τις τιμές ευαισθησίας να μην παρουσιάζουν ομοιότητα για όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην παρουσία τοξικών και ανασταλτικών παραγόντων, διαφορετικών σε κάθε περιβαλλοντικό δείγμα. Το 1999, οι Manor et al. κατέγραψαν ότι τα αστικά λύματα τα οποία αποτελούνται από οικιακά απόβλητα και αναμιγνύονται με απόβλητα από βιομηχανικές περιοχές στο δίκτυο αποχέτευσης, είναι δυνατό να περιέχουν τοξικούς παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ανίχνευση των ιών (Manor et al., 1999).

Με βάση την ευαισθησία που κατέδειξαν οι τρεις τεχνικές συγκέντρωσης σε αποστειρωμένο νερό και σε περιβαλλοντικά δείγματα, η μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων και η μέθοδος προσρόφησης – έκλουσης από ηλεκτραρνητικά

φίλτρα επιλέχθηκαν για την εφαρμογή σε δείγματα αστικών λυμάτων και βοθρολυμάτων από βιολογικούς καθαρισμούς της Λάρισας, των Τρικάλων και του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου των Ιωαννίνων, καθώς και σε δείγματα νερού από τον Πηνειό ποταμό. Για την ανίχνευση των εντεροϊών στα συγκεντρωμένα δείγματα εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι της κυτταροκαλλιέργειας και της semi-nested PCR. Σε κάθε δείγμα λυμάτων εφαρμόστηκαν τρεις διαδικασίες, η 2psm-cc (2 phase separation method-cell culture), η 2psm-snPCR (2 phase separation method-semi nested PCR) και η enF-snPCR (electronegative Filter-semi nested PCR).

Συγκρίνοντας τις διαδικασίες enF-snPCR και 2psm-snPCR, φαίνεται ότι η συγκέντρωση των εντεροϊών από λύματα με τη χρήση των ηλεκτραρνητικών φίλτρων είναι πιο αποτελεσματική από τη μέθοδο διαχωρισμού δύο φάσεων. Άλλωστε, λόγω της μικρής συγκέντρωσης των ιών σε υδάτινα περιβάλλοντα, μέθοδοι συγκέντρωσης με ηλεκτραρνητικά φίλτρα είναι πιο αποδοτικές για τη επεξεργασία μεγάλων όγκων δείγματος (Lodder et al., 2005; Ehlers et al., 2005; Haramoto et al., 2007). Εντούτοις, μέθοδοι με φίλτρα δεν ενδείκνυνται για την επεξεργασία λυμάτων που περιέχουν στερεά απόβλητα, λόγω της γρήγορης φραγής των πόρων του φίλτρου, παρέχοντας καλύτερα αποτελέσματα οι χημικές μέθοδοι (Tsai et al., 1993; Shieh et al., 1997).

Όσον αφορά την ανίχνευση των ιών, εφαρμόστηκαν η απομόνωση των ιών σε κυτταροκαλλιέργειες και η semi nested PCR. Συγκρίνοντας τις διαδικασίες 2psm-cc και 2psm-snPCR, η εφαρμογή της semi nested PCR αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική για την ανίχνευση εντεροϊών στα συγκεντρωμένα δείγματα, σε σχέση με τις κυτταροκαλλιέργειες. Ωστόσο, η τεχνική της καλλιέργειας των ιών σε διάφορες κυτταρικές σειρές, όπου η παρουσία τους καθορίζεται από τη δημιουργία κυτταροπαθογόνου φαινομένου (CPE) (Ehlers et al., 2005), αποτελεί την παραδοσιακή μέθοδο για τη διάκριση μολυσματικών και μη μολυσματικών ικών σωματιδίων, για την απομόνωση τους, καθώς και για τον έλεγχο της μολυσματικότητάς τους σε περιβαλλοντικά δείγματα (Fong and Lipp, 2005). Επίσης, οι Hovi και συν. (Hovi et al., 2005), συγκρίνοντας τις κυτταροκαλλιέργειες με την RT-PCR για την ανίχνευση εντεροϊών σε λύματα, υποστήριξαν ότι ο πολλαπλασιασμός του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία. Εντούτοις, η απομόνωση ιών από περιβαλλοντικά δείγματα με τη χρήση κυτταροκαλλιέργειών είναι χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία. Απαιτεί ημέρες έως και εβδομάδες για την επιβεβαίωση ενός θετικού

ή και αρνητικού αποτελέσματος. Επιπλέον, δεν υπάρχει μια κυτταρική σειρά η οποία να μπορεί να πολλαπλασιάζει όλους τους οροτύπους εντεροϊών, καθώς αρκετοί ιοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν ή αναπτύσσονται πολύ αργά σε κυτταρικές σειρές. Έχει παρατηρηθεί από τους Shieh και συν. (Shieh et al., 1997) ότι κατά τον ενοφθαλμισμό περιβαλλοντικών δειγμάτων σε κυτταρικές σειρές ανιχνεύτηκαν διαφορετικοί ορότυποι εντεροϊών από αυτούς που ανιχνεύτηκαν με την εφαρμογή της PCR. Άλλωστε, με τον ενοφθαλμισμό σε κυτταροκαλλιέργεια ενός περιβαλλοντικού δείγματος θα αυξηθεί ο τίτλος εκείνου του ορότυπου, που πολλαπλασιάζεται πιο εύκολα στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, σε σχέση με άλλους οροτύπους που μπορεί να είναι παρόντες στο ίδιο δείγμα. Τέλος, κύριο μειονέκτημα των κυτταροκαλλιεργειών είναι η παρουσία τοξικών παραγόντων και βακτηρίων που δημιουργεί δυσκολίες στον πολλαπλασιασμό των ιών και την επιβίωση των κυττάρων και εμφανιζόμενη ως CPE μπορεί να παρουσιάσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η επεξεργασία των δειγμάτων με μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών και χλωροφορμίου μπορεί να είναι αποτελεσματικές για την καταστολή των βακτηρίων, αλλά όχι και για την αντιμετώπιση φαινομένων τοξικότητας.

Η τεχνική της PCR είναι πιο αποτελεσματική στην ανίχνευση γενωμάτων εντεροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα και προσφέρει πλεονεκτήματα σε σχέση με την απομόνωση σε κυτταροκαλλιέργειες. Είναι πιο γρήγορη, πιο ευαίσθητη και πιο ειδική. Η μέθοδος αυτή είναι ικανή να ανιχνεύει ιούς που βρίσκονται είτε σε μικρές συγκεντρώσεις είτε δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε κυτταρικές σειρές είτε είναι ανίκανοι να προκαλέσουν CPE (Chapron et al., 2000; Lee and Jeong, 2004; Fong and Lipp, 2005). Άλλωστε, η υψηλή ευαισθησία τεχνικών βασιζόμενων στην PCR καθιστά τις κυτταροκαλλιέργειες αδύναμες στην αποτίμηση του πραγματικού μεγέθους μόλυνσης σε περιβαλλοντικά δείγματα. Οι Borchardt και συν. (Borchardt et al., 2003) ανίχνευσαν εντερικούς ιούς (εντεροϊούς, νοροϊούς, ιούς ηπατίτιδας Α) σε ποσοστό 8% των δειγμάτων οικιακών λυμάτων, ενώ δεν ανιχνεύτηκε κανένας ιός με τη χρήση κυτταροκαλλιεργειών. Οι δυνατότητες της κλασσικής PCR στην ανίχνευση εντεροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα έχουν βελτιωθεί με την ανάπτυξη τεχνικών όπως η nested PCR, η real time PCR και η multiplex PCR (Fong and Lipp, 2005, Ehlers et al., 2005, Gregory et al., 2006, Fout et al., 2003). Το κύριο μειονέκτημα των μοριακών τεχνικών είναι ότι αποτυγχάνουν στη διάκριση των

μολυσματικών και μη μολυσματικών ικών σωματιδίων, πληροφορία αρκετά σημαντική για τον έλεγχο μόλυνσης και την επιβίωση των ιών στο περιβάλλον (Abad et al., 1997).

Οι μοριακές τεχνικές μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την παρουσία ιών στο περιβάλλον και ως εκ τούτου για την κυκλοφορία τους σε ένα πληθυσμό, όμως απαιτούνται και επιπλέον στοιχεία και για να καθοριστούν οι κίνδυνοι για την υγεία. Διακρίνοντας τη σχέση μεταξύ της παρουσίας ενός ιού (η οποία καθορίζεται από μοριακές μεθόδους) και της μολυσματικότητάς του (η οποία καθορίζεται από το CPE σε κυτταροκαλλιέργειες), είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται μοριακά στοιχεία για την προστασία της δημόσιας υγείας. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αποικοδόμηση των ικών γενωμάτων (κυρίως του RNA) συσχετίζεται με την απώλεια μολυσματικότητας του ιού, ακόμη και σε περιπτώσεις όπου το ικό γένωμα είναι πιο ανθεκτικό από τον ίδιο τον ιό (Skraber et al., 2004). Είναι γνωστό ότι το RNA αποικοδομείται γρήγορα σε σχέση με το DNA και ιοί οι οποίοι δεν είναι μολυσματικοί, λόγω καταστροφής του καψιδίου και επομένως και του RNA, δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν ούτε με κυτταροκαλλιέργειες ούτε με RT-PCR. Οι Tsai και συν. (Tsai et al., 1995) έδειξαν ότι RNA των εντεροϊών δεν μπορούσε να ανιχνευτεί με μοριακές μεθόδους μετά από δυο ημέρες επώασης στους 4 °C και στους 23 °C σε μη επεξεργασμένο θαλασσινό νερό. Οι Skraber και συν. (Skraber et al., 2004) παρατήρησαν ότι αν και το γένωμα του πολιοϊού τύπου 1 είναι πιο ανθεκτικό από το μολυσματικό ιό, η αδυναμία ανίχνευσης του ιικού RNA είναι άμεσα συνδεδεμένη με την εξαφάνιση του μολυσματικού ιού, προτείνοντας ότι, το ικό νουκλεϊκό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης μολυσματικών ιών σε υδάτινα περιβάλλοντα.

Όσον αφορά στο ποσοστό των θετικών δειγμάτων, στην παρούσα εργασία ανιχνεύτηκαν εντεροϊοί στο 30,4% των δειγμάτων μη επεξεργασμένων λυμάτων. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται μεγαλύτερα ποσοστά απομόνωσης εντεροϊών από περιβαλλοντικά δείγματα. Οι Ehlers και συν. (Ehlers et al., 2005) ανίχνευσαν εντεροϊούς σε μη επεξεργασμένα λύματα στη Νότια Αφρική σε ποσοστό 42,5%, ενώ στη Γερμανία οι Pusch και συν. (Pusch et al., 2005) ανίχνευσαν εντεροϊούς σε ποσοστό 26-76% των δειγμάτων, ανάλογα με την περιοχή συλλογής του δείγματος. Σε μελέτη που έγινε σε περιβαλλοντικά δείγματα σε διάφορες περιοχές στο Ισραήλ και στη λωρίδα της Γάζας, ανιχνεύτηκαν αγρίου τύπου πολιοϊοί σε διαφορετικά ποσοστά για κάθε περιοχή (Manor et al., 1999). Τα υψηλότερα

ποσοστά εντεροϊών ανιχνεύθηκαν σε δείγματα από περιοχές με χαμηλές συνθήκες υγιεινής και χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο. Το συμπέρασμα όμως ότι δεν κυκλοφορούν εντεροϊοί στις ανεπτυγμένες κοινωνίες είναι παραπλανητικό. Οι διαφορές στα ποσοστά των απομονωθέντων εντεροϊών μπορεί να οφείλεται στο τύπο του συστήματος αποχέτευσης, καθώς επίσης και στο περιεχόμενο των αστικών λυμάτων: σε πόλεις με καλά οργανωμένο σύστημα επεξεργασίας αποβλήτων παρατηρείται αραίωση των οικιακών λυμάτων με τα τοξικά απόβλητα των βιομηχανιών.

Τα περιβαλλοντικά δείγματα τα οποία βρέθηκαν θετικά για εντεροϊούς προέρχονται κυρίως από δειγματοληψίες που έγιναν τους θερινούς μήνες και πιο συγκεκριμένα από το Μάιο έως και τον Οκτώβριο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με το γενικό κανόνα, κατά τον οποίο η απομόνωση των εντεροϊών από περιβαλλοντικά δείγματα είναι συχνότερη κατά τους θερινούς και φθινοπωρινούς μήνες (Deshpande et al., 2003; Fong et al., 2005), αντικατοπτρίζοντας την αυξημένη κυκλοφορία τους στον πληθυσμό τη συγκεκριμένη περίοδο. Εντούτοις, υπάρχουν μελέτες που παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά απομόνωσης εντεροϊών από το περιβάλλον τους χειμερινούς μήνες, λόγω της ιδιότητάς τους να διατηρούνται καλύτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες (Ehler et al., 2005).

Εννέα στελέχη εντεροϊών απομονώθηκαν με τη μέθοδο 2psm-cc, δύο από τον Πηνειό ποταμό και επτά από αστικά λύματα από το βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας, τα οποία και ταυτοποιήθηκαν μοριακά. Τα στελέχη που απομονώθηκαν κατατάσσονται στους ορότυπους E3, E6 και E7. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία επισημαίνεται η ανάγκη επιτήρησης του περιβάλλοντος για την κυκλοφορία εμβολιακών και άγριων στελεχών πολιοϊών σε έναν πληθυσμό (Manor et al., 1999; Divizia et al., 1999; Hovi et al., 2001; Hovi et al., 2005). Αν και μη-πόλιο εντεροϊοί έχουν απομονωθεί από το περιβάλλον (Shieh et al., 1997; Shieh et al., 2003; Sedmak et al., 2005), ελάχιστα είναι τα περιβαλλοντικά στελέχη τα οποία έχουν μελετηθεί και για τα οποία υπάρχουν κατατεθειμένες αλληλουχίες (Bolanaki et al., 2005b, Lukashev et al., 2005).

4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ Kats, Hal ΚΑΙ Kar

Στο συγκεκριμένο τμήμα της διατριβής παρουσιάζεται η μελέτη τριών αγρίων στελεχών πολιοϊών τύπου 1 (PV1), Kats, Hal και Kar, τα οποία απομονώθηκαν από περιστατικά οξείας χαλαρής παράλυσης, προερχόμενα από μη εμβολιασμένα παιδιά αθίγγανων. Η αρχική απομόνωση των στελεχών πραγματοποιήθηκε το 1996, την ίδια περίοδο που στην Αλβανία υπήρχε επιδημία πολιομυελίτιδας από μη ανασυνδυασμένο στέλεχος πολιοϊού αγρίου τύπου 1 (Fiore et al., 1998, Marturano J. and Fiore L. 2002). Μάλιστα, το υπεύθυνο για την επιδημία στέλεχος απομονώθηκε από το Λάνα ποταμό, στην περιοχή των Τιράνων, δύο μήνες πριν το πρώτο περιστατικό χαλαρής παράλυσης (Divizia et al., 1999). Στην ίδια μελέτη σε περιβαλλοντικά δείγματα απομονώθηκαν ανασυνδυασμένα εμβολιακά στελέχη πολιοϊών.

Τα στελέχη Kats, Hal και Kar αποτελούν τα τελευταία στελέχη αγρίου τύπου πολιοϊών που απομονώθηκαν στην Ελλάδα. Αλληλουχήθηκαν πλήρως εφτά περιοχές, οι VP2-2C, 3B, 3D και τμήματα των περιοχών 5'UTR, VP4, 3A, 3C και 3' UTR. Η νουκλεοτιδική σύγκριση των στελεχών Kats, Hal και Kar ανέδειξε ομοιότητα 99%-100% και στις δεκατρείς γενωμικές περιοχές που μελετήθηκαν. Η υψηλή αυτή ομοιότητα δηλώνει ότι και από τα τρία περιστατικά απομονώθηκε ο ίδιος γονότυπος PV1.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε η νουκλεοτιδική και αμινοξική σύγκριση των τριών στελεχών με το πρότυπο στέλεχος PV1 Mahoney καθώς και με το εμβολιακό στέλεχος Sabin1. Η νουκλεοτιδική ομοιότητα στην καψιδική περιοχή VP1 ήταν 81%, αρκετή για να κατατάξει τα στελέχη στον ίδιο ορότυπο (Oberste et al., 2003). Η νουκλεοτιδική σύγκριση της VP1 γενωμικής περιοχής των Kats, Hal και Kar με το εμβολιακό στέλεχος Sabin1, έδειξε διαφορά 19%, μεγαλύτερη του ορίου 15%, που προτείνεται από την ΠΟΥ, επιβεβαιώνοντας ότι πρόκειται για στελέχη αγρίου τύπου (WHO 2001). Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της VP1 των τριών ελληνικών στελεχών με το πρότυπο στέλεχος Mahoney ανέδειξε ομοιότητα 96% , πιστοποιώντας την ανάγκη διατήρησης των πρωτεϊνικών δομών.

Η αναζήτηση στη βάση δεδομένων αλληλουχιών που να παρουσιάζουν ομολογία με τα τρία στελέχη, οδήγησε σε στελέχη PV1 αγρίου τύπου που απομονώθηκαν από την επιδημία της Αλβανίας την ίδια χρονική περίοδο. Η νουκλεοτιδική ομοιότητα μεταξύ των ελληνικών και αλβανικών στελεχών είναι

95%-100% στις διάφορες γενομικές περιοχές. Στα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν σε όλες τις γενομικές περιοχές παρουσιάζεται η στενή σχέση μεταξύ των ελληνικών και αλβανικών στελεχών, καθώς και η ομαδοποίηση του cluster της επιδημίας του 1996 με στελέχη PV1, τα οποία απομονώθηκαν στην Κίνα την περίοδο 1991-1993, παρέχοντας αποδείξεις για την προέλευσή τους. Τα στελέχη Kats, Hal και Kar προέρχονται από την επιδημία πολιοιού τύπου 1 στην Αλβανία το 1996. Άλλωστε έχει αναφερθεί και στην εργασία των Fiore και συν. (Fiore et al., 1998), ότι το στέλεχος που προκάλεσε την συγκεκριμένη επιδημία πέρασε και σε γειτονικές χώρες της Αλβανίας, όπως η Γιουγκοσλαβία και η Ελλάδα.

Επίσης, η μελέτη των επιδημικών στελεχών της Αλβανίας από τους Fiore και συν. (Fiore et al., 1998) έδειξε τη συσχέτισή τους με στελέχη PV1 που κυκλοφόρησαν στο Πακιστάν το 1995. Η νουκλεοτιδική ομοιότητα μεταξύ των αλβανικών και πακιστανικών στελεχών στη VP1-2A γενομική περιοχή είναι 95%. Η μεγάλη αυτή ομολογία οδήγησε στην υπόθεση ότι ο ιός ενδεχομένως να προήλθε από το Πακιστάν, χωρίς όμως να αποδεικνύεται κάτι τέτοιο. Φυσικά, δεν μπορεί να εξαιρεθεί και η πιθανότητα ο ιός να κυκλοφορούσε στην χώρα συντηρούμενος από ένα όχι καλό πρόγραμμα εμβολιασμού. Οι μεγάλες και αιφνίδιες μετακινήσεις πληθυσμών που ακολούθησαν μετά το άνοιγμα των συνόρων το 1991 ενδεχομένως να οδήγησαν στην είσοδο του ιού στην Αλβανία και από εκεί στην Ελλάδα, από χώρες όπου δεν ήταν απαλλαγμένες από τους πολιοιούς. Το γεγονός, επίσης, ότι η Αλβανία είναι μια χώρα με φτωχό σύστημα αποχέτευσης πιθανόν βοήθησε στην εξάπλωση του ιού στον πληθυσμό (Offerhaus L., 1991).

Η αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών με αυτές των δικών μας στελεχών στην GenBank σε ορισμένες γενομικές περιοχές, εκτός από την ομοιότητα με τα αλβανικά στελέχη, οδήγησε στην ομοιότητα με στελέχη αγρίου τύπου πολιοιού 1 που είχαν κυκλοφορήσει σε χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης (Ουκρανία, Τατζικιστάν, Τσετσενία, Ουζμπεκιστάν) την περίοδο 1991-1995 (Gavrilin et al., 2000). Η νουκλεοτιδική ομοιότητα αυτή είναι της τάξης του 90%-92% σε τμήμα της VP1 γενομικής περιοχής. Τα στελέχη αυτά εμφανίζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους και έχει θεωρηθεί ότι ανήκουν στον ίδιο γονότυπο που συσχετίζεται με τη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή, (γεώτυπος T) (Lipskaya et al., 1995). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στον ίδιο γεώτυπο ανήκουν και

στελέχη, τα οποία απομονώθηκαν στο Πακιστάν το 1995 (Gavrilin et al., 2000), ενισχύοντας την άποψη ότι το στέλεχος που προκάλεσε την επιδημία στην Αλβανία το 1996 και πέρασε και στην Ελλάδα, ενδεχομένως να προέρχεται από τα στελέχη του T γεώτυπου ή να έχει κοινό πρόγονο με αυτά. Σύμφωνα με τα παραπάνω, δεν αποκλείεται η πιθανή επιδημιολογική εξάπλωση του ιού από την Κίνα μέσω Πακιστάν στην Ανατολική Ευρώπη.

Η SimPlot ανάλυση των Kats, Hal και Kar εμφανίζει μια περιοχή 200 νουκλεοτιδίων περίπου στη VP2 γενωμική περιοχή, όπου η ομοιότητα των ελληνικών στελεχών με τα αλβανικά πέφτει στο 78%. Το αποτέλεσμα αυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον γιατί οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το τμήμα των 200nt της VP2 περιοχής προέρχεται από ανασυνδυασμό. Στη SimPlot ανάλυση παρουσιάζεται επίσης άλλη μια περιοχή 240nt στη VP1, όπου υπάρχει απότομη αλλαγή στην ομοιότητα (92%) των ελληνικών και αλβανικών στελεχών. Η νουκλεοτιδική αυτή διαφορά του 8% δεν είναι δυνατό να οφείλεται στη συσσώρευση μεταλλάξεων, εφόσον τα ελληνικά με τα αλβανικά στελέχη κυκλοφόρησαν την ίδια περίοδο και ο ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων κατά τη διάρκεια επιδημίας στη VP1 περιοχή έχει υπολογιστεί στο 1-2% ανά χρόνο (Kinnunen et al., 1990). Φαινόμενα ανασυνδυασμού μεταξύ στελεχών πολιοϊών εντοπίζονται κυρίως στη μη καψιδιακή περιοχή του γονιδιώματός τους (Georgopoulou and Markoulatos, 2000; Cuervo et al., 2001; Karakasiliotis et al., 2004; Paximadi et al., 2006; Paximadi et al., 2007). Ανταλλαγές γενετικού υλικού στην καψιδιακή περιοχή παρουσιάζονται σπάνια, εντοπιζόμενοι στη VP1 (Martin et al., 2002, Blomqvist et al., 2003, Dedepsidis et al., 2008), ενώ ανασυνδυασμός στη VP2 περιοχή δεν έχει αναφερθεί άλλοτε στη βιβλιογραφία.

Η αναζήτηση στη GenBank αλληλουχιών παρόμοιων με αυτή του τμήματος των 200nt αποκάλυψε μέγιστη ομοιότητα (81%) με το στέλεχος PV1, CHN-Yunnan/92, που απομονώθηκε στην Κίνα το 1991. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1 η ομοιότητα των ελληνικών και του κινέζικου στελέχους κυμαίνεται μεταξύ 67-88% στις διάφορες γενωμικές περιοχές. Η περιοχή στην οποία η ομοιότητα με το CHN-Yunnan/92 ξεπερνά την ομοιότητα με το αλβανικό στέλεχος είναι η περιοχή των 200nt στη VP2. Αν και οι πληροφορίες αυτές επιβεβαιώνουν τον ανασυνδυασμό στη VP2 γενωμική περιοχή, η νουκλεοτιδική ομοιότητα του 81% δεν είναι αρκετή για να καταδείξει το κινέζικο στέλεχος ως το δότη της

παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας. Ενδεχομένως ο δότης να είναι απόγονος του στελέχους που κυκλοφόρησε στην Κίνα.

Όσον αφορά στη φυλογενετική σχέση των τριών στελεχών με τα πρότυπα στελέχη των εντεροϊών, αξίζει να σημειωθεί ότι και στις τέσσερις καψιδιακές περιοχές τα φυλογενετικά δέντρα έδειξαν ταξινόμηση των εντεροϊών με βάση τον ορότυπό τους (εικόνες 3.2-3.5). Αντίθετα, στις λειτουργικές περιοχές (εικόνες 3.6-3.12) η σχέση γονοτύπου-οροτύπου διακόπτεται και παρατηρείται ταξινόμηση με βάση τις ομάδες των εντεροϊών σύμφωνα και με το πιο πρόσφατο σύστημα ταξινόμησής τους (King et al., 2000). Επομένως, σύμφωνα και με τις εικόνες 3.6-3.12, οι CAV2, CAV12, και CAV16 ομαδοποιούνται μαζί εκπροσωπώντας την ομάδα Α των εντεροϊών, οι CAV9, CBV5 και E9 συγκροτούν την ομάδα Β και ο EV70 εμφανίζεται πάντα απομονωμένος συνιστώντας την ομάδα D. Επιπλέον, τα πρότυπα και κλινικά στελέχη των πολιοϊών ομαδοποιούνται σε όλες τις λειτουργικές περιοχές με τους εντεροϊούς της ομάδας C, ενισχύοντας την άποψη ότι οι πολιοϊοί έχουν πολλές ομοιότητες με τους εντεροϊούς της συγκεκριμένης ομάδας. Το γεγονός μάλιστα ότι οι πολιοϊοί διαφέρουν από τα μέλη της ομάδας C μόνο στην καψιδιακή περιοχή, οδήγησε στην άποψη ότι ο γενετικός ανασυνδυασμός έχει διαδραματίσει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη εξέλιξή τους καθώς και στην ανάγκη αναθεώρησης του συστήματος ταξινόμησης των εντεροϊών, όπου πλέον οι πολιοϊοί εντάχθηκαν στην ομάδα των HEVC (Brown et al., 2003).

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα στελέχη Kats, Hal και Kar απομονώθηκαν από μη εμβολιασμένα παιδιά αθίγγανων, μέλη μιας ομάδας πληθυσμού με φτωχή υγιεινή. Τέτοιου είδους ομάδες, ατόμων που έχουν ξεφύγει του εφαρμοζόμενου προγράμματος εμβολιασμού, θεωρούνται υψηλού κινδύνου για την είσοδο και την εξάπλωση ενός άγριου στελέχους σε μια χώρα, όπως η Ελλάδα, απαλλαγμένη των πολιοϊών. Το γεγονός μάλιστα ότι κατά τη διάρκεια της επιδημίας στην Αλβανία δεν αναφέρθηκε κανένα κρούσμα πολιομυελίτιδας στην Ιταλία, μια χώρα με πολύ καλό σχέδιο εμβολιασμού, παρόλο το μεγάλο μεταναστευτικό κύμα των Αλβανών προς τη χώρα αυτή, οδηγεί στην ανάγκη για την εφαρμογή ενός πολύ καλού προγράμματος εμβολιασμού, ακόμα και σε χώρες οι οποίες δεν φαίνεται να κινδυνεύουν άμεσα από επιδημίες με πολιοϊό.

Η μοριακή ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος των πολιοϊών, και όχι μόνο της VP1 περιοχής, όπως προτείνει η ΠΟΥ (WHO 2001) καθώς και ο

χαρακτηρισμός μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών, αποτελούν αναγκαία προϋπόθεση για την αναγνώριση νέων στελεχών με αυξημένη νευρομολυσματικότητα, στα πλαίσια μιας πιο αποτελεσματικής εποπτείας της πολιομυελίτιδας. Αν και τα τελευταία χρόνια έχουν περιοριστεί τα κρούσματα πολιομυελίτιδας, κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες, οι πιο πρόσφατες επιδημίες στην Αλβανία το 1996 (Prevots et al., 1998), στην Ινδία το 2000 (Kohler et al., 2003), στην Βουλγαρία το 2001 (Kojouharova et al., 2003), στη Νιγηρία και το Σουδάν το 2004 (CDC 2005) αποτελούν μια προειδοποίηση για πιο στενή παρακολούθηση για την επίτευξη του στόχου των μηδέν κρουσμάτων πολιομυελίτιδας. Η ανίχνευση μάλιστα πολιοϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα δύο μήνες πριν το πρώτο περιστατικό χαλαρής παράλυσης στην Αλβανία (Divizia et al., 1999) και τρεις μήνες πριν την απομόνωση από περιστατικό πολιομυελίτιδας στην Ινδία (Desphande et al., 2003), οδηγούν στην ανάγκη επίβλεψης του περιβάλλοντος για την αναγνώριση και μελέτη στελεχών που κυκλοφορούν στον πληθυσμό.

4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LR11F7

Τον Ιούλιο του 2005 απομονώθηκαν από τον Πηνειό ποταμό δυο στελέχη και από το βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας έξι στελέχη εντεροϊών. Η υψηλή νουκλεοτιδική ομοιότητα (99-100%) της VP1 γενωμικής περιοχής μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα στελέχη αυτά μοιράζονται τον ίδιο γονότυπο και ως εκ τούτου, ότι ο ίδιος ιός απομονώθηκε από τα αστικά λύματα και από τον Πηνειό στην περιοχή της Λάρισας. Για το λόγο αυτό αλληλουχήθηκε σε ολόκληρο το γένωμα το στέλεχος LR11F7.

Για τον χαρακτηρισμό του LR11F7 συγκρίθηκε η νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία της VP1 περιοχής με την αντίστοιχη των πρότυπων στελεχών των εντεροϊών. Η σύγκριση αυτή έδειξε 78% νουκλεοτιδική και 93% αμινοξική ομοιότητα με το πρότυπο στέλεχος E7 Wallace. Σύμφωνα με την τάση των τελευταίων ετών, δηλαδή ότι η κατάταξη ενός εντεροϊού βασίζεται στο κριτήριο της ομοιότητας >75% (και >85% αμινοξικής) της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της VP1 με αυτή του πρότυπου στελέχους, το LR11F7 ανήκει στον ορότυπο E7 (Oberste et al., 1999). Στο φυλογενετικό δέντρο για τη VP1 (εικόνα 3.17) το στέλεχος LR11F7 ταξινομείται με το πρότυπο στέλεχος E7. Η γενετική

απόσταση μεταξύ των δύο ιών είναι 25,3%, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, που υποστηρίζουν ως μέγιστη απόκλιση το 25% με το πρότυπο στέλεχος (Oberste et al., 2003). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει το στέλεχος LR11F7 ως ένα νέο τύπο εντεροϊού, σχετιζόμενο με τον ορότυπο E7.

Για την επιδημιολογική συσχέτιση του LR11F7 με άλλα στελέχη E7, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο σε τμήμα της VP1 γενωμικής περιοχής (εικόνα 3.26). Από την φυλογενετική ανάλυση είναι εμφανής η συσχέτιση των ελληνικών στελεχών με E7 ιούς που απομονώθηκαν στην Κίνα την περίοδο 1997-2000 και όχι με στελέχη τα οποία κυκλοφόρησαν σε περιοχές πιο κοντινές στην Ελλάδα. Εντούτοις, τα ελληνικά στελέχη δεν παρουσιάζουν υψηλή ομοιότητα με τα κινέζικα στελέχη αλλά ούτε με κάποιο άλλο στέλεχος του οποίου η αλληλουχία είναι κατατεθειμένη στη GenBank. Βασιζόμενοι στη φυλογενετική ανάλυση σε τμήμα της VP1 μπορούμε να υποθέσουμε την προέλευση του LR11F7 από ένα στέλεχος, το οποίο κυκλοφόρησε στην Κίνα μερικά χρόνια πριν. Ο αριθμός κατατεθειμένων αλληλουχιών E7 ιών, ακόμα και στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος, είναι εξαιρετικά μικρός, ώστε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την επιδημιολογική συσχέτιση με άλλους εντεροϊούς.

Όσον αφορά στη φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε γενωμική περιοχή, το LR11F7 φαίνεται να υπακούει στο γενικό κανόνα για τους εντεροϊούς που αφορά τη διακοπή της συσχέτισης γενοτύπου-οροτύπου, που εμφανίζεται στην καψιδιακή περιοχή, σε περιοχές που κωδικοποιούν για τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού (Lindberg et al., 2003; Bolanaki et al., 2005b; Lukashev et al., 2005; Kottaridi et al., 2006). Σε αντίθεση με προηγούμενες φυλογενετικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στις μη δομικές περιοχές του γενώματος σύγχρονων στελεχών HEVB εντεροϊών (Lukashev et al., 2003; Lukashev et al., 2005; Bolanaki et al., 2007; Kottaridi et al., 2007), και αναδεικνύουν φυλογενετικές σχέσεις με τα πρότυπα στελέχη E30, E1 και E9, το στέλεχος LR11F7 ομαδοποιείται με σύγχρονους εντεροϊούς. Μάλιστα, όλοι αναφέρονται απομονωμένοι από την Νότια Ασία μετά το 2000. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η 2A γενωμική περιοχή, στην οποία το LR11F7 ομαδοποιείται με πρότυπα στελέχη εντεροϊών HEVB, των οποίων η απομόνωση πραγματοποιήθηκε πριν το 1960. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανώς να καταδεικνύουν την διαφορετική εξελικτική πίεση στη 2A γενωμική περιοχή σε σχέση με τις άλλες μη καψιδιακές περιοχές, υπόθεση που έχει προταθεί εκτός από τη 2A και για τις περιοχές 2B και

2C (Bolanaki et al., 2006). Ωστόσο, δεν μπορούν να αποκλειστούν φαινόμενα γενετικού ανασυνδυασμού με κοινούς προγόνους των σύγχρονων στελεχών. Είναι πιθανόν τα ανασυνδυασμένα στελέχη να ακολούθησαν διαφορετικά εξελικτικά μονοπάτια, ερμηνεύοντας έτσι τη στενή φυλογενετική σχέση με τα πρότυπα στελέχη στο συγκεκριμένο τμήμα του γονιδιώματος.

Όπως παρουσιάζεται και στη SimPlot ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος του LR11F7, η P2 και P3 περιοχές είναι συντηρημένες μεταξύ των εντεροϊών του ίδιου είδους (Brown et al., 2003; Oberste et al., 2004). Από τη φυλογενετική ανάλυση είναι εμφανής η συσχέτιση του LR11F7 στις λειτουργικές περιοχές του γονιδιώματος με σύγχρονα στελέχη εντεροϊών (EV74, EV85, EV86 και EV100), τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως νέοι τύποι εντεροϊών HEVB (Oberste et al., 2007). Επιπρόσθετα, το LR11F7 φαίνεται να μοιράζεται την 3A-3B-5' άκρο της 3C με το στέλεχος NH95-0601 και τμήμα της 3D με τον εντεροϊό EV86, στελέχη που επίσης έχουν χαρακτηριστεί ως νέοι τύποι εντεροϊών, απομονωμένοι και οι δύο στη Νότια Ασία.

Από την ανάλυση του γονιδιώματος του LR11F7, προτείνεται ως πιθανή προέλευσή του η Νότια Ασία. Φαίνεται ότι έντονα εξελικτικά γεγονότα έχουν λάβει χώρα στη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή. Η ανάμιξη των γονιδιωμάτων στελεχών διαφορετικών οροτύπων της περιοχής, πιθανόν οδήγησε στη δημιουργία νέου στελέχους, το οποίο κατά την πορεία του προς την Ελλάδα απέκτησε τη δική του εξελικτική ιστορία. Η φυλογενετική ανάλυση των διάφορων περιοχών του γονιδιώματος έχει αναδείξει ανεξάρτητη εξέλιξη των δομικών και λειτουργικών γενωμικών τμημάτων. Τα κυκλοφορούντα στελέχη των εντεροϊών φαίνεται να αποτελούνται από έναν πληθυσμό οροτυπικά διακριτών καινιδιακών περιοχών, οι οποίες συνδυάζονται ελεύθερα με μια πληθώρα λειτουργικών γονιδίων. Επιπλέον, μελέτες ολόκληρου του γονιδιώματος ανασυνδυασμένων E11 στελεχών, ανέδειξαν διαφορές στην παθογένεια συσχετιζόμενες με μεταλλάξεις στις 5' UTR και VP1 γενωμικές περιοχές (El-Sageyer et al., 1998; Chevalier et al. 2004). Η κατανόηση των μηχανισμών εξέλιξης των εντεροϊών είναι απαραίτητη για τον έλεγχο της παθογένειάς τους. Με την αλληλούχιση όλο και περισσότερων ιικών γενωμάτων, διευκολύνονται οι επιδημιολογικές μελέτες στους εντεροϊούς, μελετώνται γενετικά νέα στελέχη, και ως εκ τούτου αποκαλύπτονται όλο και περισσότερα στοιχεία για την εξέλιξή τους.

4.5 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LR31G7

Στο συγκεκριμένο τμήμα της διατριβής παρουσιάζεται η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους LR31G7. Ο εντεροϊός αυτός απομονώθηκε από το βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας τον Οκτώβριο του 2005. Αλληλούχηση τμήματος της VP1 γενωμικής περιοχής κατέταξε το στέλεχος LR31G7 στον ορότυπο E3. Σύμφωνα με τα όσα γνωρίζουμε, δεν έχει αναφερθεί κυκλοφορία του συγκεκριμένου οροτύπου στην Ελλάδα. Οι πιο συχνά απομονωμένοι ορότυποι εντεροϊών στην Ελλάδα είναι οι E6, E13 και E30 στην επιδημία άσηπτης μηνιγγίτιδας του 2001 (Siafakas et al., 2004), και οι E4, E6, E9, E14, E15, E25, CAV6, CAV15, CAVA24 και CBV1 από περιστατικά εγκεφαλίτιδας και άσηπτης μηνιγγίτιδας την περίοδο 2005-2007 (Frantzidou et al., 2007; Papa et al., 2009; Logotheti et al., 2009).

Η νουκλεοτιδική σύγκριση του LR31G7 με το πρότυπο στέλεχος Morrissey και το μοναδικό πλήρως αλληλουχημένο στέλεχος E3, PicoBankDM1E3, ανέδειξε διαφορά 17%-24% και 7%-21% αντίστοιχα στις διάφορες γενωμικές περιοχές. Το ελληνικό στέλεχος φαίνεται να μοιάζει περισσότερο με το κλινικό στέλεχος PicoBankDM1E3, το οποίο απομονώθηκε στη Φιλανδία το 1998 από ασθενή με διαβήτη και έχει συσχετισθεί με τη συγκεκριμένη ασθένεια (Williams et al., 2006), παρά με το πρότυπο στέλεχος.

Η φυλογενετική ανάλυση της VP1 περιοχής (εικόνα 3.39) για την επιδημιολογική συσχέτιση του LR31G7 με άλλους E3, αποκάλυψε τη σχέση του με E3 στελέχη που κυκλοφόρησαν την ίδια χρονιά (2005) σε Ασία και Ευρώπη, υποδηλώνοντας χρονική και όχι τοπική συσχέτιση αυτών. Η στενή τους φυλογενετική σχέση μαζί με τα υψηλά ποσοστά ομοιότητας μεταξύ τους, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ίδιος ιός κυκλοφόρησε σε Ελλάδα, Γαλλία και Ιαπωνία το 2005. Σήμερα η ταχεία μετάδοση του ιού από μια περιοχή σε μια άλλη επιτρέπει την παγκόσμια κυκλοφορία του ιού ξεπερνώντας τα στενά γεωγραφικά όρια ενός πληθυσμού. Επίσης από το ίδιο φυλογενετικό δέντρο μπορούμε να υποθέσουμε την κυκλοφορία του ιού στην Ευρώπη για εφτά χρόνια περίπου, πριν αυτός περάσει στην Ασία. Ωστόσο δεν μπορούμε να έχουμε ασφαλείς υποθέσεις για την επιδημιολογική ιστορία του LR31G7, μιας και είναι λίγα τα στελέχη E3 που έχουν μελετηθεί και για τα οποία υπάρχει κατατεθειμένη αλληλουχία στη GenBank.

Στο 5' άκρο του γονιδιώματος η νουκλεοτιδική ομοιότητα του LR31G7 με το στέλεχος PicoBankDM1E3 είναι πολύ υψηλή σε σχέση με το υπόλοιπο γονιδίωμα. Η σχέση αυτή μεταξύ των δύο ιών στην 5' UTR-2A περιοχή ενισχύεται από τα αντίστοιχα φυλογενετικά δέντρα (εικόνες 3.27-3.32). Σ' αυτή την περιοχή τα δύο E3 στελέχη ταξινομούνται μαζί, και στην ίδια ομάδα με το πρότυπο στέλεχος στην καψιδιακή περιοχή, επιβεβαιώνοντας για άλλη μια φορά ότι ανήκουν στον ορότυπο E3 (Bolanaki et al., 2005b; Kottaridi et al., 2006; Mirand et al., 2006). Τα LR31G7 και PicoBankDM1E3 διαχωρίζονται στα φυλογενετικά δέντρα των περιοχών 2B-3D. Η υπόθεση στην οποία οδηγούμαστε για ανασυνδυασμό μεταξύ κυκλοφορούντων στελεχών υποστηρίζεται έντονα από την ανάλυση SimPlot (εικόνα 3.40).

Η λεπτομερής ανάλυση της περιοχής VP1-2A αποκάλυψε όχι μόνο το δότη του γενετικού υλικού αλλά, και για πρώτη φορά στους μη πόλιο εντεροϊούς, την ακριβή θέση του ανασυνδυασμού, ο οποίος εντοπίζεται στις θέσεις 3357nt-3364nt του γονιδιώματος. Στις εικόνες 3.41 και 3.42 είναι εμφανής η ανταλλαγή γενετικών περιοχών μεταξύ του E3 στελέχους PicoBankDM1E3 και του E25 στελέχους NO-519, που απομονώθηκε στη Νορβηγία το 2003. Λαμβάνοντας υπόψη ότι γενετικές ανταλλαγές γίνονται κατά την ταυτόχρονη μόλυνση ενός κυττάρου με δύο ιούς, ο ανασυνδυασμός μεταξύ των παραπάνω στελεχών είναι απίθανο να έχει συμβεί, αφού τα PicoBankDM1E3 και NO-519 απομονώθηκαν το 1998 και το 2003 αντίστοιχα. Συνεπώς, φαίνεται ότι δια-οροτυπικός ανασυνδυασμός έχει πραγματοποιηθεί πρόσφατα μεταξύ του E25 στελέχους NO-519 και κάποιου απογόνου του E3 στελέχους PicoBankDM1E3. Δεν αποκλείεται βέβαια και το ενδεχόμενο τα E3 στελέχη που κυκλοφόρησαν το 2005 σε Ευρώπη και Ασία (εικόνα 3.39) ή οι άμεσοι απόγονοί τους να αναδυνδύστηκαν με το E25 στέλεχος. Η επιβεβαίωση των παραπάνω υποθέσεων μπορεί να γίνει μόνο στην περίπτωση που κατατεθούν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες για τα στελέχη αυτά και σε άλλες γενωμικές περιοχές.

Όσον αφορά τη φυλογενετική ανάλυση όλων των περιοχών και σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Lindberg et al., 2003; Bolanaki et al., 2005b; Lukashev et al., 2005; Kottaridi et al., 2007), το LR31G7 ταξινομείται με στελέχη του ίδιου οροτύπου στις καψιδιακές περιοχές. Στα φυλογενετικά δέντρα για τις περιοχές 2A-3A παρατηρείται συσχέτιση με διαφορετικούς εντεροϊούς σε αντίθεση με τα φυλογενετικά δέντρα των περιοχών 3B-3D, όπου το LR31G7 ταξινομείται

συνεχώς με CAV9 στελέχη που απομονώθηκαν στην Κούβα την περίοδο 1999-2000. Η συνεχής φυλογενετική συσχέτιση του LR31G7 με τα κουβανέζικα CAV9 στελέχη υποδεικνύει πιθανό ανασυνδυασμό στο μακρινό παρελθόν του στελέχους μας.

Στα φυλογενετικά δέντρα για τις 2C και 3D γενωμικές περιοχές (εικόνες 3.34 και 3.38), σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες (Bolanaki et al., 2006, Kottaridi et al., 2007), καθώς και για τις 3A και 3C (εικόνες 3.35 και 3.37) τα σύγχρονα στελέχη εντεροϊών μαζί με το LR31G7 δημιουργούν μια φυλογενετική ομάδα ξεχωριστή από αυτή των πρότυπων HEVB. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την υπόθεση ότι οι 2C και 3D, και πιθανώς και οι 3A και 3C, είναι διατηρημένες μεταξύ των σύγχρονων στελεχών. Επιπλέον, στο φυλογενετικό δέντρο για την 3D το στέλεχος LR31G7 μαζί με πρόσφατα απομονωμένα στελέχη ταξινομούνται στη φυλογενετική ομάδα του E1. Εντούτοις, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Oprişan et al., 2002, Lukashev et al. 2003, Lukashev et al., 2005), στελέχη που ταξινομούνται με το E1 στην 3D προέρχονται κυρίως από τη δεκαετία του 1980.

Το φαινόμενο του ανασυνδυασμού έχει μελετηθεί εκτενώς στους πολιοϊούς (Georgopoulou and Markoulatos, 2001; Dahourou et al., 2002; Guillot et al., 2000; Karakasiliotis et al., 2005; Paximadi et al., 2006). Τα τελευταία χρόνια η προσοχή έχει στραφεί στους μη πόλιο εντεροϊούς, αφού έχει βρεθεί ότι πρότυπα στελέχη, όπως τα E18 και CAV21, είναι ανασυνδυασμένα (Hughes et al., 1989; Andersson et al., 2002; Oberste et al., 2004) καθώς υπάρχουν και αποδείξεις για ανταλλαγές γενετικού υλικού μεταξύ κυκλοφορούντων στελεχών (Lukashev et al., 2003). Παρά τη μεγάλη πρόοδο στη μελέτη των ανασυνδυασμών στους μη πόλιο εντεροϊούς, τα ακριβή σημεία ανασυνδυασμού έχουν καθοριστεί μόνο σε εμβολιακά στελέχη πολιοϊών, Sabin (Dedepsidis et al., 2007, Karakasiliotis et al., 2004).

Στους μη πόλιο εντεροϊούς, λόγω της μεγάλης γενετικής ποικιλομορφίας και της έλλειψης υψηλής ομοιότητας μεταξύ νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σύγχρονων στελεχών εντεροϊών, είναι εξαιρετικά δύσκολος ο εντοπισμός του σημείου ανασυνδυασμού μεταξύ αυτών. Παρόλα αυτά πρέπει να τονιστεί ότι η μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος του LR31G7 αποκάλυψε το ακριβές σημείο του ανασυνδυασμού μεταξύ κυκλοφορούντων στελεχών εντεροϊών, αποτελώντας ένα ακόμα βήμα στη μελέτη και την κατανόηση της εξέλιξης των εντεροϊών.

4.6 ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ LR51A5 ΚΑΙ LR61G3

Σε αυτό το τμήμα της διατριβής παρουσιάζεται η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος των στελεχών εντεροϊών, LR51A5 και LR61G3, τα οποία απομονώθηκαν από το βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας το Μάιο και Ιούνιο του 2006 αντίστοιχα. Η αλληλούχιση της VP1 γενωμικής περιοχής κατέταξε τα στελέχη στον ορότυπο E6, παρουσιάζοντας 77% και 93% νουκλεοτιδική και αμινοξική ομοιότητα αντίστοιχα με το πρότυπο στέλεχος D' Amori. Η υψηλή νουκλεοτιδική ομοιότητα (99-100%) σε όλες τις αλληλουχημένες περιοχές μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ίδιος ιός κυκλοφόρησε στον πληθυσμό της Λάρισας για τουλάχιστον δύο μήνες.

Τα στελέχη LR51A5 και LR61G3 μελετήθηκαν ως προς τα δυο στελέχη E6 που απομόνωσαν οι Lénêque και συν. (Lénêque et al., 2007) από ασθενή με μηνιγγίτιδα χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Το ένα στέλεχος έχει την ικανότητα αιμοσυγκόλλησης (HAEV6), ενώ το άλλο όχι (NHAEV6). Τα δύο στελέχη φαίνεται να χρησιμοποιούν διαφορετικές οδούς για την είσοδό τους στα κύτταρα. Πέντε αμινοξέα στις VP1, VP2 και VP3 πρωτεΐνες φαίνεται να είναι υπεύθυνα για τις διαφορετικές ιδιότητες των δυο ιών. Η διατήρηση της ικανότητας αιμοσυγκόλλησης φαίνεται να οφείλεται στην ύπαρξη θρεονίνης στη θέση 163 (T163) της VP2, βαλίνης στη θέση 62 (V62) της VP3, γλουταμινικό οξύ στη θέση 88 (E88) και βαλίνη στις θέσεις 139 (V139) και 157 (V157) της VP1. Τα στελέχη NHAEV6, χαρακτηρίζονται από αλανίνη (A163) στη VP2, ισολευκίνη (I62) στη VP3, λυσίνη (K88) και αλανίνη (A139 και A157) στη VP1. Τα στελέχη LR51A και LR61G3 παρουσιάζουν το πρότυπο των HAEV6 στελεχών για τις θέσεις, T163 της VP2, V62 της VP3 και V157 της VP1, ενώ στις θέσεις 88 και 139 VP1 υπάρχουν τα αμινοξέα που χαρακτηρίζουν τα στελέχη NHAEV6 (K88 και A139). Οι αμινοξικές αυτές θέσεις εντοπίζονται σε δομικές περιοχές του καψιδίου που επηρεάζουν την πρόσδεση με τον κυτταρικό υποδοχέα, τη σταθερότητα του καψιδίου και την παθογένεια του ιού (Minor et al., 1986, Page et al., 1988, Muckelbauer et al., 1995). Ο συνδυασμός των αμινοξέων στις συγκεκριμένες θέσεις που εμφανίζονται στα στελέχη LR51A5 και LR61G3 και ο ρόλος τους στις διάφορες ιδιότητες του ιού αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Για την επιδημιολογική ανάλυση των LR51A5 και LR61G3 και τη συσχέτισή τους με στελέχη E6 που κυκλοφόρησαν στην Ελλάδα το 2001 και το 2007, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο (εικόνα 3.56) σε τμήμα της VP1 γενωμικής περιοχής κοινό για τα στελέχη αυτά, καθώς και για άλλα απομονωμένα σε άλλες γεωγραφικές περιοχές. Η στενή φυλογενετική σχέση και η υψηλή νουκλεοτιδική ομοιότητα (98%) μεταξύ των περιβαλλοντικών στελεχών και αυτών που απομονώθηκαν από περιστατικά άσηπτης μηνιγγίτιδας το 2007 οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κλινικά και περιβαλλοντικά στελέχη μοιράζονται τον ίδιο γονότυπο.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν στελέχη E6 από το βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας ένα χρόνο πριν την απομόνωσή τους από περιστατικά άσηπτης μηνιγγίτιδας. Ο έλεγχος του περιβάλλοντος έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό της κυκλοφορίας σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό άγριων αλλά και εμβολιακών στελεχών πολιοϊών (Manor et al., 1999, Divizia et al., 1999, Hovi et al., 2001, Hovi et al., 2005), καθώς επίσης και ως προγνωστικό εργαλείο μιας και στελέχη πολιοϊοίων έχουν ανιχνευτεί σε περιβαλλοντικά δείγματα τρεις μήνες πριν την απομόνωσή τους από περιστατικά πολιομυελίτιδας (Deshpande et al., 2003). Η μελέτη περιβαλλοντικών δειγμάτων ανίχνευσε στελέχη μη-πόλιο εντεροϊών (Shieh et al., 1997; Shieh et al., 2003; Sedmak et al., 2005), αλλά σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν υπήρξε συσχέτιση των απομονωθέντων από το περιβάλλον εντεροϊών με κλινικά στελέχη.

Στο φυλογενετικό δέντρο της VP1 για την επιδημιολογική συσχέτιση των LR51A5 και LR61G3 με άλλα E6 στελέχη δεν παρατηρείται συσχέτιση με τα στελέχη που απομονώθηκαν από την επιδημία άσηπτης μηνιγγίτιδας του 2001. Τα περιβαλλοντικά στελέχη και τα κλινικά στελέχη του 2007 ομαδοποιούνται με στελέχη που απομονώθηκαν το 2005 και 2006 σε περιοχές της Ανατολικής Ευρώπης. Η παραπάνω φυλογενετική σχέση δεν μπορεί να υποστηρίξει την είσοδο του ιού από τις χώρες της βορειοανατολικής Ευρώπης, αφού η νουκλεοτιδική ομοιότητα μεταξύ τους στη συγκεκριμένη περιοχή δεν είναι τόσο υψηλή (84-85%), αναλογιζόμενοι το γεγονός ότι η απομόνωσή τους έγινε μέσα σε διάστημα δυο χρόνων.

Η SimPlot ανάλυση της VP1 γενωμικής περιοχής (εικόνα 3.58) ανέδειξε τέσσερις περιοχές όπου το LR51A5 παρουσιάζει μέγιστη ομοιότητα με

διαφορετικό E6 στέλεχος. Η φυλογενετική ανάλυση στις τέσσερις αυτές περιοχές ομαδοποίησε τα στελέχη LR51A5 και LR61G3 με διαφορετικό στέλεχος σε κάθε φυλογενετικό δέντρο (εικόνα 3.57). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την ύπαρξη πιθανών πολλαπλών ενδο-οροτυπικών ανασυνδυασμών μεταξύ διαφόρων στελεχών E6. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ανασυνδυασμός αποτελεί συχνό φαινόμενο στους πολιοϊούς και στους μη πόλιο εντεροϊούς, εντοπιζόμενος κυρίως στη λειτουργική περιοχή του γενώματός τους (Lukashev et al., 2005; Dahourou et al 2002; Dedepsidis et al., 2008; Georgopoulou and Markoulatos, 2001; Kottaridi et al., 2007). Αν και στους μη πόλιο εντεροϊούς ο δια-οροτυπικός ανασυνδυασμός είναι πολύ σπάνιος στην καψιδιακή περιοχή VP2-VP1 (Bouslama et al., 2007) και οι ενδο-οροτυπικοί ανασυνδυασμοί είναι εκατό φορές πιο συχνοί από τους δια-οροτυπικούς (Kirkegaard . and Baltimore, 1986), ελάχιστες είναι οι περιπτώσεις στους μη πόλιο εντεροϊούς όπου έχουν αναφερθεί ανταλλαγές γενετικών υλικών μεταξύ στελεχών του ίδιου οροτύπου στην καψιδιακή περιοχή (Oberste et al., 2004d). Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι απαιτείται η αλληλούχηση ολόκληρης της VP1 γενωμικής περιοχής για την ανίχνευση ενδο-οροτυπικών ανασυνδυασμών αλλά και ότι οι επιδημιολογικές μελέτες που στηρίζονται σε τμήμα αυτής της περιοχής μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα.

Όσον αφορά τη φυλογενετική ανάλυση σε όλες τις γενωμικές περιοχές, τα LR51A5 και LR61G3, όπως ήταν αναμενόμενο, ταξινομούνται με τα στελέχη του ίδιου οροτύπου στην καψιδιακή περιοχή, γεγονός που διακόπτεται περνώντας στη λειτουργική περιοχή. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ενώ στα φυλογενετικά δέντρα για τις 2A και 2B περιοχές τα LR51A5 και LR61G3 παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο ταξινόμησης, στις υπόλοιπες λειτουργικές περιοχές παρατηρείται συνεχείς ταξινόμηση με E30 στελέχη που απομονώθηκαν στη Γαλλία το 2002-2005. Στην ίδια φυλογενετική ομάδα ταξινομείται και ένα στέλεχος CBV4 επίσης απομονωμένο στη Γαλλία το 2003, το οποίο φαίνεται να φέρει τμήμα του γονιδιώματος των προαναφερθέντων E30 στελεχών. Η υποψία για ανασυνδυασμό στη 2C περιοχή ενισχύεται και από τη SimPlot ανάλυση της εικόνας 3.55.

Αξίζει επίσης να σχολιαστεί το δεντρόγραμμα για την 3D περιοχή της εικόνας 3.54. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες κλινικά στελέχη έχουν την τάση να διαχωρίζονται σε δύο φυλογενετικές ομάδες στη 3D, η μια σχετιζόμενη με το

πρότυπο στέλεχος E1 και η άλλη με το πρότυπο E30 (Oprisan et al., 2002; Lukashev et al., 2003; Lukashev et al., 2005). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι στην ομάδα του E1 ταξινομούνται στελέχη που απομονώθηκαν τη δεκαετία του 1980, ενώ στην ομάδα του E30 ταξινομούνται πιο πρόσφατοι εντεροϊοί. Στην παρούσα διατριβή μόνο το LR11F7 στέλεχος φαίνεται να ακολουθεί αυτό τον κανόνα, μιας και τα στελέχη LR31G7, και LR51A5 και LR61G3 καθώς και πρόσφατα κλινικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του δέντρου ομαδοποιούνται με το πρότυπο E1. Ίσως, το πρότυπο ταξινόμησης των εντεροϊών στη συγκεκριμένη περιοχή να είναι ανεξάρτητο του χρόνου απομόνωσής τους και ο ανασυνδυασμός να παίζει σημαντικό ρόλο στη φυλογενετική σχέση των πρόσφατων και πρότυπων στελεχών.

4.7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Το γένος των εντεροϊών περιλαμβάνει αρκετά παθογόνα στελέχη για τον άνθρωπο. Οι πολιοϊοί μονοπωλούσαν για πολλά χρόνια το ενδιαφέρον λόγω σοβαρών και μεγάλης έκτασης επιδημιών που προκαλούσαν. Όσο η πολιομυελίτιδα τείνει πλέον να εξαφανιστεί, τουλάχιστον στις ανεπτυγμένες περιοχές, το ενδιαφέρον στρέφεται στους εντεροϊούς. Τα τελευταία χρόνια με τη ραγδαία εξέλιξη της μοριακής βιολογίας παρέχεται το εργαλείο για τη μελέτη του γονιδιώματός τους και τη συλλογή πληροφοριών που αφορούν στην εξέλιξή τους. Με την αλληλούχηση ολόκληρων των γονιδιωμάτων πρότυπων και κλινικών στελεχών ο ανασυνδυασμός αναγνωρίστηκε σαν κύριος παράγοντας εξέλιξης. Οι εντεροϊοί θεωρούνται ως σύνολο καψιδιακών περιοχών που ανασυνδυάζονται ελεύθερα με μη καψιδιακές αλληλουχίες ώστε να δημιουργούνται στελέχη με πλεονέκτημα εκλεκτικής επιλογής.

Εντούτοις, ελάχιστα είναι τα στελέχη των πρόσφατων μη-πόλιο εντεροϊών τα οποία έχουν μελετηθεί σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Όσο περισσότερες αλληλουχίες πρόσφατων στελεχών κατατίθενται στην GenBank και πραγματοποιούνται μελέτες ολόκληρων των γονιδιωμάτων τους, κάποια από τα συμπεράσματα για την εξέλιξή τους ίσως χρειάζονται αναθεώρηση, όπως για παράδειγμα ο αποκλεισμός γεγονότων ανασυνδυασμού στις καψιδιακές περιοχές του γενώματός τους. Η μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος των στελεχών της παρούσας εργασίας, η ανάδειξη γεγονότων ανασυνδυασμού καθώς και ο

εντοπισμός τους σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω στο γονιδίωμα, συμβάλουν στη συσσώρευση πληροφοριών για την κατανόηση της εξέλιξης των εντεροϊών. Το γονιδίωμα τους φαίνεται να είναι ένα μωσαϊκό γενωμικών τμημάτων στελεχών του ίδιου ή και διαφορετικών οροτύπων. Η κυκλοφορία στον πληθυσμό πολύ-ανασυνδυασμένων στελεχών εντεροϊών και η συσσώρευση μεταλλάξεων μπορεί να οδηγήσει σε στελέχη επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abad F. X., Pintó R. M., and Bosch A.** (1998) Flow cytometry detection of infectious rotaviruses in environmental and clinical samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2392-6.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., and Lipman D. J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Amvrosieva T. V., Paklonskaya N. V., Biazruchka A. A., Kazinetz O. N., Bohush Z. F., and Fisenko E. G.** (2006) Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents. *Cent. Eur. J. Public Health.* **14**:67-73.
- Andersson P., Edman K., and Lindberg A. M.** (2002) Molecular analysis of the echovirus 18 prototype: evidence of interserotypic recombination with echovirus 9. *Virus Res.* **85**:71-83.
- Arnold E., Luo M., Vriend G., Rossmann M. G., Palmenberg A. C., Parks G. D., Nicklin M. J., and Wimmer E.** (1987) Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 21-25.
- Baboonian C., Davies M. J., Booth J. C., and McKenna W. J.** (1997) Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **223**:31-52.
- Back S. H., Kim Y. K., Kim W. J., Cho S., Rang Oh H., Kim J.E., and Jang S. K.** (2002) Translation of Polioviral mRNA Is Inhibited by Cleavage of Polypyrimidine Tract-Binding Proteins Executed by Polioviral 3Cpro. *J. Virol.* **76**:2529-2542.
- Barton D. J., and Flanagan J. B.** (1997) Synchronous replication of poliovirus RNA: initiation of negative-strand RNA synthesis requires the guanidine-inhibited activity of protein 2C. *J. Virol.* **71**:8482-8489.
- Bazan J. F. and Fletterick R. J.** (1988) Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:7872-6.
- Belnap D. M., McDermott B. M. Jr, Filman D. J., Cheng N., Trus B. L., Zuccola H. J., Racaniello V. R., Hogle J. M., and Steven A. C.** (2000) Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:73-8.
- Belov G. A., Bonnet N. A., Kovtunovych G., Jackson C. L., Lippincott-Schwartz J., and Ehrenfeld E.** (2007) Hijacking Components of the Cellular Secretory Pathway for Replication of Poliovirus RNA. *J. Virol.* **81**:558-567.
- Bergelson J. M., Chan M., Solomon K. R., St John N. F., Lin H., and Finberg R. W.** (1994) Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 6245-6248.
- Bienz K., Egger D., Troxler M., and Pasamontes L.** (1990) Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J. Virol.* **64**: 1156-63.
- Blomqvist S., Bruu A. L., Stenvik M., and Hovi T.** (2003) Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.* **84**: 573-80.
- Blomqvist S., Skytta A., Roivainen M., and Hovi T.** (1999) Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR-hybridisation assay. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2813-2816.

- Bolanaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Kyriakopoulou Z., Margaritis L., and Katsorchis T.** (2007) Partial 3D gene sequences of Cocksackie viruses reveal interspecies exchanges. *Virus Genes*. **35**:129-40.
- Bolanaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorchis T. A.** (2005) Comparative amplification of five different genomic regions on Cocksackie A and B viruses. Implications in clinical diagnostics. *Mol. Cell. Probes*. **19**:127-35.
- Bolanaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorchis T.** (2005b) Nucleotide analysis and phylogenetic study of the homology boundaries of coxsackie A and B viruses. *Virus Genes* **31**:307-20.
- Bolanaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorchis T.** (2006) Evolution of 2B and 2C genomic parts of species B Cocksackie viruses. Phylogenetic study and comparison with other regions. *Virus Genes* **32**:249-59.
- Borchardt M. A., Bertz P. D., Spencer S. K., and Battigelli D. A.** (2003) Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1172-80.
- Boussadia L., Nasri D., Chollet L., Belguith K., Bourlet T., Aouni M., Pozzetto B., and Pillet S.** (2007) Natural recombination event within the capsid genomic region leading to a chimeric strain of human enterovirus B. *J. Virol.* **81**:8944-52.
- Boussadia O., Niepmann M., Creancier L., Prats A. C., Dautry F., and Jacquemin-Sablon H.** (2003) Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *J. Virol.* **77**: 3353-3359.
- Brown B., Oberste M. S., Maher K., and Pallansch M. A.** (2003) Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* **77**:8973–8984.
- Brown E. H.** (1972) Enterovirus Infections. *British Medical Journal*. **2**:169-171.
- Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., and Crainic R.** (2001) Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* **82**: 79-91.
- Casas I., Palacios G. F., Trallero G., Cisterna D., Freire M. C., and Tenorio A.** (2001) Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J. Med. Virol.* **65**:138–48.
- 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.
- Centers for Disease Control and Prevention.** (2005) Progress toward interruption of wild poliovirus transmission-Worldwide, January 2004-March 2005. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **54**:408-412.
- Chan K. P., Goh K. T., Chong C. Y., Teo E. S., Lau G., and Ling A. E.** (2003) Epidemic Hand, Foot and Mouth Disease Caused by Human Enterovirus 71, Singapore. *Emerging Infectious Diseases*. **9**:78-85.
- Chapron C. D., Ballester N. A., Fontaine J. H., Frades C. N., and Margolin A. B.** (2000) Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2520-5.
- Chetverin A. B.** (1999) The puzzle of RNA recombination. *FEBS* **460**:1 – 5.

- Chevalier S., Szendrői A., Caro V., Balanant Jean, Guillot S., Berencsi Gy., and Delpeyroux, F.** (2004) Molecular comparison of echovirus 11 strains circulating in Europe during an epidemic of multisystem haemorrhagic disease of infants indicates that evolution generally occurs by recombination. *Virology* **20**:56-70.
- Chua B. H., McMinn P. C., Lam S. K., and Chua K. B.** (2001) Comparison of the complete nucleotide sequences of echovirus 7 strain UMMC and the prototype (Wallace) strain demonstrates significant genetic drift over time. *J. Gen. Virol.* **82**:2629-39.
- Clark M. E. and Dasgupta A.** (1990) A transcriptionally active form of TFIIC is modified in poliovirus-infected HeLa cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**:5106-5113.
- Cochi S. L., Hull H. F., and Ward N. A.** (1995) To conquer poliomyelitis forever. *Lancet*. 345(8965):1589-90.
- Costa-Mattioli M., Svitkin Y., Sonenberg N.** (2004). La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol. Cell Biol.* **24**:6861-70.
- Crabtree K. D., Gerba C. P., Rose J. B., and Haas C. N.** (1997) Waterborne adenovirus: a risk assessment. *Water Sci. Technol.* **35**:1-6.
- Cuervo N. S., Guillot S., Romanenkova N., Combiescu M., Aubert-Combiescu A., Seghier M., Caro V., Crainic R., and Delpeyroux F.** (2001) Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J. Virol.* **75**:5740-51.
- Curry S., Fry E., Blakemore W., Abu-Ghazaleh R., Jackson T., King A., Lea S., Newman J., and Stuart D.** (1997) Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **12**:9743-52.
- Dahourou G., Guillot S., Le Gall O., and Crainic R.** (2002) Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.* **83**:3103-3110.
- Dalldorf G., and Sickles G. M.** (1948) An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science*. **108**:61-62.
- Dedepsidis E., Kyriakopoulou Z., Pliaka V., Kottaridi C., Bolanaki E., Levidiotou-Stefanou S., Komiotis D., and Markoulatos P.** (2007) A Retrospective characterization of a Vaccine derived Poliovirus type 1 isolated from sewages in Greece. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:6697-704.
- Dedepsidis E., Pliaka V., Kyriakopoulou Z., Brakoulis C., Levidiotou-Stefanou S., Pratti A., Mamuris Z., and Markoulatos P.** (2008) Complete genomic characterization of an intertypic Sabin3/Sabin2 capsid recombinant. *FEMS*. **52**:342-351.
- Deshpande J. M., Shetty S. J., and Siddiqui Z. A.** (2003) Environmental surveillance system to track wild poliovirus transmission. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2919-27.
- Divizia M., Palombi L., Buonomo E., Donia D., Ruscio V., Equestre M., Leno L., Panà A., and Degener A. M.** (1999) Genomic characterization of human and environmental polioviruses isolated in Albania. *Appl Environ Microbiol.* **65**:3534-9.
- Doedens J. R., Giddings T. H. Jr, and Kirkegaard K.** (1997) Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J. Virol.* **71**:9054-64.
- Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J. C., Portela A., Ortín 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**:1-8.

- Dotta F., Censini S., van Halteren A. G., Marselli L., Masini M., Dionisi S., Mosca F., Boggi U., Muda A. O., Prato S. D., Elliott J. F., Covacci A., Rappuoli R., Roep B. O., and Marchetti P.** (2007) Cxsackie B4 virus infection of β cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *PNAS*. **104**:115-5120.
- Egger D., Teterina N., Ehrenfeld E. and Bienz K.** (2000) Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production and viral RNA synthesis. *J. Virol.* **74**:6570-6580.
- Ehlers M. M., Grabow W. O., and Pavlov D. N.** (2005) Detection of enteroviruses in untreated and treated drinking water supplies in South Africa. *Water Res.* **39**:2253-8.
- El Bassioni L., Barakat I., Nasr E., de Gourville E. M., Hovi T., Blomqvist S., Burns C., Stenvik M., Gary H., Kew O. M., Pallansch M. A., and Wahdan M. H.** (2003) Prolonged detection of indigenous wild polioviruses in sewage from communities in Egypt. *Am. J. Epidemiol.* **158**:807-15.
- El-Sageyer M. M., Szendrői A., Hütter E., Új M., Szücs Gy., Mezey I., Tóth I., Kátai A., Kapiller Z., Páll G., Petrás Gy., Szalay E., Mihály I., Gourova S., and Berencsi Gy.** (1998) Characterization of an echovirus type 11' (prime) epidemic strain causing haemorrhagic syndrome in newborn babies in Hungary. *Acta Virol.* **42**:157-166.
- Filman D. J., Syed R., Chow M., Macadam A. J. Minor P. D., and Hogle J. M.** (1989) Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.* **8**: 1567-79.
- Fiore L., Genovese D., Diamanti E., Catone S., Ridolfi B., Ibrahimi B., Konomi R., van der Avoort H. G., Hovi T., Crainic R., Simeoni P., and Amato C.** (1998) Antigenic and molecular characterization of wild type 1 poliovirus causing outbreaks of poliomyelitis in Albania and neighboring countries in 1996. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1912-8.
- Fong T. T., and Lipp E. K.** (2005) Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:357-71.
- Fong T. T., Griffin D. and W., and Lipp E. K.** (2005) Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2070-8.
- Formiga-Cruz M., Hundesa A., Clemente-Casares P., Albiñana-Gimenez N., Allard A., and Girones R.** (2005) Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *J. Virol. Methods.* **125**:111-8.
- Fout G. S., Martinson B. C., Moyer M. W., and Dahling D. R.** (2003) A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Appl Environ Microbiol.* **69**:3158-64.
- Frantzidou F., Dumaidi K., Spiliopoulou A., Antoniadis A., and Papa A.** (2007) Echovirus 15 and autumn meningitis outbreak among children, Patras, Greece, *J. Clin. Virol.* **40**:77-9.
- Fricks C. E., and Hogle J. M.** (1990) Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* **64**:1934-45.
- Furione M., Guillot S., Otelea D., Balanant J., Candrea A., and Crainic R.** (1993) Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology.* **196**:199-208.
- Gamarnik, A. V., and Andino R.** (1998) Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* **12**:2293-2304.

- Gammack N. J., Phillips A., Dunn G., Patel V. and Minor P. D.** (1989) Intertypic genomic rearrangements of poliovirus strains in vaccines. *Virology*. **167**: 505-514.
- Gavrilin G.V., Cherkasova E. A., Lipskaya G. Y., Kew O. M., and Agol V. I.** (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., and Markoulatos P.** (2001) Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**:792-799.
- 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**: 8958 – 8965.
- Grabow W. O., Botma K. L., de Villiers J. C., Clay C. G., and Erasmus B.** (1999) Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. *Bull. World. Health Organ.* **77**:973-80.
- Gregory J. B., Litaker R. W., Noble R. T.** (2006) Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* **72**:3960-7.
- Griffin D. W., Donaldson K. A., Paul J. H., Rose J. B.** (2003) Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:129-43.
- Grimwood K., Huang S. Q., Sadleir G. L., Nix A. W., Kilpatrick D. R., Oberste M. S., and Pallansch M. A.** (2003) Acute Flaccid Paralysis from Echovirus Type 33 Infection. *J. Clin. Microb.* **41**:2230-2232.
- Gromeier M., Alexander L., and Wimmer E.** (1996) Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 2370-5.
- Guillot S., Caro V., Cuervo N., Korotkova E., Combiescu M., Persu A., Aubert-Combiescu A., Delpeyroux F., and Crainic R.** (2000) Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* **74**:8434-43.
- Gulevich A.Y., Yusupova R. A., Drygin Y. F.** (2001) A phosphodiesterase from ascites carcinoma Krebs II cells specifically cleaves the bond between VPg and RNA of encephalomyocarditis virus. *Biochemistry.* **66**:345-9.
- Haramoto E., Katayama H., Oguma K., and Ohgaki S.** (2007) Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *J. Virol. Methods.* **142**:169-73.
- Herold J. and Andino R.** (2001) Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* **7**:581-591.
- Hirst G.,** (1962) Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus, and influenza. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **27**:303 - 308.
- Hogle J. M., Chow M., and Filman D. J.** (1985) Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science.* **229**:1358-1365.
- Hovi T., Blomqvist S., Nasr E., Burns C. C., Sarjakoski T., Ahmed N., Savolainen C., Roivainen M., Stenvik M., Laine P., Barakat I., Wahdan M. H., Kamel F. A., Asghar H., Pallansch M. A., Kew O. M., Gary H. E. Jr, deGourville E. M., and El Bassioni L.** (2005) Environmental surveillance of wild poliovirus circulation in Egypt--balancing between detection sensitivity and workload. *J. Virol. Methods.* **126**:127-34.

- Hovi T., Stenvik M., Partanen H., and Kangas A.** (2001) Poliovirus surveillance by examining sewage specimens. Quantitative recovery of virus after introduction into sewerage at remote upstream location. *Epidemiol. Infect.* **127**:101-6.
- Hughes P. J., North C., Minor P. D., and Stanway G.** (1989) The complete nucleotide sequence of coxsackievirus A21. *J. Gen. Virol.* **70**:2943-52.
- Hunt S. L., and Jackson R. J.** (1999) Polypyrimidine-tract binding protein (PTB) is necessary, but not sufficient, for efficient internal initiation of translation of human rhinovirus-2 RNA. *RNA*. **5**: 344-359.
- Jacobson S. J., Konings D. A., and Sarnow P.** (1993) Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J. Virol.* **67**:2961-2971.
- Jurgens C. K., Barton D. J., Sharma N., Morasco B. J., Ogram S. A., and Flanagan J. B.** (2006) 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. *Virology*. **345**:346-357.
- Kamer G. and Argos P.** (1984) Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* **12**:7269-7282.
- Karakasiliotis I., Markoulatos P., and Katsorchis T.** (2004) Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol. Cell. Probes.* **18**: 103-9.
- Katayama H., Shimasaki A., and Ohgaki S.** (2002) Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1033-9.
- Kauder S. E. and Racaniello V. R.** (2004) Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* **113**: 1743-53.
- Kilpatrick D. R., Quay J., Pallansch M., and Oberste M. S.** (2001) Type-specific detection of echovirus 30 isolates using degenerate reverse transcriptase PCR primers. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1299-302.
- 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) "Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Academic Press. San Diego, New York.
- Kinnunen L., Huovilainen A., Poyry T., and Hovi T.** (1990) Rapid molecular evolution of wild type 3 poliovirus during infection in individual hosts. *J. Gen. Virol.* **71**:317-24.
- Kirkegaard K., and Baltimore D.** (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* **47**: 433 – 443.
- Knipe D. M., and Howley P. M.** (2007) *Fields Virology*, 5th Edition, Vol:1, Copyright: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kohler K. A., Hlady W. G., Banerjee K., Gupta D., Francis P., Durrani S., Zuber P. L., and Sutter R.W.** (2003) Compatible poliomyelitis cases in India during 2000. *Bull World Health Organ.* **81**:2-9.
- Kojouharova M., Zuber P. L., Gyurova S., Fiore L., Buttinelli G., Kunchev A., Vladimirova N., Korsun N., Filipova R., Boneva R., Gavrillin E., Deshpande J. M., Oblapenko G., and Wassilak S. G.** (2003) Importation and circulation of poliovirus in Bulgaria in 2001. *Bull World Health Organ* **81**:476-481.

- Kottaridi C., Bolanaki E., and Markoulatos P.** (2004) Amplification of Echoviruses genomic regions by different RT-PCR protocols--a comparative study. *Mol. Cell. Probes*. **18**:263-9.
- Kottaridi C., Bolanaki E., Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pratti A., and Markoulatos P.** (2007) Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **58**:407-12.
- Kottaridi C., Bolanaki E., Mamuris Z., Stathopoulos C., Markoulatos P.** (2006) Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation. *Arch. Virol.* **151**:1117-32.
- Kumar S., Tamura K., and Nei M.** (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* **5**:150-163.
- Lévêque N., Norder H., Zreik Y., Cartet G., Falcon D., Rivat N., Chomel J. J., Hong S. S., and Lina B.** (2007) Echovirus 6 strains derived from a clinical isolate show differences in haemagglutination ability and cell entry pathway. *Virus Res.* **130**:1-9.
- Li J. P. and Baltimore D.** (1990) An intragenic revertant of a poliovirus 2C mutant has an uncoating effect. *J. Virol.* **64**:1102-1107.
- Lindberg A. M., Andersson P., Savolainen C., Mulders M. N., and Hovi T.** (2003) Evolution of the genome of Human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species. *J. Gen. Virol.* **84**:1223-35.
- Lipskaya G. Y., Chervonskaya E. A., Belova G. I., Maslova S. V., Kutateladze T. N., Drozdov S. G., Mulders M., Pallansch M. A., Kew O. M., and Agol V. I.** (1995) Geographical genotypes (geotypes) of poliovirus case isolates from the former Soviet Union: relatedness to other known poliovirus genotypes. *J. Gen. Virol.* **76**:1687-1699.
- Liu H. M., Zheng D. P., Zhang L. B., Oberste M. S., Kew O. M., and Pallansch M. A.** (2003) Serial recombination during circulation of type 1 wild-vaccine recombinant polioviruses in China. *J. Virol.* **77**:10994-1005.
- Liu H. M., Zheng D. P., Zhang L. B., Oberste M. S., Pallansch M. A., Kew O. M.** (2000) Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China. *J. Virol.* **74**:11153-61.
- Lodder W. J., and de Roda Husman A. M.** (2005) Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol.* **71**:1453-61.
- Logotheti M., Pogka V., Horefti E., Papadakos K., Giannaki M., Pangalis A., Sgouras D., and Mentis A.** (2009) Laboratory investigation and phylogenetic analysis of enteroviruses involved in an aseptic meningitis outbreak in Greece during the summer of 2007. *J. Clin. Virol.* **46**:270-4.
- Lukashev A. N., Lashkevich V. A., Ivanova O. E., Koroleva G. A., Hinkkanen A. E., and Ilonen J.** (2003) Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.* **77**:10423-31.
- 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.
- Lukashev A. N., Lashkevich V. A., Koroleva G. A., Ilonen J., and Hinkkanen A. E.** (2004) Recombination in uveitis-causing enterovirus strains. *J. Gen. Virol.* **85**:463-70.
- Macadam A. J., Arnold C., Howlett J., John A., Marsden S., Taffs F., Reeve P., Hamada N., Wareham K., and Almond J.** (1989) Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology.* **172**:408-14.
- Madan V., Castelló A., and Carrasco L.** (2008) Viroporins from RNA viruses induce caspase-dependent apoptosis. *Cellular Microbiology* **10**:437-451.

- Manor Y., Handsheer R., Halmut T., Neuman M., Bobrov A., Rudich H., Vonsover A., Shulman L., Kew O., Mendelson E.** (1999) Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian authority. *J Clin. Microbiol.* **37**:1670-5.
- 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**:3583-3596.
- Martin J., Samoilovich E., Dunn G., Lackenby A., Feldman E., Heath A., Svirchevskaya E., Cooper G., Yermalovich M., and Minor P. D.** (2002) Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* **76**:10921-10928.
- Marturano J., and Fiore L.** (2002) Investigation of the presence of recombinant polioviruses in the hit population in Albania during the 1996 outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **40**:316-7.
- McDermott B. M. Jr, Rux A. H., Eisenberg R. J., Cohen G. H., and Racaniello V. R.** (2000) Two distinct binding affinities of poliovirus for its cellular receptor. *J. Biol. Chem* **275**:23089-23096.
- 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**:1671-82.
- Melnick J. L.** (1996) "Fields Virology." 3rd Ed., PA: Lippincott/Raven, Philadelphia
- Melnick J. L., Shaw E. W., and Curnen E. C.** (1949) A virus isolated from patients diagnosed as non-paralytic poliomyelitis or aseptic meningitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **71**:344-349.
- Metcalf T. G., Melnick J. L., and Estes M. K.** (1995) Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:461-87.
- Minor P. D., Ferguson M., Evans D. M., Almond J. W., and Icenogle J. P.** (1986) Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J. Gen. Virol.* **67**:1283-1291.
- Mirand A., Archimbaud C., Henquell C., Michel Y., Chambon M., Peigue-Lafeuille H., and Bailly J. L.** (2006) Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak. *J. Med. Virol.* **78**:1624-34.
- Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Peigue-Lafeuille H., and Bailly J. L.** (2007) Emergence of recent echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events. *J. Gen. Virol.* **88**:166-76.
- Mocé-Llivina L., Jofre J., Méndez X., Akkelidou D., Lucena F., and Papageorgiou G. T.** (2002) Counting cytopathogenic virus adsorbed to cellulose nitrate membrane filters as a simple method for counting viruses in raw sewage and sewage effluents. *J. Virol. Methods.* **102**:83-92.
- Molla A., Harris K. S., Paul A. V., Shin S. H., Mugavero J., and Wimmer E.** (1994) Stimulation of poliovirus proteinase 3Cpro-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J. Biol. Chem.* **269**:27015-27020.
- Muckelbauer J. K., Kremer M., Minor I., Diana G., Dutko F. J., Groarke J., Pevear D. C., and Rossmann M. G.** (1995) The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure.* **153**:653-67.
- 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**: 202-27.
- Mulders M. N., Reimerink J. H., Stenvik M., Alaeddinoglu I., van der Avoort H. G., Hovi, T. and Koopmans M. P.** (1999) A Sabin vaccine-derived field isolate of poliovirus type 1 displaying aberrant phenotypic and genetic features, including a deletion in antigenic site 1. *J. Gen. Virol.* **80**:907-16.
- Murray K. E., and Barton D. J.** (2003) Poliovirus CRE-dependent VPg uridylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **77**: 4739-50.
- Murray K. E., Roberts A. W. and Barton D. J.** (2001) Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. *RNA* **7**: 1126-1141.
- Oberste M. S., Maher K., Nix W. A., Michele S. M., Uddin M., Schnurr D., al-Busaidy S., Akoua-Koffi C., and Pallansch M. A.** (2007) Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species Human Enterovirus B. *Virus Res.* **128**:34-42.
- Oberste M. S., Maher K., and Pallansch M. A.** (1998) Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. *Virus Res.* **58**:35-43.
- 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**:1288-93.
- 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.** (2004b). Evnterivirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enterovirus and the rhinoviruses. *J. Gen. Virol.* **85**:2577-2584.
- Oberste M. S., Michele S. M., Maher K., Schnurr D., Cisterna D., Junttila N., Uddin M., Chomel J. J., Lau C. S., Ridha W., al-Busaidy S., Norder H., Magnus L. O., and Pallansch M. A.** (2004) Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J. Gen. Virol.* **85**:3205-3212.
- Oberste M. S., Peñaranda S., and Pallansch M. A.** (2004d) RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. *J. Virol.* **78**:2948-55.
- Oberste M.S., Nix W. A., Maher K., and Pallansch M. A.** (2003) Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J. Clin. Virol.* **26**: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** :2113 – 2122.
- Offerhaus L.** (1991) Albania: a plundered country. *Lancet.* **337**:44-45.
- Oprisan G., Combiescu M., Guillot S., Caro V., Combiescu A., Delpeyroux F., and Crainic R.** (2002) Natural genetic recombination between cocirculating heterotypic enteroviruses. *J. Gen. Virol.* **83**:2193– 2200.
- Page G. S, Mosser A. G, Hogle J. M, Filman D. J, Rueckert R. R, and Chow M.** (1988) Three-dimensional structure of poliovirus serotype 1 neutralizing determinants. *J. Virol.* **62**:1781-94.

- Pallin R., Wyn-Jones A. P., Place B. M., and Lightfoot N. F.** (1997) The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*. **67**:57-67.
- Papa A., Skoura L., Dumaidi K., Spiliopoulou A., Antoniadis A., and Frantzydou F.** (2009) Molecular epidemiology of Echovirus 6 in Greece. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis*. **28**:683-7.
- Parvin J. D., Smith F. I., and Palese P.** (1986) Rapid RNA sequencing using double-stranded template DNA, SP6 polymerase, and 3'-deoxynucleotide triphosphates. *DNA*. **5**:167-71.
- 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**:241-253.
- Paul A. V., Rieder E., Kim D. W., van Boom J. H., and Wimmer E.** (2000) Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylation of VPg. *J. Virol*. **74**:10359–10370.
- Paximadi E., Karakasiliotis I., Bolanaki E., Krikelis A., and Markoulatos P.** (2007) Vaccine derived bi- and multi-recombinant Sabin strains. *Virus Genes* **35**:541–548.
- Paximadi E., Karakasiliotis I., Mamuris Z., Stathopoulos C., Krikelis V., and Markoulatos P.** (2006) Genomic analysis of recombinant sabin clinical isolates. *Virus Genes* **32**: 203–210.
- Perera R., Daijogo S., Walter B. L., Nguyen J. H. C., and Semler B. L.** (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 nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem*. **274**: 6992-7001.
- Pfister T., Mirzayan C. and Wimmer E.** (1999) Molecular biology. In “Encyclopedia of Virology”, second edition (A. Granoff & R.G. Webster, Eds), pp 1330-1348 Academic Press Ltd.
- Pilipenco E.V., Gmyl A. P., and Agol V. I.** (1995) A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Res*. **23**:1870–1875.
- Pöyry T., Kinnunen L., Hyypia T., Brown B., Horsnell C., Hovi T., and Stanway G.** (1996) Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *J. Gen. Virol*. **77**:1699-1717.
- Poyry T., Stenvik M., and Hovi T.** (1988) Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Appl. Environ. Microbiol*. **54**:371-4.
- Prevot D., Decimo D., Herbreteau C. H., Roux F., Garin J., Luc Darlix J., and Ohlmann T.** (2003) Characterization of a novel RNA – binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO Jour*. **22**:1909-1921.
- Prevots D. R., Ciofi degli Atti M. L., Sallabanda A., Diamante E., Aylward R. B., Kakariqqi E., Fiore L., Ylli A., van der Avoort H., Sutter R. W., Tozzi A. E., Panci P., Schinaia N., Genovese D., Oblapenko G., Greco D., and Wassilak S. G.** (1998) Outbreak of paralytic poliomyelitis in Albania, 1996: high attack rate among adults and apparent interruption of transmission following nationwide mass vaccination. *Clin. Infect. Dis*. **26**:419-25.
- Pusch D., Oh D. Y, Wolf S., Dumke R., Schröter-Bobsin U., Höhne M., Röske .I, and Schreier E.** (2005) Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch. Virol*. **150**:929-47.
- Rajtar B., Majek M., Polański Ł., and Polz-Dacewicz M.** (2008) Enteroviruses in water environment--a potential threat to public health. *Ann. Agric. Environ. Med*. **15**:199-203.

- Ray S. C.** (1998) SimPlot for Windows (version 1.6). Baltimore, Md. Distributed by author (<http://www.welch.jhu.edu/~sray/download>).
- Richards O. C., and Ehrenfeld E.** (1998) Effects of poliovirus 3AB protein on 3D polymerase-catalyzed reaction. *J. Biol. Chem.* **273**:12832-12840.
- Robbins F. C., Enders J. F., Weller T. H., and Florentino G. L.** (1951) Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue culture. V. The direct isolation and serologic identification of virus strains in tissue culture from patients with nonparalytic and paralytic poliomyelitis. *Am. J. Hyg.* **54**:286-293.
- 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**: 7835-44.
- Romanova L. L., 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**:202-213
- Romero J. R.** (1999) Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **123**:1161-9.
- Rossmann M. G.** (1994) Viral cell recognition and entry. *Protein Sci.* **3**:1712-1725.
- Santti J., Harvala H., Kinnunen L., and Hyypiä T.** (2000) Molecular epidemiology and evolution of coxsackievirus A9. *J. Gen Virol.* **81**:1361-72.
- Santti, J., T. Hyypiä, L. Kinnunen, and M. Salminen.** (1999) Evidence of recombination among enteroviruses. *J. Virol.* **73**:8741-9.
- Schein C. H., Oezguen N., Volk D. E., Garimella R., Paul A., and Braun W.** (2006) NMR structure of the viral peptide linked to the genome (VPg) of poliovirus. *Peptides.* **27**:1676–1684.
- Sedmak G., Bina D., and MacDonald J.** (2003) Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from milwaukee, wisconsin, collected august 1994 to december 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7181-7.
- Sedmak G., Bina D., Macdonald J., and Couillard L.** (2005) Nine-year study of the occurrence of culturable viruses in source water for two drinking water treatment plants and the influent and effluent of a Wastewater Treatment Plant in Milwaukee, Wisconsin (August 1994 through July 2003). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1042-50.
- Shafren D. R., Dorahy D. J., Ingham R. A., Burns G. F., and Barry R. D.** (1997) Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J. Virol.* **71**:4736-4743.
- Sharma R., Raychaudhuri S., and Dasgupta A.** (2004) Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology* **320**:195–205.
- Shieh Y. C., Baric R. S., Woods J. W., and Calci K. R.** (2003) Molecular surveillance of enterovirus and norwalk-like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7130-6.
- Shieh Y. S., Baric R. S., and Sobsey M. D.** (1997) Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4401-7.
- Shulman L.M., Manor Y., Azar R., Handsher R., Vonsover A., Mendelson E., Rothman S., Hassin D., Halmut T., Abramovitz B., and 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**:2145-9.

- Siafakas N., Georgopoulou A., Markoulatos P., and Spyrou N. (2000)** Isolation of polioviruses and other enteroviruses in south Greece between 1994 and 1998. *J. Clin. Lab. Anal.* **14**:157-63.
- 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.
- Skraber S., Gassilloud B., Schwartzbrod L., and Gantzer C. (2004)** Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Res.* **38**:2927-33.
- Stanway G. (1990)** Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* **71**: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**:7859-7875.
- Strauss D. M., Glustrom L. W., and Wuttke D. S. (2003)** Towards an understanding of the poliovirus replication complex: the solution structure of the soluble domain of the poliovirus 3A protein. *J. Mol. Biol.* **330**:225-234.
- Sutter R. W., Caceres V. M., and Mas Lago P. (2004)** The role of routine polio immunization in the post-certification era. *Bull. World. Health Organ.* **82**:31-9.
- Tambini G., Andrus J. K., Marques E., Boshell J., Pallansch M., de Quadros C. A., and Kew O. (1993)** Direct detection of wild poliovirus circulation by stool surveys of healthy children and analysis of community wastewater. *J. Infect.Dis.* **168**:1510-4.
- Teterina N. L., Levenson E., Rinaudo M. S., Egger D., Bienz K., Gorbalenya A. E., and Ehrenfeld E. (2006)** Evidence for Functional Protein Interactions Required for Poliovirus RNA Replication. *J. Virol.* **80**:5327-5337.
- Tobin G. J., Young D. C., and Flanagan J. B. (1989)** Self-catalyzed linkage of poliovirus terminal protein VPg to poliovirus RNA. *Cell.* **59**:511-9.
- Todd S., Nguyen J. H., and Semler B. L. (1995)** RNA-protein interactions directed by the 3' end of human rhinovirus genomic RNA. *J. Virol.* **69**:3605-14.
- Tosteson M. T., and Chow M. (1997)** Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes. *J Virol.* **71**:507-11.
- 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**:761-70.
- Tsai Y. L., Tran B., and Palmer C. J. (1995)** Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:363-6.
- Tsai Y. L., Sobsey M. D., Sangermano L. R., and Palmer C. J. (1993)** Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3488-91.
- van Kuppeveld F. J., Galama J. M., Zoll J., and Melchers W. J. (1995)** Genetic analysis of a hydrophobic domain of coxsackie B3 virus protein 2B: a moderate degree of hydrophobicity is required for a cis-acting function in viral RNA synthesis. *J. Virol.* **69**:7782-7790.

- Verlinden Y., Cuconati A., Wimmer E., and Rombaut B.** (2000) Cell-free synthesis of poliovirus: 14S subunits are the key intermediates in the encapsidation of poliovirus RNA. *J. Gen. Virol.* **81**:2751-4.
- Wang J., Bakkers J., Galama J., Bruins Slot H., Pilipenko E. V., Agol V. I., and Melchers W.** (1999) Structural requirements of the higher order RNA kissing element in the enteroviral 3'UTR. *Nucleic Acids Res.* **27**:353-436.
- Ward C. D., and Flanagan J. B.** (1992) Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J. Virol.* **66**:3784-93.
- Weidman M. K., Sharma R., Raychaudhuri S., Kundu P., Tsai W., and Dasgupta A.** (2003) The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res.* **95**:75–85.
- World Health Organization.** (2003) posting date. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. World Health Organisation, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization.** (2001) Network strategy for detecting cVDPV is defined. Polio Lab Network. Quarterly update. Vol VII, Issue 4.
- Williams C. H., Oikarinen S., Tauriainen S., Salminen K., Hyöty H., and Stanway G. J.** (2006) Molecular analysis of an echovirus 3 strain isolated from an individual concurrently with appearance of islet cell and IA-2 autoantibodies. *Clin. Microbiol.* **44**:441-8.
- Wimmer E., Harber J. J., Bibb J. A., Gromeier M., Lu H. H. and Bernhardt G.** (1994) in *Cellular Receptors for Animal Viruses*, ed. Wimmer E. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), pp 101-127.
- Witwer C., Rauscher S., Hofacker I.L., and Stadler P. F.** (2001) Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic. Acids Res.* **15**:5079-89.
- Widjojoatmodjo M. N., Fluit A. C., and Verhoef J.** (1995) Molecular identification of bacteria by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin. Microbiol.* **33**:2601-6.
- Chuan X., Bator M. C., Bowman D. V., Rieder E., He Y., Hébert B., Bella J., Baker S. T., Wimmer E., Kuhn J. R., and Rossmann M. G.** (2001) Interaction of Cocksackievirus A21 with Its Cellular Receptor, ICAM-1. *J. Virol.* **75**:2444-2451.
- Yang C. F., Naguib T., Yang S. J., Nasr E., Jorba J., Ahmed N., Campagnoli R., van der Avoort H., Shimizu H., Yoneyama T., Miyamura T., Pallansch M., and Kew O.** (2003) Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J. Virol* **77**:8366-8377.
- Yongning H., Chipman R. P., Howitt J., Bator M. C., Whitt A. M., Baker S. T., Kuhn J. R., Anderson W. C., Freimuth P., and Rossmann G. M.** (2001) Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nature Structural Biology* **8**:874 – 878.

ABSTRACT

The genus of Enteroviruses belongs to Picornaviridae family. According to the degree of their genetic relatedness, they are divided into four species: HEVA, HEVB, HEVC and HEV-D. Enteroviruses are non enveloped viruses with a 7.500 nt single stranded positive RNA genome protected by an icosahedral capsid. The enterovirus genome consists of three major regions: the 5' untranslated region (5'UTR), the open reading frame (ORF) and the 3' untranslated region (3'UTR). ORF is translated into a single polypeptide and is then processed to generate four structural (VP1-VP4) and seven non-structural (2A-2C and 3A-3D) proteins.

Enteroviruses are transmitted by fecal-oral route and multiply in gastrointestinal tract. Infected people, symptomatic or asymptomatic, shed enteroviruses in large amounts in the environment by their faeces. Despite the reduction of viral amount following sewage treatment, enteric viruses can contaminate environmental waters causing a potential risk for public health by rejoining the food chain. The environmental surveillance constitutes a great tool for estimating the extent and the duration of poliovirus circulation in a population.

Enteroviruses, like other RNA viruses, have high mutation rate due to the lack of proofreading activity during genome replication. In addition, recombination plays a paramount role in the evolution of enteroviruses. Genetic exchanges between enteroviruses can give rise to new viral genotypes that may be extremely virulent and dangerous for public health. Environmental surveillance could be a useful tool for the study of enterovirus evolution, as long as a great number of enteroviruses can be isolated from environmental samples.

The aim of the present thesis was the isolation of enteroviruses from environmental samples and the molecular study of any putative recombinant strains. The first step was the selection of the appropriate method for the detection and the isolation of enteroviruses from environmental samples. The most appropriate methods that were the two phase separation method-cell culture and the electronegative filter-semi nested PCR used for the detection of enteroviruses in river water and sewage. Enteroviruses were detected in 30% of the sewage

samples. Finally, two enteroviruses from river water and seven from sewage were isolated in cell cultures. The full genome analysis of the environmental strains and three poliovirus strains isolated from poliomyelitis cases, revealed that intra- and inter-serotypic recombination events have played a major role in their evolutionary history. The contribution of recombination to enterovirus evolution is substantial, giving rise to new multi recombinant genetic lineages with unknown properties.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Molecular Characterization of Wild-Type Polioviruses Isolated in Greece during the 1996 Outbreak in Albania

Zaharoula Kyriakopoulou,¹ Christine Kottaridi,¹ Evaggelos Dedepsidis,¹ Eugenia Bolanaki,² Stamatina Levdiotou-Stefanou,³ and Panayotis Markoulatos^{1*}

*Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 26, Ploutonos and Aeolou St., Larissa 41 221, Greece¹;
 Virology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute, 127, Vasilissis Sofias Ave., Athens 115 21, Greece²; and
 Department of Microbiology, Medical School of Ioannina, Ioannina, Greece³*

Received 2 December 2005/Accepted 8 December 2005

During the present study three type 1 poliovirus strains isolated in Greece during the 1996 poliomyelitis outbreak in Albania were retrospectively investigated and determination of their relationship with other epidemic strains isolated in Albania or elsewhere during previous epidemics was attempted. SimPlot analysis revealed that the three Greek strains are the result of a recombination event in the VP2 coding region.

Three non-Sabin-like poliovirus type 1 (PV1) isolates similar to the serotypes that circulated in the epidemic in Albania in 1996 were isolated from members of a Gypsy community in Greece between the end of June 1996 and September 1996 (15). The outbreak in Albania was caused by a wild-type 1 poliovirus and lasted from May till November 1996 (6, 14). The three non-Sabin-like type 1 poliovirus strains were isolated in and recorded by the National Enterovirus Reference Laboratory for Greece at the Hellenic Pasteur Institute in Athens (15). The purpose of the present study was to further characterize in retrospect the specific poliovirus isolates throughout 5' untranslated region (UTR) and coding regions VP4, VP2, VP3, VP1, and 2A, in an attempt to investigate their relationship with strains isolated in Albania at the same period or elsewhere in the world during previous or more recent epidemics. Since the outbreak in Albania started soon after the national immunization days in Albania (April to May 1996) there was also an attempt to define whether these isolates had a vaccine origin and, if they did have, to elucidate the mutation and recombination events that may have contributed to the reversion of the attenuated phenotype to a neurovirulent one.

The three non-Sabin-like type 1 poliovirus strains were isolated from stool samples at the Enterovirus Reference Laboratory for Greece from cases of acute flaccid paralysis diagnosed in non-vaccinated Gypsy children, aged 7 months old, 9 [1/2] months old, and 2 [1/2] years old, in 1996. Initial isolation and identification of the strains by cell culture and seroneutralization with mixed, equine antiserum pools (supplied by the National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands) took place in summer 1996, simultaneously with a serious poliomyelitis outbreak in Albania (15).

Enterovirus RNA was extracted from 200 μ l of the inoculated Rd cell cultures (4). Six different primer sets (72437 and 216616 [2, 12]; EUG3a, EUG3b, EUG3c, and EUC2 [3]; and Z752 and Z1461, Z1196 and Z1941, Z1814 and Z2478, and Z2378 and Z3021 [present study]) were used in reverse tran-

scription-PCR, and sequence information from a part of the 5' UTR and VP4 capsid region and complete VP2, VP3, VP1, and 2A coding regions was obtained. Table 1 shows details of the primers designed in this study. The isolated RNA was reversed transcribed with all primer pairs (7). PCR was performed with primers EUC2, EUG3a, EUG3b, and EUG3c, while reverse transcription was performed with primers EUC2a and EUC2b, as previously described (3). The produced cDNA was amplified by PCR. Thirty-five cycles of denaturation (95°C, 20 s), annealing (57°C, 20 s, for primer pairs Z752-Z1461 and Z1814-Z2478 and 60°C, 10 s, for primer pairs Z1196-Z1941 and Z2378-Z3021), and extension (74°C, 20 s), followed by incubation for 15 min at 78°C were performed in an Eppendorf master cyclor.

Initial identification of the obtained genomic sequences was carried out by comparing them with all available sequences in the database using BLAST software. Pairwise comparison of the sequences of the three PV1 strains (accession numbers AY956405, AY956408, AY960848, AY956406, AY956409, AY960849, AY956407, AY956410, and AY960850) and the sequences of the respective genomic regions of reference and wild-type poliovirus strains, reference human enterovirus C strains (HEV-Cs), and other HEV representative species (CBV5, CAV9, CAV2, CAV12, and EV70) for which such data are available in GenBank was made with the aid of ClustalW software. Finally, plots of nucleotide similarity between poliovirus strains were created with the aid of SimPlot software (9), in an attempt to define genomic regions that display significant percentages of nucleotide sequence identity among the PV

TABLE 1. Designed primers

Primer	Position	Polarity	Sequence (5'–3')	Gene
Z752	752–774	Sense	CAGGTCTCATCCAGAAAGTTG	VP4
Z1461	1461–1483	Antisense	GGGTGTCGTTTGTTATTGTCT	VP2
Z1196	1196–1216	Sense	ACCGAACACACTAAGGGACA	VP2
Z1941	1941–1963	Antisense	GGTAGCACTCAAATCAAAAGGA	VP3
Z1814	1814–1836	Sense	GACAACCTTCAGTCTCCGTGTG	VP3
Z2478	2478–2500	Antisense	GCCTTGTGCTATTGCTTTTGT	VP3
Z2378	2378–2400	Sense	GAAATGGATATTCTCGGGTTTG	VP3
Z3021	3021–3043	Antisense	TTGATGGGTTTGATGAAGTCTG	VP1

* Corresponding author. Mailing address: Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, 26, Ploutonos & Aeolou St., Larissa 41221, Greece. Phone: 0030 2410 565274. Fax: 0030 2410 565290. E-mail: markoulatos@bio.uth.gr.

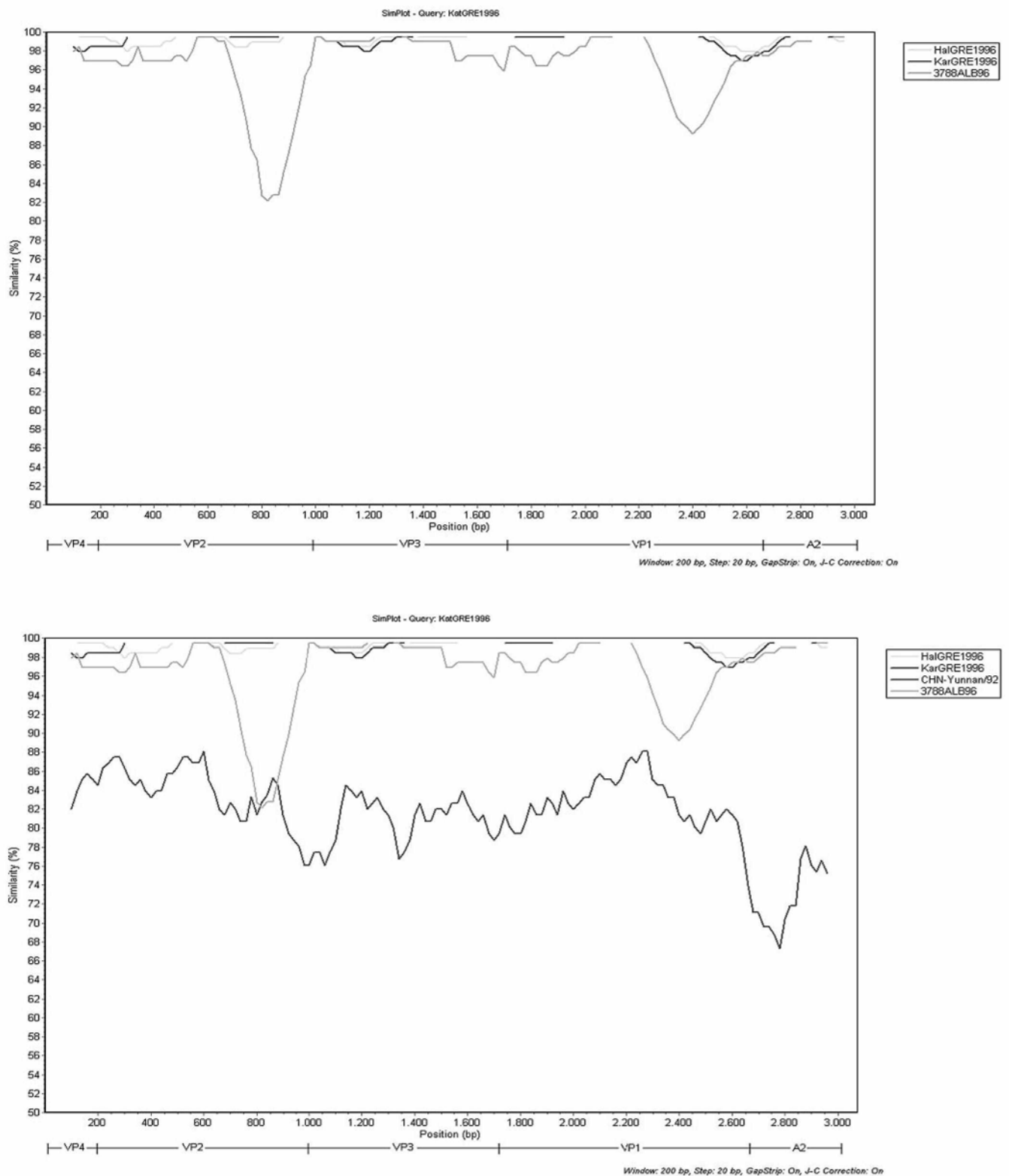


FIG. 1. SimPlot analysis of the 3' ends of VP4, VP2, VP3, VP1, and 2A genomic regions. KatGRE1996 is compared against (top) HalGRE1996, KarGRE1996, and the Albanian strain 3788ALB96 and (bottom) HalGRE1996, KarGRE1996, the Albanian strain 3788ALB96, and the Chinese isolate CHN-Yunnan/92.

strains, providing indications of possible recombination events throughout the genome.

Sequencing alignment of the three PV1 strains referred to as KatGRE1996, HalGRE1996, and KarGRE1996 with ClustalW revealed the great degree of relatedness of these strains, with sequence identity of 99% in all sequenced genomic regions: nucleotides (nt) 43 to 565 of the 5' UTR; the 3' end of VP4; and complete VP2, VP3, VP1, and 2A. Sequencing of the VP1 coding region verified the serotype of the three poliovirus type 1 strains (13). The nucleotide comparison of VP1 regions of the isolates with the respective regions of the poliovirus Sabin 1 strain and reference strain Mahoney showed the same homology (81%).

The nucleotide sequence comparison of the three PV1 isolates with other poliovirus strains using the BLAST software showed that the closest strains were those isolated from the epidemic in Albania in 1996, in all sequenced regions. Figure 1, top, shows the SimPlot comparison of the 3' ends of the VP4, VP2, VP3, VP1, and 2A coding regions of the three PV1 Greek isolates and the Albanian strain 3788ALB96, whose almost-complete sequence is available in GenBank (11). The similarity between the three PV1 strains and the Albanian strains ranges between 95% and 100% in different genomic regions. Obviously, the epidemic PV1 strain that circulated in Albania in 1996 was transferred in Greece, as has also been suggested by Fiore et al. (6). Nevertheless, as represented in Fig. 1, top, there is a region containing part of the almost 200 nt in the VP2 coding region that differs a lot from the respective region of the Albanian strain. Sequence analysis of this part of VP2 with BLAST software indicated a high degree of homology with PV1 strains isolated in China in 1991 (CHN-Yunnan/92). Multiple alignment of nt 550 to 700 of VP2 of the Greek isolates with the respective sequences of Chinese and Albanian strains revealed 89% and 78% homology, respectively. There is also another region of approximately 240 nt in the VP1 coding region (nt 620 to 860 of VP1) where the similarity to the Albanian strains falls to 92%.

The above result leads to the assumption that this small part of VP2 is the product of a recombination event. Natural genetic exchange within the capsid region appears to be rare (1, 10), but a recombination event in the VP2 gene was never mentioned before. Sequence analysis of this part of the genome with BLAST software indicated a high degree of homology (81%) with PV1 strain isolated in China in 1991 (CHN-Yunnan/92) (5). As shown in Fig. 1, bottom, the homology of the Greek and the Chinese strains ranges between 67% and 88% in different genomic regions and the only part of the genome where this homology exceeds the homology with the Albanian strains is the region of the 200 nt of VP2. According to these results we can assume that there was a recombination event in the VP2 gene, but the 81% similarity is not high enough to prove that the Chinese strains are the donors of the inserted sequence. Potentially, the donor is a descendant of the Chinese strains.

As shown by the Simplot analysis there is also another genomic region in the VP1 gene (nt 620 to 860 of VP1) where the similarity of the Greek strains with the Albanian strains falls to 92%. Nucleotide substitutions accumulate at a rate of

approximately 1 to 2% per year during an epidemic (8). For this reason, this 8% nucleotide difference couldn't be attributed to the accumulation of nucleotide substitutions, as the Greek and the Albanian isolates circulated at the same period.

In conclusion the nucleotide sequence analysis revealed that there has been a recombination event in the VP2 coding region. The Greek isolates seem to be the product of recombination of the Albanian strains with an unknown virus. The similarity of the inserted sequence to the respective sequence of the type 1 polioviruses isolated in China in 1991 to 1993 can lead to the hypothesis that an offspring of the Chinese isolates is the donor of the unknown sequence.

The present work was cofunded by the European Union (75%) and the Greek Ministry of Education (25%) under the framework of the Education and Initial Vocational Training Program "Pythagoras II."

This is research project "Molecular Detection of Enteroviruses in Clinical Samples and the Environment: Implications for the Public Health," code 52213.11.

REFERENCES

1. Blomqvist, S., A. L. Bruu, M. Stenvik, and T. Hovi. 2003. Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.* 84:573-580.
2. Blomqvist, S., A. Skyttä, M. Roivainen, and T. Hovi. 1999. Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR-hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* 37:2813-2816.
3. Caro, V., S. Guillot, F. Delpeyroux, and R. Crainic. 2001. Molecular strategy for "serotyping" of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82:79-91.
4. Casas, I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 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.
5. Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Progress toward interruption of wild poliovirus transmission—worldwide, January 2004-March 2005. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 54:408-412.
6. Fiore, L., D. Genovese, E. Diamanti, S. Catone, B. Ridolfi, B. Ibrahimi, R. Konomi, H. G. van der Avoort, T. Hovi, R. Crainic, P. Simeoni, and C. Amato. 1998. Antigenic and molecular characterization of wild type 1 poliovirus causing outbreaks of poliomyelitis in Albania and neighboring countries in 1996. *J. Clin. Microbiol.* 36:1912-1918.
7. Karakasiliotis, I., P. Markoulatos, and T. Katsorchis. 2004. Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol. Cell. Probes* 18:103-109.
8. Kinnunen, L., A. Huovilainen, T. Pöyry, and T. Hovi. 1990. Rapid molecular evolution of wild type 3 poliovirus during infection in individual hosts. *J. Gen. Virol.* 71:317-324.
9. Lofe, K. S., R. C. Bollinger, R. S. Paranjape, D. Gadkari, S. S. Kulkarni, N. G. Novak, R. Ingersoll, H. W. Sheppard, and S. C. Ray. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73:152-160.
10. Martin, J., E. Samoilovich, G. Dunn, A. Lackenby, E. Feldman, A. Heath, E. Svirchevskaya, G. Cooper, M. Yermolovich, and P. D. Minor. 2002. Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* 76:10921-10928.
11. Marturano, J., and L. Fiore. 2002. Investigation of the presence of recombinant polioviruses in the hit population in Albania during the 1996 outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 40:316-317. (Letter.)
12. Mulders, M. N., J. H. Reimerink, M. Stenvik, I. Alaeddinoglu, H. G. van der Avoort, T. Hovi, and M. P. Koopmans. 1999. A Sabin vaccine-derived field isolate of poliovirus type 1 displaying aberrant phenotypic and genetic features, including a deletion in antigenic site 1. *J. Gen. Virol.* 80:907-916.
13. Oberste, M. S., W. A. Nix, K. Maher, and M. A. Pallansch. 2003. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J. Clin. Virol.* 26:375-377.
14. Prevots, D. R., M. L. Ciofi degli Atti, A. Sallabanda, E. Diamante, R. B. Aylward, E. Kakariqi, L. Fiore, A. Ylli, H. van der Avoort, R. W. Sutter, A. E. Tozzi, P. Panei, N. Schinaia, D. Genovese, G. Oblapenko, D. Greco, and S. G. Wassilak. 1998. Outbreak of paralytic poliomyelitis in Albania, 1996: high attack rate among adults and apparent interruption of transmission following nationwide mass vaccination. *Clin. Infect. Dis.* 26:419-425.
15. Siafakas, N., A. Georgopoulou, P. Markoulatos, and N. Spyrou. 2000. Isolation of polioviruses and other enteroviruses in south Greece between 1994 and 1998. *J. Clin. Lab. Anal.* 14:157-163.

Molecular identification and full genome analysis of an echovirus 7 strain isolated from the environment in Greece

Zaharoula Kyriakopoulou · Evaggelos Dedepsidis · Vaia Pliaka ·
Panayotis Mastorakos · Anastassia Stamati · Anastassia Pratti ·
Stamatina Levidiotou-Stefanou · Panayotis Markoulatos

Received: 10 September 2009 / Accepted: 30 December 2009 / Published online: 22 January 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Two enteroviruses from river water and four from sewage treatment plant were isolated in Larissa, Greece, that all shared the same sequence. A full genome analysis was conducted in an attempt to reveal the evolutionary pathways of one of the isolated strains (LR11F7). VP1 nucleotide and phylogenetic analysis revealed that the isolated strain had 78% homology with the echovirus 7 prototype strain Wallace. Full genome analysis revealed that LR11F7 P1 region is related to echoviruses 7 and that P2 and P3 regions are originating from contemporary enteroviruses isolated in South Asia. Two recombination events were shown to be involved into the evolutionary history of LR11F7, the one event concerning 3A, 3B, and 2C, and the other concerning 3D genomic region, both with new types of HEV-B. The contribution of recombination to enterovirus evolution is substantial, giving rise to new genetic lineages with unknown properties.

Keywords Enteroviruses · Environment · Recombination

Introduction

Human enteroviruses belong to the genus *Enterovirus*, family *Picornaviridae*. According to the degree of their genetic relatedness, they are divided into seven species:

HEV-A (CAV-2, -3, -5 to -8, -10, -12, -14, -16, EV71, EV76, EV89-92, and SV19, SV43, SV46, and A13), *HEV-B* (CBV-1 to -6, CAV-9, all echoviruses, EV69, EV73-75, EV77-80, EV81-88, EV93, EV97-98, EV100-101, EV106-107, and SA5), *HEV-C* (PV-1, -2, -3, CAV-1, -11, -13, -17, 19-22, -24, EV95-96, EV99, EV102, EV104-105, EV109), *HEV-D* (EV68, EV70, and EV94), *HRV-A* (HRV-1, -2, -7 to -13, -15, -16, -18 to -25, -28 to -34, -36 to -38, -39 to -41, -43 to -47, -49 to -51, -53 to -68, -71, -73 to -78, -80 to -82, -85, -88 to -90, -94 to -96, -98, and -100), *HRV-B* (HRV-3 to -6, -14, -17, -26, -27, -35, -37, -42, -48, -52, -69, -70, -72, -79, -83, -84, -86, -91 to -93, -97 and -99, and *HRV-C*.

Enteroviruses are non-enveloped viruses with a 7500-nt single-stranded positive RNA genome protected by an icosahedral capsid. The enterovirus genome consists of three major regions: the 5′ untranslated region (5′ UTR), the open reading frame (ORF), and the 3′ untranslated region (3′ UTR). ORF is translated into a single polypeptide and is then processed to generate four structural (VP1–VP4) and seven non-structural (2A–2C and 3A–3D) proteins.

Enteroviruses are transmitted by fecal–oral route and multiply in gastrointestinal and respiratory tract. Infected people, symptomatic or asymptomatic, shed enteroviruses in large amounts in the environment by their feces. Despite the reduction of viral amount following sewage treatment, enteric viruses can contaminate environmental waters [1]. They can spread to river, lake waters, and the sea causing a potential risk for public health by rejoining the food chain. The environmental surveillance constitutes an efficient tool for estimating the extent and the duration of enterovirus circulation in a population [2–4]. Wastewater screening can be used to reveal wild poliovirus transmission, as well as to evaluate the efficiency of poliomyelitis immunization campaigns [5]. Environmental surveillance constitutes a sensitive method for monitoring enteroviruses, as just one

Z. Kyriakopoulou · E. Dedepsidis · V. Pliaka · P. Mastorakos ·
A. Stamati · A. Pratti · P. Markoulatos (✉)
Department of Biochemistry & Biotechnology, University of
Thessaly, 26, Ploutonos & Aeolou Str., Larissa 41221, Greece
e-mail: markoulatos@bio.uth.gr

S. Levidiotou-Stefanou
Department of Microbiology, Medical School, University
of Ioannina, Ioannina, Greece

individual shedding poliovirus can be detected among 10,000 inhabitants [6].

Enteroviruses, like other RNA viruses, have high mutation rate due to the lack of proofreading activity during genome replication. It has been estimated that the rate of mutations is one mutation per genome per replication cycle [7]. In addition, recombination plays a paramount role in the evolution of enteroviruses. Natural genetic recombination has been reported among vaccine strains of polioviruses, vaccine, and wild-type polioviruses, or even vaccine and non-polio enterovirus strains [8–12]. Recombination events have been reported also in wild polioviruses [13, 14]. Although recombination has been recognized as a main event in poliovirus evolution, several recent publications have revealed that it is also frequent in non-polio enteroviruses [9, 15–17]. Genetic exchanges between enteroviruses can give rise to new viral genotypes that may be extremely virulent and dangerous for public health. Recombinant strains of polioviruses have been detected from environmental samples [18]. Environmental surveillance could be a useful tool for the study of enterovirus evolution, as long as a great number of enteroviruses can be isolated from environmental samples.

In this study, an echovirus 7 (E7) strain isolated from the environment, circulating in the city of Larissa, Greece, is described, as enteroviruses are among the most important emerging waterborne pathogens. A full genome analysis was conducted in an attempt to reveal the evolutionary pathways of the isolate, the detailed analysis of genetic differences between the environmental strain LR11F7 and that of the prototype strain of E7-Wallace and finally the phylogenetic relationships with other E7 isolates, as well as, with other *Human Enteroviruses B* was performed. Our study indicates that recombination events may play major role in enteroviruses evolution and that circulation of multi-recombinant strains with unknown properties could be potentially dangerous for public health.

Materials and methods

Isolation of enteroviruses from river water and sewage samples

Environmental samples from the city of Larissa, Thessaly, Greece—two samples from the sewage treatment plant and four samples from Pinios River, where the treated sewage are discarded—were analyzed during a 4-month period, from July to September 2005. The samples arrived in the laboratory within an hour and were treated the same day. Two enteroviruses from river water (B11D2 and B11E6) and four from sewage (LR11F7, LR11E2, LR11E7, and LR11E6) were isolated.

Sample processing

The samples were concentrated by the two-phase separation method proposed by WHO [19]. 50 µl of each concentrate was inoculated onto confluent monolayers of Rhabdomyosarcoma (Rd), Hep-2, and L₂₀B cells, which were grown in 96-well plates in Eagle minimum essential medium (MEM) containing 1% fetal calf serum (FCS). After absorption of the viruses for 2 h at 37°C, the medium in each well was replaced by 100 µl of Eagle MEM supplemented with 1% FCS and the 96-well plates were incubated at 37°C for 5–6 days. Then the plates were frozen and thawed thrice, before a second passage was performed. The same procedure was repeated, for the third passage. The contents of the wells in which cytopathic effects (CPE) were observed were inoculated into a 25-cm² flask to confirm CPE. In order to avoid viral mixtures, tenfold serial dilution was prepared and inoculated into 96-well plates. The last dilution in which CPE was observed was inoculated into a 25-cm² flask containing cells. The presence of enterovirus was confirmed by PCR with primer pair UG52/UC53 [20], subsequent to RNA extraction and reverse transcription. Finally, two enterovirus strains from river water and four from sewage were detected (isolated on Rd cells).

VP1 amplification and characterization of the isolates

Enterovirus RNA was extracted from 100 µl of the inoculated cell cultures according to the method described by Casas et al. [21] and stored at –20°C until further analysis. The isolated RNA was reverse transcribed into cDNA as previously described [12]. For VP1 amplification of the isolates and characterization of the viruses, PCR with primer pair 292/222 was performed [22]. PCR products were sequenced at Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

Genome amplification

During this study, there was an attempt to obtain sequence information from all genomic regions of the cell cultured viruses. Table 1 shows details of the primers that were used, including their sequences and the genomic area that they specifically amplify. Fourteen of these primers were used for the first time in this study. They were designed with the aid of Primer3 software, obtained online from the Whitehead Institute (http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/). For the design of primer pairs CHR3/CHR4 and CHR5/CHR6, the sequences of all *HEV-B* prototype strains were used. All of the other primer pairs were designed based on the sequences of the virus isolate LR11F7, as all the isolates revealed 99% similarity in every sequenced genomic area. All primers were synthesized by Metabion (Martinsried, Germany).

Table 1 Primers used in this study

Primer	Position	Polarity	Sequence (5'–3')	References
72437	001–020	Sense	TTAAAACAGCTCTGGGGTTG	[42]
216616	545–565	Antisense	GAAACACGGACACCCAAAGTA	[43]
0340F	310–333	Sense	TAGATCAGGCYGATGAGTCACCGC	[32]
1200R	1177–1196	Antisense	GGGAATTTCCACCACCACCC	[32]
AL897	897–1007	Sense	GGAAGTTTACCGAGCCAGTT	This study
AR3091	3071–3091	Antisense	TTGTTTCAGAGCGTTGTAGGC	This study
AL939	939–959	Sense	TGCCTGCTCTAAACTCACCA	This study
AR2751	2731–2751	Antisense	GCACCATCCTTCTTGCAATT	This study
AL1632	1632–1652	Sense	GCACCCTTGATTACACTGC	This study
AR2180	2160–2180	Antisense	CATTGCCTGTTTCCTGTTTCG	This study
292	2612–2627	Sense	MIGCIGYIGARACNGG	[22]
222	2969–2951	Antisense	CICIGIGGIIAYRWACAT	[22]
ZL2550	2550–2570	Sense	AGACGGGGCATACATCACAG	This study
ZR3040	3040–3060	Antisense	TACCCCATTTTTCGAGAAGT	This study
EUG3a	2946–2965	Sense	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	[23]
EUG3b	2946–2965	Sense	TGGCAAACATCTTCMAATCC	[23]
EUG3c	2946–2965	Sense	TGGCAGACTTCAACHAACCC	[23]
EUC2	4413–4433	Antisense	TTTGCCTTGAAGTGTATGTA	[23]
EUC2a	4428–4448	Antisense	GGTTCAATACGGCATTTC	[23]
EUC2b	4428–4448	Antisense	GGTTCAATACGGTGTTCGCT	[23]
CHR1	4284–4308	Sense	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT	[32]
CHR2	5084–5081	Antisense	GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKA	[32]
AL4872	4872–4892	Sense	CCTGTGATGAGGAGTGTTCG	This study
AR5275	5255–5275	Antisense	GAGACAAACGTGGTGAGTGC	This study
CHR3	5047–5065	Sense	CIACYCTWGARGCRCTVTT	This study
CHR4	5860–5841	Antisense	GACRTGAGIACHCCRCCRCA	This study
5850F	5837–5859	Sense	CAGTGYGGIGGIGTICTCATGTC	[44]
6500R	6531–6506	Antisense	AGRTTGCCAAAYGTYTGCTCATTGC	[44]
CHR5	6485–6507	Sense	ATCCAGYTTGAAYGAYTCIGIRG	This study
CHR6	7250–7227	Antisense	GAAYTCYTCRTAYTCKTGCTCYCC	This study

The reverse transcription was performed as has been previously described [12] for all primer pairs, with the exception of EUC2, EUG3a, EUG3b, and EUG3c, for which a RT with the anti-sense primers EUC2a and EUC2b was carried out [23].

The cDNA produced was amplified by PCR, using a reaction mixture of 50 µl/tube containing 3 µl from each cDNA, 1 µl of each primer at a concentration of 25 pmol/µl, 5 µl 10× PCR reaction buffer, 5 µl dNTPs 10 mM, 2.5 units Paq5000 DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, USA), and double-distilled nuclease-free water up to a final volume of 50 µl/tube. The reaction was carried out using an Eppendorf Mastercycler. An initial, hot-start step at 95°C for 2 min was applied. Specific details of PCR reaction with primers designed in this study regarding number of cycles, primer annealing temperatures, and duration of each step are shown in Table 2. For the other primer pairs, PCR conditions were the same as those described in the original papers (Table 1).

A final step of 5 min at 72°C completed the PCR reaction. 10 µl of each amplified product was analyzed by agarose gel electrophoresis in 2% ultrapure electrophoresis grade agarose gel (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) containing 1 µg/ml ethidium bromide in Tris–Borate–EDTA buffer.

Sequencing and sequence analysis

Purification of PCR products was carried out directly from 2% agarose gels using PCR gel extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Both clones were sequenced by Macrogen Inc., using the primers described in Table 1.

Initial identification of the genomic sequences obtained was carried out by comparing them with all available sequences in the database using BLAST software, obtained online from the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Table 2 PCR conditions for each new primer pair used in this study

Primer pairs	PCR conditions		
CHR3-CHR4	Denaturation	95°C for 30 s	40 cycles
CHR5-CHR6	Annealing	45°C for 1 min	
	Extension	72°C for 1 min	
AL1632-AR2180	Denaturation	95°C for 30 s	35 cycles
ZL2550-ZR3040	Annealing	55°C for 30 s	
	Extension	72°C for 30 s	
AL939-AR2751	Denaturation	95°C for 30 s	35 cycles
	Annealing	55°C for 30 s	
	Extension	72°C for 1.5 min	
AL897-AR3091	Denaturation	95°C for 30 s	35 cycles
	Annealing	55°C for 30 s	
	Extension	72°C for 2 min	
AL4872-AR5275	Denaturation	95°C for 30 s	35 cycles
	Annealing	58°C for 30 s	
	Extension	72°C for 30 s	

Multiple sequence alignments were generated using ClustalW software, obtained online from the web site of the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Phylogenetic trees and the confidence values (bootstrap values) were carried out by neighbor-joining method using MEGA version 4 software. For the full genome phylogenetic analysis, complete genome sequences of representative prototype HEV-B, as well as those of the two echoviruses 7 and other *HEV-B* isolates, deposited in GenBank, that showed high similarity in BLAST were used. For the epidemiology study, a phylogenetic tree was inferred with a 293-nt segment of the VP1 genomic region (from positions 2996 to 3288 within the genome), as it spanned most of the available sequences of E7 isolates in GenBank. Finally, nucleotide similarity plots between the aligned sequences were created with the aid of SimPlot software (version 2.5), with a window size of 400 nt, in an attempt to observe genomic regions that display significant percentages of nucleotide sequence identity, providing indications of possible recombination events throughout the genome. The accession numbers of the reference and other enterovirus strains that were used for the full genome computational analysis and phylogenetic analysis of VP1 genomic region are presented in Table 3.

Nucleotide sequence accession number

The almost complete genomic sequence of isolate LR11F7 (from nucleotides 1 to 7179) has been deposited in the GenBank library under accession number FJ460595.

Table 3 Enterovirus strains that were used for the full genome analysis and the phylogenetic analysis of VP1 coding region and their corresponding accession number

Virus	Strain	Accession number
CAV9	Griggs	D00627
CBV3	Nancy/Connecticut/US/49	M33854
CBV4	JVB/New York/US/51 (Benschoten)	X05690
CBV4	E2	AF311939
E3	Morrissey/Connecticut/US/51	AY302553
E5	Noyce/Maine/54	AF083069
E6	D'Amori (Rhode Island/55)	AY302558
E6	EV6-10887-99 from Russia	AY896760
E6	EV6-14103-00 from Russia	AY896761
E7	UMMC	AY036578
E7	EV7-15936-01 from Azerbaijan	AY896765
E7	95CF993	AJ241447
E7	T187-ARG96	AF403783
E7	PER98-2533	AF081630
E7	GA93-1765	AF081608
E7	GA93-1894	AF081610
E7	10420	AY919404
E7	SLC	DQ227458
E7	CF1851031-05	AM236932
E7	MG-44381-98	AJ279195
E7	172-98	AB268178
E7	19-00	AB268182
E7	34-98	AB268183
E7	177-00	AB268180
E7	178-00	AB268181
E7	137-98	AB268177
E7	176-97	AB268179
E11	EV11-18744-02 from Moldova	AY896764
E12	Travis (Philippines/53) (wild-type)	X79047
E16	Harrington (Massachusetts/51)	AY302542
E19	Burke (Ohio)	AY302544
E19	K/542/81	AY167107
E25	JV-4 (Washington DC/57)	AY302549
E30	Bastianni (New York/58)	AF162711
EV74	USA/CA75-10213	AY556057
EV75	USA/OK85-10362	AY556070
EV85	BAN00-10353	AY843303
EV86	BAN00-10354	AY843304
EV88	BAN01-10398	AY843306
EV100	BAN2000-10500	NC009887
EV97	DT94-0227	AB426611
EV79	NH95-0601	AB426610
EV107	TN94-0349	AB426609
SVDV02		EU887279

Results

Primary characterization of enteroviruses

Partial sequencing of the VP1 genomic region identified the six enteroviruses as belonging to E7 serotype, considering that the nucleotide and the amino acid sequence identity of VP1 region of the isolates was 78% (>75%) and 93% (>88%), respectively, compared to that of the prototype strain [24].

Full genome nucleotide analysis

The six isolates showed 99–100% similarity in all sequenced regions leading to the assumption that it is the same virus isolated from both, the river water and the sewage treatment plant. Based on this, LR11F7 isolate was selected for the full genome analysis. The almost full genome sequence of LR11F7 (from 1 to 7179 nt of the viral genome) was obtained, missing the 3' end of 3D genomic region and the 3' UTR. For genome analysis of the LR11F7 isolate, available information from the complete genomes of all *HEV-B* prototype strains as well as those information of the two E7 isolates deposited in GenBank were used.

As shown in Table 4, P3 region has the highest degree of identity (nt 79%, aa 96%) with the reference strain E7 Wallace, followed by regions P2 (nt 79%, aa 95%) and P1

(nt 78%, aa 94%). The gene with the highest similarity is 2C (81%) and the one with the lowest is 2A (76%).

Comparison of almost the full genome of LR11F7 with the sequences of all prototype strains of *HEV-B* group, as well as with the sequences of the E7 isolates UMMC and EV7-15936-01, was performed. The genomic regions 5' UTR, P1, P2, and P3 were aligned separately. Nucleotide similarity of 5' UTR region with the prototype strain was 85%. This same region showed high similarity (88%) with the prototype strain EV75. The phylogenetic relationships of the above strains are presented in the phylogenetic tree of 5' UTR (Fig. 1). The highest nucleotide similarity of P1 region, (82%), was with E7 isolates, UMMC and EV7-15936-01. VP4 was the capsid protein with the highest similarity (85%) between LR11F7 and the two E7 isolates, UMMC and EV7-15936-01. Comparison of P2 region with the *HEV-B* respective regions revealed the highest similarity with TN94-0349 strain (84%), and of P3 region with those of EV86 (87%).

Phylogenetic analysis

Figure 1 shows phylogenetic trees derived separately for each genomic region. The LR11F7 clustered with the other E7 isolates and the reference strain E7 Wallace in the phylogenetic trees determined with gene sequences encoding the capsid proteins. The only exception was observed with VP4 capsid region where the reference strain is clustering separately; fact that indicates that there is no absolute correlation between serotype and genotype in this region [25].

An interruption of the serotype–genotype correlation is observed in phylogenetic trees for non-capsid regions and there is a different classification for each gene. Nevertheless, LR11F7 shows a tendency for grouping with recent enteroviruses isolated later than 1999 in the non-capsid regions, starting from 2B region downstream to the end. It is worth pointing out that phylogenetic trees for 2C, 3A, and 3B regions revealed that LR11F7 is consistently clustering with strain NH95-0601. The strain NH95-0601 belongs to EV79 serotype, isolated from Japanese travelers returning from Southeast Asia (Yamashita et al., unpublished data).

SimPlot analysis

SimPlot analysis of full genome isolate LR11F7 is presented in Fig. 2. The similarity analysis indicated that, in the genomic region encoding the capsid proteins, the LR11F7 isolate displayed the highest similarity with the other E7 strains. A convergence with *HEV-B* strains in the regions coding for functional proteins is observed.

Table 4 Nucleotide and aminoacid sequence identity between LR11F7 and E7 Wallace

Genetic region	Nucleotide identity (%)	Amino acid identity (%)
5' UTR	85	–
P1	78	94
VP4	79	100
VP2	78	93
VP3	79	94
VP1	78	93
P2	79	95
2A	76	91
2B	78	93
2C	81	98
P3	79	96
3A	79	96
3B	78	95
3C	79	96
3D ^a	79	97

^a 1238 nt of 3D genomic region

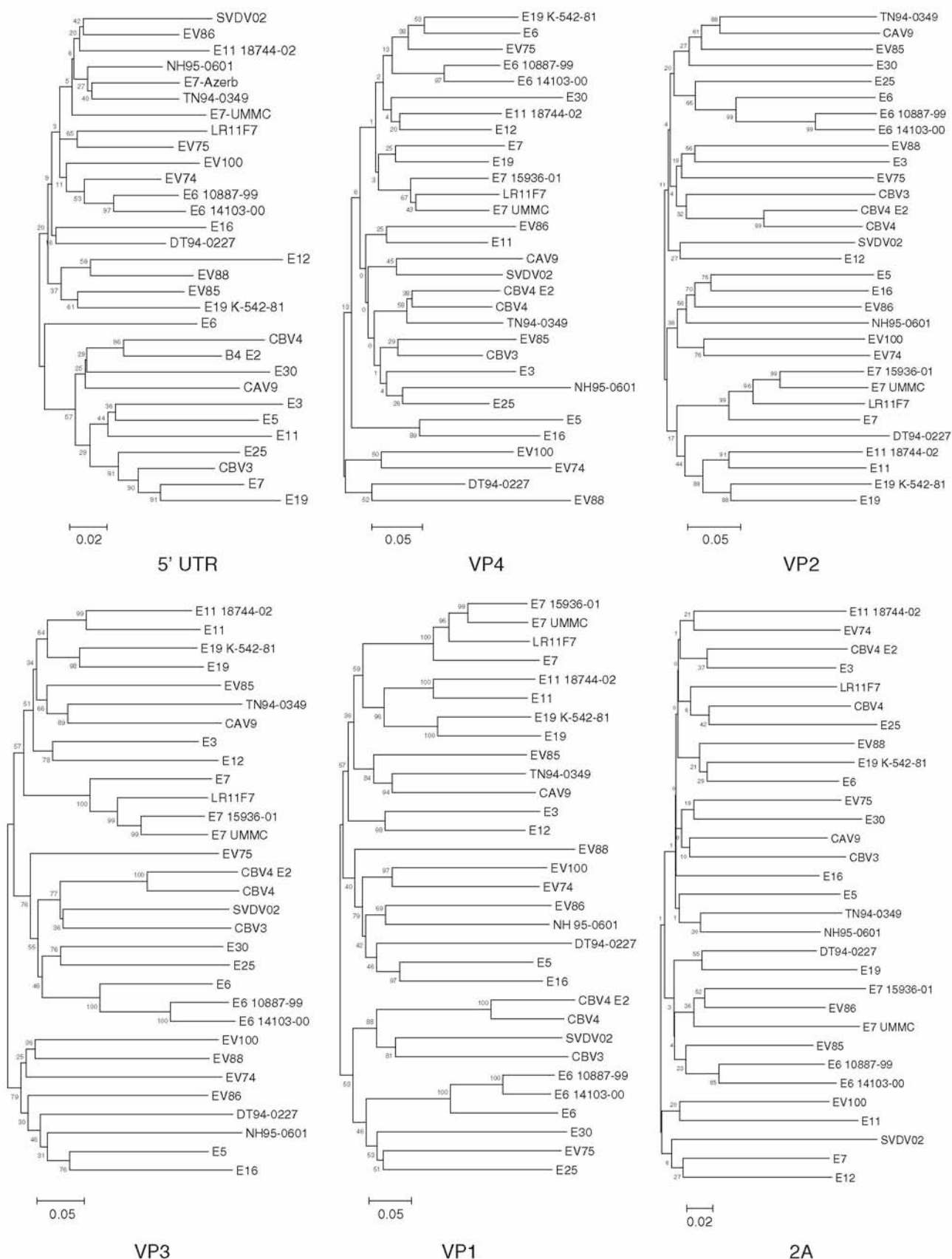


Fig. 1 Phylogenetic trees of all sequenced regions of LR11F7 with other *HEV-B* strains

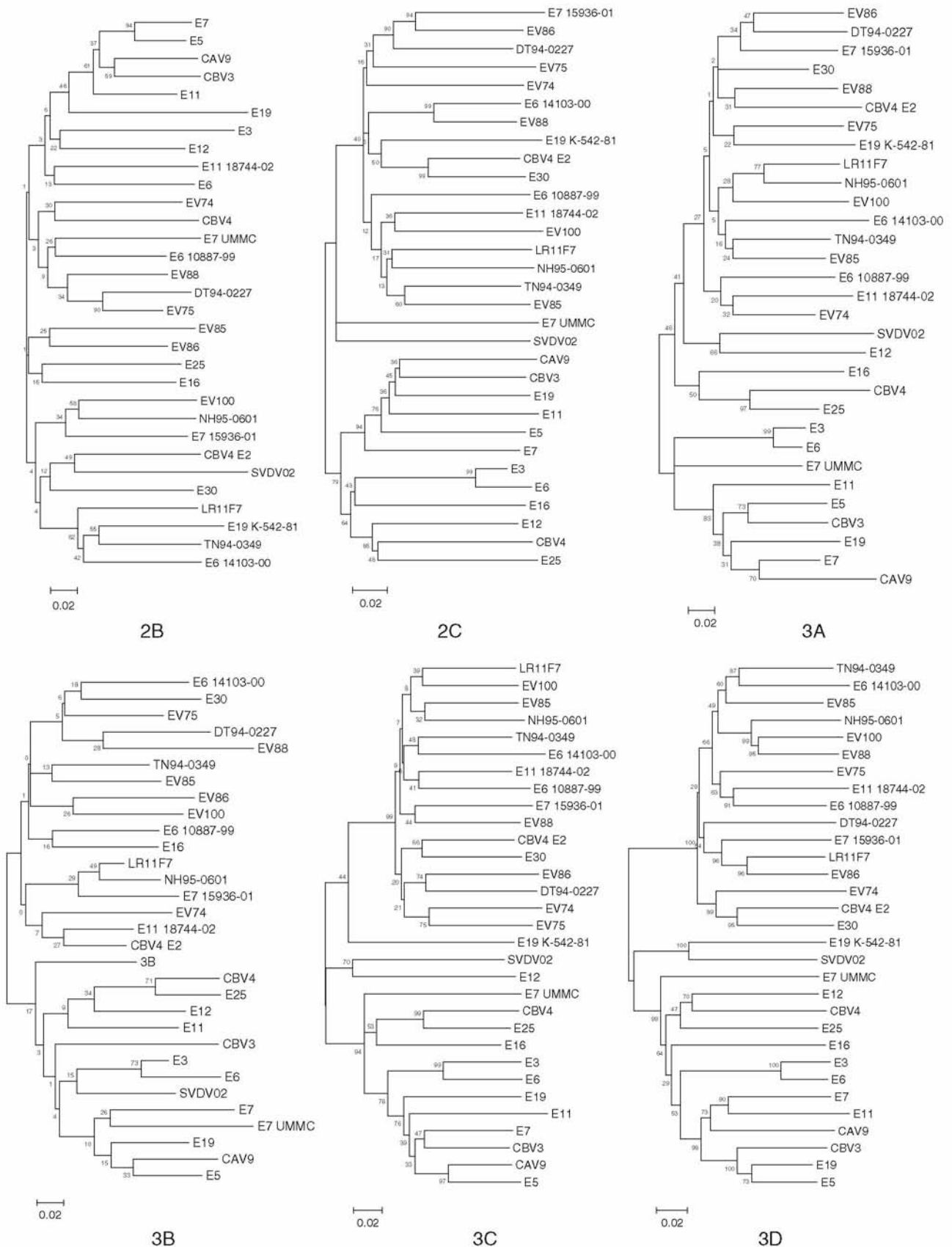


Fig. 1 continued

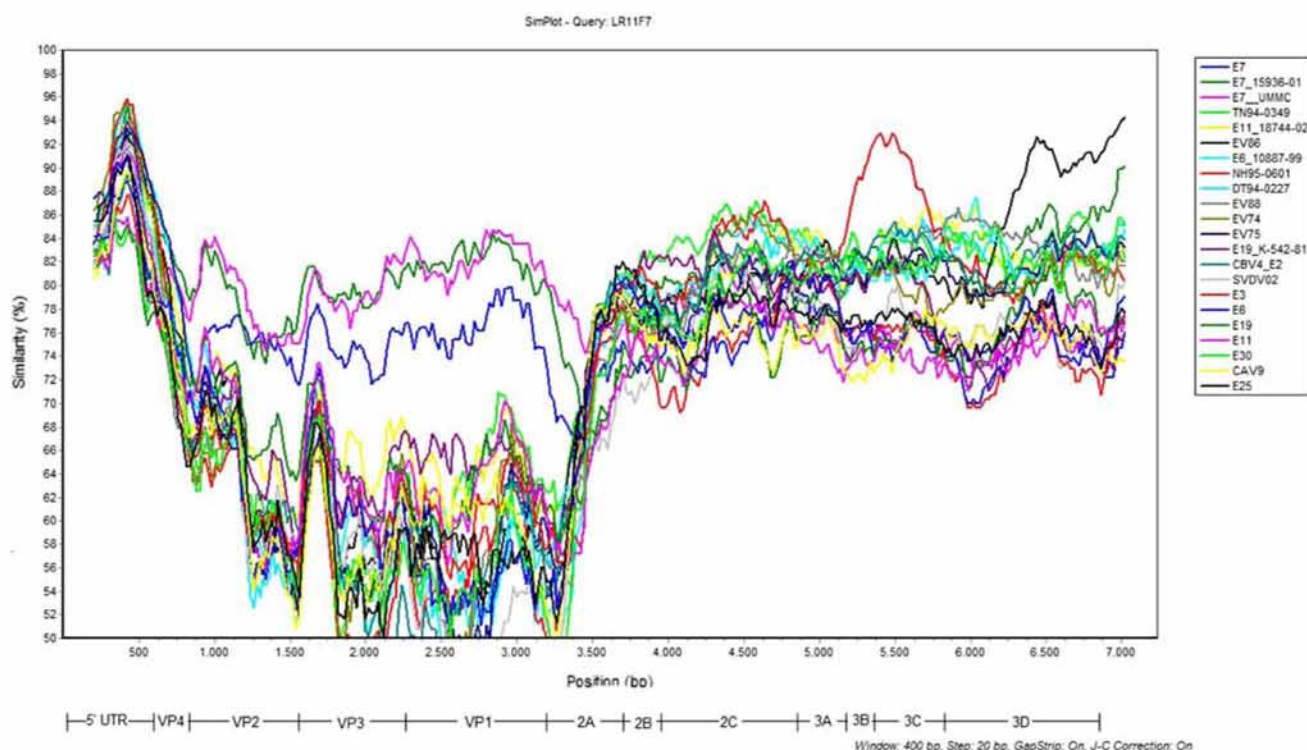


Fig. 2 Full genome SimPlot analysis of LR11F7

However, an increased homology of LR11F7 is observed with the enterovirus NH95-0601 beginning at the 3A region and ending at the beginning of 3C. The highest similarity of LR11F7 with the EV79 strain is in 3B region, with a value approaching 93%. Following this region the homology drops, whereas in 3D region an increased homology with EV86 is observed reaching 90%. These sharp changes in similarity of strains in the above-mentioned regions probably reveal two recombination events with donors NH95-0601 and EV86 or their descendants.

Relationships with other E7 isolates

Only few E7 isolates have been partially sequenced and their sequences are published in GenBank. For this reason, in order to correlate LR11F7 with other E7 isolates, a 293-nt region (2996–3288 nt) of VP1 was chosen, as it lies within most of the available sequences. As shown in Fig. 3, the Greek isolates cluster together with enteroviruses 95CF993, isolated in France in 1995, and T187-ARG96 isolated in Argentina in 1996. On the other hand, there is a clustering of LR11F7 with E7 strains isolated in China during 1997–2000 (176-97, 137-98, 178-00, 177-00, 34-98, 19-00, and 172-98), supported by low bootstrap value, and not with the recent European isolates.

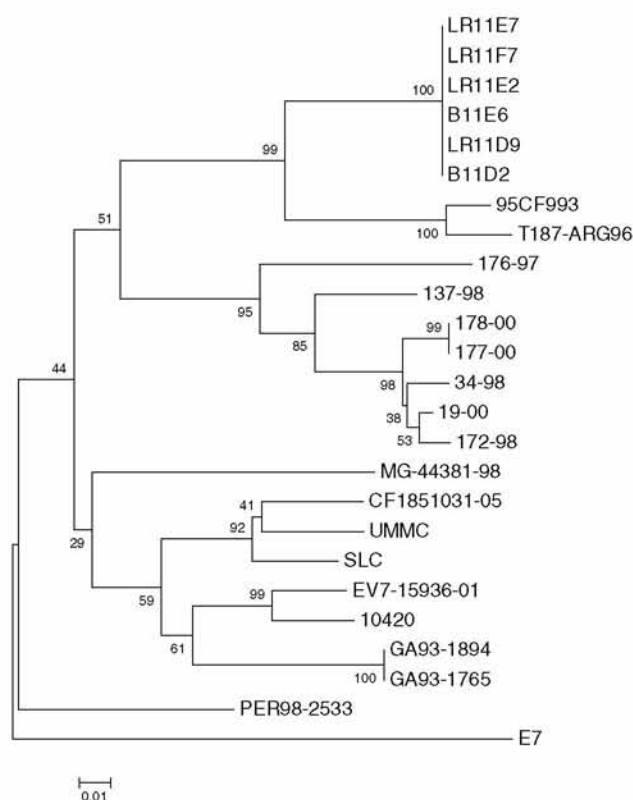


Fig. 3 Phylogenetic tree of part of VP1 of LR11F7 with other E7 strains

Discussion

A lot of published research work denotes the need of surveying the environment for assessing the poliovirus circulation in a community. Environmental surveillance along with healthy children stool surveys was successfully used to demonstrate wild and vaccine-derived poliovirus transmission in a community [6, 26–28]. In addition, environmental surveillance has revealed the existence of polioviruses strains recombined with other poliovirus strains or with non-polio enteroviruses strains [12]. Existing research information on environmental samples has further revealed non-polio enterovirus strains [3, 29, 30], but there are only few cases of non-polio enteroviruses isolated from sewage or other environmental samples which have been partially or fully sequenced [31, 32].

In this study, there was an attempt to investigate the circulation of enteroviruses in sewage and river water in the city of Larissa. Two enteroviruses from river water and four from sewage treatment plant were isolated. Comparison of nucleotide sequences of these six isolates revealed that all of them share exactly the same genotype, indicating that the treated sewages discarded in the river have the potential of passing to the food chain.

The full genome sequence of the isolated virus was obtained. For the characterization of this enterovirus, a nucleotide and amino acid comparison of its VP1 genomic region with those of prototype strains of enteroviruses was conducted. This comparison showed 78% nucleotide similarity and 93% amino acid homology with E7 Wallace strain. In accordance with the tendency of latest years that the serotype identification of enteroviruses should be based on the criterion of sequence similarity of VP1 with a reference strain in GenBank higher than 75% (or amino acid sequence homology more than 88%), LR11F7 is classified as an E7 strain [24]. Phylogenetic analysis of VP1 genomic region (Fig. 1) grouped LR11F7 with reference E7 strain, supporting the molecular classification of the Greek isolate.

From the phylogenetic analysis of part of VP1 region of LR11F7 and of other E7 isolates, it is obvious that there is a correlation of the Greek isolate with E7 viruses isolated in France in 1995, and in Argentina in 1996. At the same time, there is not high similarity with the Chinese isolates or with any other isolate deposited in GenBank. It is difficult to come to a sound conclusion about the origin of the Greek isolate, since enteroviral sequences deposited in GenBank are extremely few, not only for the whole genome but also for VP1 region and for epidemiological studies, a great number of available sequences will be necessary.

With respect to the phylogenetic analysis conducted for all the genomic regions, separately, LR11F7 was found to

be complying with the general rule for enteroviruses concerning the interruption of serotype–genotype correlation in the region of non-structural proteins, a correlation which is present in the capsid protein region [31–34]. In contrast to previous phylogenetic studies [9, 17, 32, 35] in non-structural proteins of modern *HEV-B*, where their evolutionary relationship with the prototype strains E30, E1, and E9 was revealed, LR11F7 is clustering together with recent enteroviruses that all were isolated in South Asia later than 2000. These data may lead to the hypothesis that there is a different evolutionary pressure in non-capsid protein regions, as was also shown recently for 2A, 2B, and 2C genomic regions [36]. However, there is also the chance that phenomena of genetic exchanges may have taken place in common ancestors of these new enteroviruses and that the recombined viruses followed different evolutionary pathways, explaining by this way their close phylogenetic relationship in this part of the genome.

The high conservation of P2 and P3 regions within an enterovirus species [37, 38] was also supported in the case of LR11F7 by SimPlot analysis. The correlation of LR11F7 with recent viruses characterized as new types of enteroviruses [39], in functional genomic region, is obvious. LR11F7 seems to share the 3A–3B–5′ end of 3C region with NH95-0601 and a part of the 3D gene with EV86, both isolated in south Asia and characterized as new types of *HEV-B*.

Our findings indicate South Asia as a possible origin of LR11F7 virus. Great evolutionary events may have taken place in that specific geographical region in enteroviruses by mixing their genomes through recombination events giving rise to a strain that passing to Greece had its own evolutionary history. Analysis of sequence phylogenies between different parts of the genome has led to the concept of semi-independent evolution of structural and non-structural genes in such a way that enteroviruses circulating worldwide are conceptualized as a population of serologically distinct capsid genes recombining with a range of non-structural genes with transient epidemiological linkage between genome regions associated with episodic spread of individual recombinants. In previous studies, full genome analysis of recombinant epidemic Echo 11 isolates revealed profound differences in pathogenicity, associated with nucleotide transitions in 5′ UTR and VP1 genomic regions [40, 41]. Understanding the tempo and mode of picornavirus evolution are of major importance in the control of pathogenesis of enteroviruses. As sequence data become more available, the evolutionary studies of enteroviruses will be facilitated, new sequence variants will be studied and new features of the evolution of *HEV-B* genotypes will be revealed. This study indicates also that recombination events may play major role in enteroviruses evolution and that circulation of multi-recombinant strains

with unknown properties could be potentially dangerous for public health.

Acknowledgments The study was supported by research grants of the Postgraduate Program “Biotechnology,” code 3439, of the Department of Biochemistry & Biotechnology, School of Health Sciences, University of Thessaly.

References

1. D.W. Griffin, K.A. Donaldson, J.H. Paul, J.B. Rose, *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 129 (2003)
2. R. Pallin, A.P. Wyn-Jones, B.M. Place, N.F. Lightfoot, *J. Virol. Methods* **67**, 57 (1997)
3. Y.S. Shieh, R.S. Baric, M.D. Sobsey, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4401 (1997)
4. G. Sedmak, D. Bina, J. MacDonald, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7181 (2003)
5. T. Poyry, M. Stenvik, T. Hovi, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 371 (1988)
6. T. Hovi, M. Stenvik, H. Partanen, A. Kangas, *Epidemiol. Infect.* **127**, 101 (2001)
7. J.W. Drake, J.J. Holland, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 13910 (1999)
8. N.S. Cuervo, S. Guillot, N. Romanenkova, M. Combiescu, A. Aubert-Combiescu, M. Seghier, V. Caro, R. Crainic, F. Delpeyroux, *J. Virol.* **75**, 5740 (2001)
9. A.N. Lukashev, V.A. Lashkevich, O.E. Ivanova, G.A. Koroleva, A.E. Hinkkanen, J. Ilonen, *J. Virol.* **77**, 10423 (2003)
10. S. Blomqvist, A.L. Bruu, M. Stenvik, T. Hovi, *J. Gen. Virol.* **84**, 573 (2003)
11. I. Karakasiliotis, P. Markoulatos, T. Katsorchis, *Mol. Cell. Probes* **18**, 103 (2004)
12. E. Dedepsidis, Z. Kyriakopoulou, V. Pliaka, C. Kottaridi, E. Bolanaki, S. Levidiotou-Stefanou, D. Komiotis, P. Markoulatos, *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6697 (2007)
13. H.M. Liu, D.P. Zheng, L.B. Zhang, M.S. Oberste, M.A. Pallansch, O.M. Kew, *J. Virol.* **74**, 11153 (2000)
14. G. Dahourou, S. Guillot, O. Le Gall, R. Crainic, *J. Gen. Virol.* **83**, 3103 (2002)
15. J. Santti, T. Hyypiä, L. Kinnunen, M. Salminen, *J. Virol.* **73**, 8741 (1999)
16. G. Oprisan, M. Combiescu, S. Guillot, V. Caro, A. Combiescu, F. Delpeyroux, R. Crainic, *J. Gen. Virol.* **83**, 2193 (2002)
17. E. Bolanaki, C. Kottaridi, P. Markoulatos, Z. Kyriakopoulou, L. Margaritis, T. Katsorchis, *Virus Genes* **35**, 129 (2007)
18. S. Blomqvist, C. Savolainen, P. Laine, P. Hirttiö, E. Lamminsalo, E. Penttilä, S. Jöks, M. Roivainen, T. Hovi, *J. Virol.* **78**, 4876 (2004)
19. World Health Organization: Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF03/www737pdf>. Accessed 3 Mar 2003
20. A. Georgopoulou, P. Markoulatos, N. Spyrou, N.C. Vamvakopoulos, *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4337 (2000)
21. I. Casas, L. Powell, P.E. Klapper, G.M. Cleator, *J. Virol. Methods* **53**, 25 (1995)
22. M.S. Oberste, W.A. Nix, K. Maher, M.A. Pallansch, *J. Clin. Virol.* **26**, 375 (2003)
23. V. Caro, S. Guillot, F. Delpeyroux, R. Crainic, *J. Gen. Virol.* **82**, 79 (2001)
24. M.S. Oberste, K. Maher, D.R. Kilpatrick, M.R. Flemister, B.A. Brown, M.A. Pallansch, *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1288 (1999)
25. M.S. Oberste, K. Maher, M.A. Pallansch, *Virus Res.* **58**, 35 (1998)
26. Y. Manor, R. Handsher, T. Halmut, M. Neuman, A. Bobrov, H. Rudich, A. Vonsover, L. Shulman, O. Kew, E. Mendelson, *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1670 (1999)
27. M. Divizia, L. Palombi, E. Buonomo, D. Donia, V. Ruscio, M. Equestre, L. Leno, A. Panà, A.M. Degener, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3534 (1999)
28. T. Hovi, S. Blomqvist, E. Nasr, C.C. Burns, T. Sarjakoski, N. Ahmed, C. Savolainen, M. Roivainen, M. Stenvik, P. Laine, I. Barakat, M.H. Wahdan, F.A. Kamel, H. Asghar, M.A. Pallansch, O.M. Kew, H. E. Gary Jr., E.M. deGourville, L. El Bassioni, *J. Virol. Methods* **126**, 127 (2005)
29. Y.C. Shieh, R.S. Baric, J.W. Woods, K.R. Calci, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7130 (2003)
30. G. Sedmak, D. Bina, J. Macdonald, L. Couillard, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1042 (2005)
31. E. Bolanaki, C. Kottaridi, P. Markoulatos, L. Margaritis, T. Katsorchis, *Virus Genes* **31**, 307 (2005)
32. A.N. Lukashev, V.A. Lashkevich, O.E. Ivanova, G.A. Koroleva, A.E. Hinkkanen, J. Ilonen, *J. Gen. Virol.* **86**, 3281 (2005)
33. A.M. Lindberg, P. Andersson, C. Savolainen, M.N. Mulders, T. Hovi, *J. Gen. Virol.* **84**, 1223 (2003)
34. C. Kottaridi, E. Bolanaki, Z. Mamuris, C. Stathopoulos, P. Markoulatos, *Arch. Virol.* **151**, 1117 (2006)
35. C. Kottaridi, E. Bolanaki, Z. Kyriakopoulou, E. Dedepsidis, A. Pratti, P. Markoulatos, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **58**, 407 (2007)
36. E. Bolanaki, C. Kottaridi, P. Markoulatos, L. Margaritis, T. Katsorchis, *Virus Genes* **32**, 249 (2006)
37. B. Brown, M.S. Oberste, K. Maher, M.A. Pallansch, *J. Virol.* **77**, 8973 (2003)
38. M.S. Oberste, K. Maher, M.A. Pallansch, *J. Virol.* **78**, 855 (2004)
39. M.S. Oberste, K. Maher, W.A. Nix, S.M. Michele, M. Uddin, D. Schnurr, S. al-Busaidy, C. Akoua-Koffi, M.A. Pallansch, *Virus Res.* **128**, 34 (2007)
40. M.M. El-Sageyer, A. Szendrői, E. Hütter, Gy. Szűcs, I. Mezey, I. Tóth, A. Káta, Z. Kapiller, G. Páll, Gy. Petrás, E. Szalay, I. Mihály, S. Gourova, Gy. Berencsi, *Acta Virol.* **42**, 157 (1998)
41. S. Chevalier, A. Szendrői, V. Caro, J. Balanant, S. Guillot, Gy. Berencsi, F. Delpeyroux, *Virology* **20**, 56 (2004)
42. M.N. Mulders, J.H. Reimerink, M. Stenvik, I. Alaeddinoglu, H.G. van der Avoort, T. Hovi, M.P. Koopmans, *J. Gen. Virol.* **80**, 907 (1999)
43. S. Blomqvist, A. Skytta, M. Roivainen, T. Hovi, *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2813 (1999)
44. A.N. Lukashev, V.A. Lashkevich, G.A. Koroleva, J. Ilonen, A.E. Hinkkanen, *J. Gen. Virol.* **85**, 463 (2004)

From: jcmfield@bellsouth.net>
To: <markoulatos@bio.uth.gr>
Sent: Saturday, January 23, 2010 3:46 PM
Subject: Decision on manuscript JCM00475-09 Version 3

PROF PANAYOTIS MARKOULATOS
UNIVERSITY OF THESSALY
BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY
26 PLOUTONOS STREET
LARISSA 41221
Greece

Re: Full genome sequence analysis of a multi-recombinant echovirus 3 strain isolated from sewage in Greece (JCM00475-09 Version 3)

Dear Dr. MARKOULATOS:

Your manuscript has been accepted, and I am forwarding it to the ASM Journals Department for publication. For your reference, ASM Journals' address is given below. Before it can be scheduled for publication, your manuscript must be checked by the ASM production editor to make sure that all elements meet the technical requirements for publication. Charles Brown, the production editor for the Journal of Clinical Microbiology (JCM), or his assistant will contact you if anything needs to be revised before copyediting and production begin.

Thank you for submitting your paper to JCM.

Sincerely,
Howard A. Fields
Editor, Journal of Clinical Microbiology (JCM)

Journals Department
American Society for Microbiology
1752 N St., NW
Washington, DC 20036
E-mail: journalsrr@asmusa.org
Phone: 202-942-9384
Fax: 202-942-9355

1 Full genome sequence analysis of a multi-recombinant echovirus 3 strain
2 isolated from sewage in Greece

3 Kyriakopoulou Zaharoula¹, Dedepsidis Evaggelos¹, Pliaka Vaia¹, Tsakogiannis
4 Dimitris¹, Pratti Anastassia¹, Levidiotou-Stefanou Stamatina², Markoulatos Panayotis¹

5 ¹Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, 26, Ploutonos
6 & Aeolou str., Larissa 41 221, Greece.

7 ²Department of Microbiology, Medical School, University of Ioannina, Ioannina,
8 Greece

9 Running title: molecular analysis of an Echovirus 3 recombinant isolate

10 Corresponding Author: Professor Panayotis Markoulatos

11 Department of Biochemistry & Biotechnology

12 University of Thessaly 26, Ploutonos & Aeolou str.

13 Larissa 41221, Greece

14 Tel.: 0030 2410 565274, Fax: 0030 2410 565290

15 E-mail: markoulatos@bio.uth.gr

16 **Abstract**

17 An echovirus 3 strain (LR31G7) was isolated from sewage treatment plant in Greece
18 in 2005. A full genome molecular, phylogenetic and SimPlot analysis was conducted
19 in order to reveal the evolutionary pathways of the isolate. Nucleotide and
20 phylogenetic analysis of part of VP1 genomic region revealed that the isolated strain
21 correlates with Echo3 strains isolated the same year in France and Japan, implying
22 that the same virus circulated in Europe and Asia. LR31G7 was found to be
23 recombinant sharing the 3'part of its genome with an Echo25 strain isolated from
24 asymptomatic infants, in Norway, in 2003. Nucleotide and SimPlot analysis of the
25 VP1-2A junction, where the recombination was located, revealed the exact
26 recombination breakpoint (3357nt-3364nt). Moreover, there is evidence that
27 recombination events had occurred in 3B-3D region in the past evolutionary history of
28 the isolate. Our study indicates that recombination events play major role in
29 enteroviruses evolution and that circulation of multi-recombinant strains with
30 unknown properties could be potentially dangerous for public health.

31 **Introduction**

32 Enteroviruses are among the most common viruses infecting humans. Although most
33 infections are mild or asymptomatic, they can cause severe and potentially fatal
34 diseases, such as acute hemorrhagic conjunctivitis, aseptic meningo-encephalitis and
35 acute flaccid paralysis (39). They are small, non enveloped viruses with a positive
36 strand RNA of approximately 7.500nt. The enterovirus genome consists of three
37 major regions: the 5'untranslated region (5'UTR), the 3'untranslated region (3'UTR)
38 and the open reading frame (ORF), which is translated to a long polyprotein, which
39 contains the four structural (VP1-VP4) and the seven non-structural (2A-2C and 3A-
40 3D) viral proteins. Human enteroviruses include immunologically and genetically
41 distinct types and are classified into five species HEV-A to -D and Polioviruses that
42 show low molecular diversity with HEV-C (7).

43 An enterovirus population does not exist as a single genotype, but as a group of
44 correlated sequences, named quasispecies. Quasispecies arise from high mutation rate,
45 due to the lack of proofreading activity of the viral RNA polymerase and short
46 generation times (19, 23). Despite the fact that high mutation rates result in nonviable
47 viruses, it can lead to a swarm of potentially beneficial mutations to the population
48 level, where under certain circumstances a dominant sequence may emerge after a
49 long silent period, adapted to new environments and challenges during infection (44).

50 Recent publications state also that enteroviruses within species exist not as delimited
51 lineages but as a pool of independently evolving genome fragments that recombine
52 frequently to give rise to new virus variants (30, 33, 45). There is a reservoir of a
53 limited number of capsid sequences and a variety of functional regions that recombine
54 giving rise to new viral genotypes exhibiting modified pathogenic properties (29).

Recombination has been extensively described in polioviruses (2, 11, 14, 21, 22, 41, 42, 43), but much less attention has been devoted to recombination in non polio enteroviruses. Recent publications based on parts of enterovirus genome revealed that intertypic recombination is a frequent phenomenon in circulating non-polio enteroviruses (6, 24, 28, 45). Although sequences are available for all the prototype strains of enteroviruses, only a restricted number of full genome studies of modern enterovirus strains have been reported so far (10, 29).

In this study we present a full genome analysis of an Echo 3 (LR31G7) recombinant strain isolated in 2005 from the sewage treatment plant of Larissa city, Thessaly, Greece. A full genome sequence comparison of the isolate LR31G7 was conducted with prototype Echo 3-Morrissey as well as with the only available full sequenced E3 isolate PicoBankDM1E3. Finally a phylogenetic analysis of VP1 region comparing the LR31G7 isolate with E3 prototype strain and other E3 isolates is reported.

Materials and methods

Enterovirus isolation from sewages: An enterovirus strain (LR31G7) was isolated from the sewage treatment plant of the city of Larissa, Thessaly, Greece, in October 2005. The environmental sample was concentrated by the two-phase separation method recommended by WHO (48) and the virus was isolated from Rd cells. In order to avoid viral mixtures, 10-fold serial dilutions were prepared and inoculated into 96-well plates. The last dilution in which CPE was observed was inoculated into 25-cm² flask containing Rd cells. The presence of the virus was confirmed by PCR with primer pair UG52/UC53 (17), following RNA extraction and reverse transcription.

Primary characterization of the isolate: Enterovirus RNA was extracted from the inoculated Rd cells according to the method described by Casas et al, (9) and stored at -20°C . The isolated RNA was reverse transcribed into cDNA. Five μl of extracted RNA were incubated with 1 μl of random d(N6) primers (New England Biolabs, United States), 1 μl of dNTPs 40mM and 5 μl of RNase- DNase-free distilled water for five min at 65°C . After cooling on ice, 8 μl of reaction mixture containing 4 μl M-MLV reaction buffer (Invitrogen, Life Technologies, Paisley UK), 200 U M-MLV reverse transcriptase, 2 μl of 0,1 mM DTT, 20 U RNase inhibitor (Promega Corporation, Madison, WI) and 0.5 μl RNase DNase-free distilled water. The cDNA synthesis was completed by incubation at 25°C for 10 min, 37°C for 50min and finally at 70°C for 15min for M-MLV reverse transcriptase inactivation. For the characterization of the isolate LR31G7, VP1 amplification by RT-PCR with primer pair 292/222 has been performed as previously described (37).

Genome amplification: Table 1 shows details of the primer pairs that were used in order to obtain sequence information from all genomic regions of the LR31G7 isolate. Ten of these primers were used for the first time in the present study. They were designed with the aid of Primer3 software, obtained on-line from the Whitehead Institute (<http://www.genome.wi.mit.edu/genomesoftware/other/>). For the design of primer pairs CHR3/CHR4 and CHR5/CHR6 the sequences of all HEV-B prototype strains were used. The rest primer pairs were designed based on the sequences of the virus isolate LR31G7. All primers were synthesized by Metabion (Martinsried, Germany).

The viral RNA was reverse transcribed into cDNA as described above for all primer pairs, with the exception of EUC2, EUG3a, EUG3b and EUG3c, for which a RT with

the anti-sense primers EUC2a and EUC2b was carried out as has been previously described (8).

The PCR mixture for each tube comprised of: 3µl cDNA from LR31G7 isolate, 1µl of each primer at a concentration of 25pmol/µl, 5µl 10x PCR reaction buffer, 5µl dNTPs 10mM, 2,5 units Paq5000 DNA polymerase (Stratagene) and double-distilled nuclease-free water up to a final volume of 50µl/tube. For the primer pairs CHR3-CHR4 and CHR5-CHR6 40 cycles of denaturation (95 °C for 30sec), annealing (45 °C for 1min) and extension (72 °C for 1min) were used . The reactions with primer pairs BL870-BR3231, BL1369-BR2580 and BL4709-BR6063 were performed for 35 cycles. Each cycle consisted of 30sec of denaturation at 95 °C, 30sec of annealing at 58 °C (for BL870-BR3231) or at 55 °C (for BL1369-BR2580 and BL4709-BR6063), and 2min (for BL870-BR3231) or 1,5min (for BL1369-BR2580 and BL4709-BR6063) of extension at 72 °C. For the other primer pairs, PCR conditions were the same as those described in the original papers (Table 1). PCR products were cleaned up using a PCR gel extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). All PCR products were sequenced at Macrogen Inc (Seoul, Korea) using the primers described in Table 1.

Sequencing and sequence analysis: Initially the sequences were examined in terms of closest homologous sequence using BLAST software, obtained on-line from the National Centre for Biotechnology Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Multiple sequence alignments were generated using ClustalW software, obtained on-line from the web site of the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Phylogenetic and molecular analysis was conducted using MEGA version 4 software. The

reliability of the trees was determined by bootstrap analysis with 100 pseudoreplicate data sets. Finally, nucleotide similarity plots between the aligned sequences were created with the aid of SimPlot software (version 3.1), with a window size of 200nt for full genome analysis and of 100nt in the case of analysis of recombination junction (26). Partial sequences of the following Echo 3 strains were used for the phylogenetic analysis of the LR31G7 isolate: CF1801081-05 (AM236930), CF1820181-05 (AM236931), Fukuoka City2005-70 (AB234341), Fukuoka City2005-97 (AB234342), 94CF858 (AJ241446), BE02-3627 (AY342794), W178-128/99 (AY208114), 810/85 (AF295490), 2392-82 (AF295453), 108-97 (AB268162), 222-99 (AB268165). For the recombination junction analysis the partial sequence of the Echo25 strain NO-519 (DQ317208) was used.

Nucleotide sequence accession number: The almost complete genomic sequence of isolate LR31G7 (from nucleotide 1 to nucleotide 7189) has been deposited in the GenBank library under accession number FJ766334.

Results

An enterovirus strain was isolated from sewage treatment plant of the city of Larissa, Greece, in October 2005. Sequencing of the VP1 genomic region revealed that the RL31G7 belongs to the Echo3 serotype, as it shows 79% (>75%) nucleotide and 96% (>88%) amino acid identity with the respective region of the Echo3 reference strain (34). An almost full genome analysis (7189nt) of the isolate was conducted, as the only completed sequenced echo 3 strains are the reference strain Morrissey and the PicoBankDM1E3 isolate, associated with diabetes induction, isolated from stool sample in Finland, in 1998 (47).

149 Table 2 shows the nucleotide and amino acid comparison of the LR31G7 strain with
150 the prototype strain Morrissey and the only complete sequenced Echo3
151 PicoBankDM1E3 isolate. As it is shown in table 2, LR31G7 isolate differs
152 significantly from the prototype strain in all sequenced regions. The region with the
153 highest identity of LR31G7 isolate with the prototype strain is 5' UTR (86%),
154 followed by regions P2 (81%), P1 (80%) and P3 (79%). The gene with the highest
155 identity is 3B (83%) and the one with the lowest is 2B (76%). The nucleotide and
156 amino acid comparison of LR31G7 with the isolate PicoBankDM1E3 revealed that, in
157 the 5' part of the genome (5'UTR-VP1) there is a high identity, 93-90%, which falls
158 to 82-79% in the 3' part of the genome (2A-3D).

159 In order to investigate the relationship of the LR31G7 strain with the entire prototype
160 and other strains of enteroviruses species B, phylogenetic trees for each genomic
161 region were constructed (data not shown). In phylogenetic trees for the 5'UTR and
162 capsid regions LR31G7 clusters with the PicoBankDM1E3 isolate. In the
163 phylogenetic trees for the structural genes, there is absolute correlation between
164 serotype and genotype, as the two Echo3 isolates (LR31G7 and PicoBankDM1E3) are
165 clustering together with the Echo3 prototype strain Morrissey.

166 As it was expected the serotype genotype correlation that was observed in capsid
167 coding region, was interrupted in trees for non structural sequences. In 2A region
168 LR31G7 is still clustering together with PicoBankDM1E3, but this phylogenetic
169 relationship between these two Echo3 isolates stops in 2B coding region. It is also
170 observed that in 2C, 3A, 3C and 3D phylogenetic trees LR31G along with modern
171 enterovirus isolates belongs to a separate from the prototype stain cluster. Despite the
172 fact that in 2B, 2C and 3A there is a different classification for each genomic region,

173 phylogenetic trees for 3B, 3C and 3D revealed that LR31G7 is consistently clustering
174 with CAV9 strains (Cuba35of93, Cuba47of93, Cuba23of00, Cuba267of90) isolated in
175 Cuba from 1990 to 2000. Between the LR31G7 and the CAV9 isolates there is 86%,
176 85% and 85-87% nucleotide identity in 3B, 3C and 3D regions respectively.

177 In order to correlate LR31G7 with other short sequences available from Echo 3
178 isolates, a 269nt (2692-2960nt) region of VP1 was chosen for the construction of
179 phylogenetic tree, as it lies within most of the available sequences. As it is shown in
180 figure 1 the isolate LR31G7 clusters together with echoviruses 3 recently isolated
181 from France (CF1801081-05, CF1820181-05) and Japan (Fukuoka City2005-70,
182 Fukuoka City2005-97) in 2005. The nucleotide identity of this part of VP1 between
183 the LR31G7 and the Echo3 isolates of the 2005 cluster, is 95-98%. The isolates of the
184 1998-2002 and of the 1997-1998 cluster present between them 86-91% and 75-78%
185 nucleotide identity respectively.

186 SimPlot analysis of LR31G7 full genome analysis is presented in figure 2a. In 5'UTR
187 and capsid coding region the strain with the highest identity is PicoBankDM1E3.
188 Passing to the 2A coding region there is an abrupt change of the identity that falls to
189 81%. It is obvious that a recombination event had occurred giving naissance to a
190 strain that in 5' half of the genome is echo 3 and the rest of the genome is derived
191 from another enterovirus B. Full genome SimPlot analysis couldn't help to the
192 detection of the donor of the functional genomic regions of the LR31G7 isolate, as
193 there is small number of complete sequenced enterovirus strains available in
194 GenBank. For this reason, we studied in detail the VP1-2A region, where the
195 recombination was located. The 20nt of the 3' end of VP1 and the 20nt of the 5' end
196 of 2A regions have the highest identity (92%) with the PicoBankDM1E3 isolate but

100nt downstream that point the closest strain to LR31G7 was an Echo25 strain, NO-519, isolated in 2003 from Norway, with 96% nucleotide identity . SimPlot analysis for the VP1-2A region between LR31G7, PicoBankDM1E3 and NO-519 isolate, is presented in figure 2b, where the recombination between the last two strains is obvious. The high nucleotide identity between LR31G7 and the PicoBankDM1E3 and NO-519 isolates, allowed the identification of the exact location of the recombination. As it is shown in figure 2c the recombination junction was located in 3357nt-3364nt.

Discussion

In the present study the full genome sequence analysis of an enterovirus isolate (LR31G7) is reported. The strain was isolated from the sewage treatment plant of the city of Larissa, Thessaly, Greece, in October 2005. Primary characterization of the isolate by sequencing of part of VP1 capsid region revealed that LR31G7 belongs to the Echo3 serotype. To our knowledge none clinical Echo3 isolate identical to LR31G7 was reported in Greece. Previous studies in Greece revealed that the most frequently isolated serotypes were Echo6, Echo13, Echo30 in an outbreak of aseptic meningitis in 2001 (46) and Echo6 , Echo15 implicated in aseptic meningitis and encephalitis cases in 2005-2007 (15,40).

Nucleotide comparison of LR31G7 with the prototype strain Morrissey and the only full sequenced Echo3 strain PicoBankDM1E3 showed that the Greek isolate differs 17%-24% and 7%-21% respectively, in different genomic regions. The Greek strain is more close to the PicoBankDM1E3 isolate than the prototype Echo3 strain.

Phylogenetic comparison of part of VP1 region of LR31G7 with other Echo3 isolates revealed that LR31G7 is related to Echo3 strains isolated in the same year (2005) in

221 Asia and Europe, implying temporal and not topological correlation of these viruses.
222 The close phylogenetic relationship of these viruses along with the high nucleotide
223 identity (95-98%) between them, leads to the conclusion that the same virus
224 circulated in Greece, France and Japan in 2005. At present, the rapid transmission of
225 viruses from one region to other permit the viruses to circulate worldwide and not in
226 the narrow topological boundaries of a specific population. From the phylogenetic
227 tree of figure 1, we can also hypothesize that isolate LR31G7 circulated in Europe for
228 almost seven years before pass to Asia. Nevertheless it is difficult to come to a sound
229 conclusion about the epidemiology of LR31G7, as Echo3 viruses have been little
230 studied and there are few isolates of which sequences are deposited in GenBank.

231 In the 5' part of the genome the nucleotide identity between LR31G7 and the
232 PicoBankDM1E3 is extremely high in contrast with the rest of the genome. This
233 correlation between LR31G7 and PicoBankDM1E3 in 5' UTR-2A region was also
234 confirmed by phylogenetic analysis (data not shown). In this part of the genome the
235 two Echo3 strains cluster together, while in the capsid coding region (data not shown)
236 cluster together and in the same cluster with the prototype strain Morrissey, confirming
237 once more that these strains belong to Echo3 serotype (4, 25, 31). LR31G7 and
238 PicoBankDM1E3 are separated in 2B-3D phylogenetic trees. This data along with the
239 SimPlot analysis (figure 2), support strongly the hypothesis that a recombination
240 event had occurred between circulating enteroviruses.

241 Analysis of VP1-2A junction (figure 2b, c) revealed not only the donor but, for the
242 first time, in non polio enteroviruses, the exact point of recombination (3357nt-
243 3364nt). In figures 2b and 2c, the exchange of genomic parts between the Echo3
244 strain PicoBankDM1E3 and the Echo25 strain NO-519 is obvious. Keeping in mind

that genetic exchanges between enteroviruses occur when there is a co-infection of the same cell, recombination between the above two viruses is unlikely to have occurred , as PicoBankDM1E3 and NO-519 were isolated in 1998 and 2003 respectively. Consequently, genetic exchanges have been recently occurred between a descendant of PicoBankDM1E3 and NO-519. We can hypothesize that the Echo3 strains circulated the same year worldwide (figure 1) or direct ancestors of them have recombined with the Echo25 strain. Moreover, it cannot be excluded that the strains of the 2005 cluster, in figure 1, are all recombined. The confirmation of our assumption could be possible only in the case of which genome sequences of these strains were available.

As far as phylogenetic analysis of all sequenced regions is concerned and in agreement with previous studies (4, 25, 28, 29), LR31G7 clusters with strains of the same serotype only in capsid coding genes. In phylogenetic trees for 2A-3A proteins, correlation is observed with different enteroviruses, but phylogenetic trees for 3B, 3C and 3D regions revealed that LR31G7 is consistently clustering with CAV9 strains isolated in Cuba from 1990 to 2000, demonstrating their close relationship. The continuous clustering of LR31G7 with CAV9 strains in this part of the genome lead us to the hypothesis that a recombination event might had occurred in the past evolutionary history of LR31G7 strain.

In accordance with previous studies for 2C and 3D genomic regions (5, 24), as well as in 3A and 3C modern enterovirus isolates along with LR31G7 form a cluster, separate from the most HEV-B prototype strains. This observation reinforces the statement that the 2C and 3D regions, probably the 3A and 3C, are conserved between modern strains. Moreover, in 3D phylogenetic tree LR31G7 and the recently isolated viruses

belong to the Echo1 cluster, whereas according to other studies (38, 30, 29), isolates that grouped together with E1 prototype, mostly originated from the 1980s.

Recombination has been extensively studied in polioviruses (12, 16, 18, 21, 27, 43). Last few years more attention has been shifted towards non-polio enteroviruses, since it has been proven that a lot of the prototype strains, as Echo18 and CAV21 (1, 20, 35) are recombinant and there are more and more evidence for genetic exchanges between circulating enteroviruses (30, 35). Even though a lot of progress has been done in studies concerning genetic exchanges between enteroviruses, recombination junctions have been determined only in recombinant Sabin poliovirus strains (13, 22).

In non polio enteroviruses, because of the genomic diversity and the paucity of high nucleotide sequence identity between recent enteroviruses, it is very difficult to allocate the exact point of genetic exchanges between circulating enteroviruses.

The present work, where, for the first time, the recombination breakpoint between circulating enterovirus is presented, constitutes an additional step to the study and understanding of enteroviruses evolution.

Acknowledgements

The work was supported by research grants of the Postgraduate Program “Applications of Molecular Biology-Genetics. Diagnostic Biomarkers”, code 3817 , of the University of Thessaly, School of Health Sciences, Department of Biochemistry & Biotechnology.

291 **References**

- 292 1. **Andersson, P., K. Edman, and A. M. Lindberg.** 2002. Molecular analysis of
293 the echovirus 18 prototype: evidence of interserotypic recombination with
294 echovirus 9. *Virus Res.* **85**:71-83.
- 295 2. **Blomqvist, S., A. L. Bruu, M. Stenvik, and T. Hovi.** 2003. Characterization of
296 a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and
297 containing a chimeric capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.* **84**:573-580.
- 298 3. **Blomqvist, S., A. Skytta, M. Roivainen, and T. Hovi.** 1999. Rapid detection of
299 human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse
300 transcription-PCR-hybridisation assay. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2813–2816.
- 301 4. **Bolanaki, E., C. Kottaridi, P. Markoulatos, L. Margaritis, and T.**
302 **Katsorchis.** 2005. Nucleotide analysis and phylogenetic study of the homology
303 boundaries of coxsackie A and B viruses. *Virus Genes.* **31(3)**:307-20.
- 304 5. **Bolanaki, E., C. Kottaridi, P. Markoulatos, L. Margaritis, and T.**
305 **Katsorchis.** 2006. Evolution of 2B and 2C genomic parts of species B Coxsackie
306 viruses. Phylogenetic study and comparison with other regions. *Virus Genes.*
307 **32(3)**:249-59.
- 308 6. **Bolanaki, E., C. Kottaridi, P. Markoulatos, Z. Kyriakopoulou, L.**
309 **Margaritis, and Katsorchis T.** 2007. Partial 3D gene sequences of Coxsackie
310 viruses reveal interspecies exchanges. *Virus Genes.* **35(2)**:129-40.
- 311 7. **Brown, B., M. S. Oberste, K. Maher, and M. A. Pallansch.** 2003. Complete
312 genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus
313 species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* **77**:8973-
314 8984.

- 315 8. **Caro, V., S. Guillot, F. Delpeyroux, and R. Crainic.** 2001. Molecular strategy
316 for “serotyping” of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* **82**:79-91.
- 317 9. **Casas, I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M Cleator.** 1995. New method for
318 the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the
319 polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods.* **53**:25-36.
- 320 10. **Chua, B. H., P. C. McMinn, S. K. Lam, and K. B. Chua.** 2001. Comparison of
321 the complete nucleotide sequences of echovirus 7 strain UMMC and the
322 prototype (Wallace) strain demonstrates significant genetic drift over time. *J.*
323 *Gen. Virol.* **82**:2629-39.
- 324 11. **Cuervo, N. S., S. Guillot, N. Romanenkova, M. Combiescu, A. Aubert-**
325 **Combiescu, M. Seghier, V. Caro, R. Crainic, and F. Delpeyroux.** 2001.
326 Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by
327 primary vaccinees. *J. Virol.* **75**:5740-5751.
- 328 12. **Dahourou, G., S. Guillot, O. Le Gall, and R. Crainic.** 2002. Genetic
329 recombination in wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.* **83(12)**:3103-10.
- 330 13. **Dedepsidis, E., V. Pliaka, Z. Kyriakopoulou, C. Brakoulis, S. Levidiotou-**
331 **Stefanou, A. Pratti, Z. Mamuris, and P. Markoulatos.** 2008. Complete
332 genomic characterization of an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant.
333 *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52(3)**:343-51.
- 334 14. **Dedepsidis, E., Z. Kyriakopoulou, V Pliaka, C. Kottaridi, E. Bolanaki, S.**
335 **Levidiotou-Stefanou, D. Komiotis, and P. Markoulatos.** 2007. A
336 Retrospective characterization of a Vaccine derived Poliovirus type 1 isolated
337 from sewages in Greece. *Appl. Environ. Microbiol.* **73(21)**:6697-704.

- 338 15. **Frantzidou, F., K. Dumaidi, A. Spiliopoulou, A. Antoniadis, and A. Papa.**
 339 2007. Echovirus 15 and autumn meningitis outbreak among children, Patras,
 340 Greece, 2005. *J. Clin. Virol.* **40(1)**:77-9.
- 341 16. **Georgopoulou, A., and P. Markoulatos.** 2001. Sabin type 2 polioviruses with
 342 intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.*
 343 *Dis.* **20(11)**:792-9.
- 344 17. **Georgopoulou, A., P. Markoulatos, N. Spyrou, and N.C. Vamvakopoulos.**
 345 2000. Improved genotyping vaccine and wild-type poliovirus strains by
 346 restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic
 347 implications. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4337-4342.
- 348 18. **Guillot, S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A.**
 349 **Aubert-Combiescu, F. Delpeyroux, and R. Crainic.** 2000. Natural genetic
 350 exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.*
 351 **74(18)**:8434-43.
- 352 19. **Holland, J., and E. Domingo.** 1998. Origin and evolution of viruses. *Virus*
 353 *Genes.* **16(1)**:13-21
- 354 20. **Hughes, P. J., C. North, P. D. Minor, and G. Stanway.** 1989. The complete
 355 nucleotide sequence of coxsackievirus A21. *J. Gen. Virol.* **70**:2943-52.
- 356 21. **Karakasiliotis, I., E. Paximadi, and P. Markoulatos.** 2005. Evolution of a rare
 357 vaccine-derived multirecombinant poliovirus. *J. Gen. Virol.* **86**:3137-42.
- 358 22. **Karakasiliotis, I., P. Markoulatos, and T. Katsorchis.** 2004. Site analysis of
 359 recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and
 360 from vaccinees. *Mol. Cell. Probes.* **18(2)**:103-9.
- 361 23. **Kirkegaard, K., and D. Baltimore .** 1986. The mechanism of RNA
 362 recombination in poliovirus. *Cell.* **47(3)**:433-43.

- 363 24. **Kottaridi, C., E. Bolanaki, Z. Kyriakopoulou, E. Dedepsidis, A. Pratti, and**
364 **P. Markoulatos.** 2007. Possible recombination and gene adaptation exchanges
365 among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers.
366 *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **58(4)**:407-12.
- 367 25. **Kottaridi, C., E. Bolanaki, Z. Mamuris, C. Stathopoulos, and P.**
368 **Markoulatos.** 2006. Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of
369 echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic
370 variation. *Arch. Virol.* **151(6)**:1117-32.
- 371 26. **Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei.** 2004. MEGA3: integrated software for
372 molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief.*
373 *Bioinform.* **5**:150–163.
- 374 27. **Kyriakopoulou, Z., C. Kottaridi, E. Dedepsidis, E. Bolanaki, S. Levidiotou-**
375 **Stefanou, and P. Markoulatos.** 2006. Molecular characterization of wild-type
376 polioviruses isolated in Greece during the 1996 outbreak in Albania. *J. Clin.*
377 *Microbiol.* **44(3)**:1150-2.
- 378 28. **Lindberg, A. M., P. Andersson, C. Savolainen, M. N. Mulders, and T. Hovi.**
379 2003. Evolution of the genome of Human enterovirus B: incongruence between
380 phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination
381 within the species. *J. Gen. Virol.* **84(5)**:1223-35.
- 382 29. **Lukashev, A. N., V. A. Lashkevich, O. E. Ivanova, G. A. Koroleva, A. E.**
383 **Hinkkanen, and J. Ilonen.** 2005. Recombination in circulating Human
384 enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome
385 regions. *J. Gen. Virol.* **86(12)**:3281-90.

- 386 30. **Lukashev, A. N., V. A. Lashkevich, O. E. Ivanova, G. A. Koroleva, A. E.**
387 **Hinkkanen, and J. Ilonen.** 2003. Recombination in circulating enteroviruses. *J.*
388 *Virol.* **77**:10423-10431.
- 389 31. **Mirand, A., C. Archimbaud, C. Henquell, Y. Michel, M. Chambon, H.**
390 **Peigue-Lafeuille, and J. L. Bailly.** 2006. Prospective identification of HEV-B
391 enteroviruses during the 2005 outbreak. *J. Med. Virol.* **78(12)**:1624-34.
- 392 32. **Mulders, M. N., J. H. Reimerink, M. Stenvik, I. Alaeddinoglu, H. G. van der**
393 **Avoort, T. Hovi, and M. P. Koopmans.** 1999. A Sabin vaccine-derived field
394 isolate of poliovirus type 1 displaying aberrant phenotypic and genetic features,
395 including a deletion in antigenic site 1. *J. Gen. Virol.* **80**:907-16.
- 396 33. **Oberste, M. S., K. Maher, and M. A. Pallansch.** 2004. Evidence for frequent
397 recombination within species human enterovirus B based on complete genomic
398 sequences of all thirty-seven serotypes. *J. Virol.* **78(2)**:855-67.
- 399 34. **Oberste, M. S., K. Maher, D. R. Kilpatrick, M. R. Flemister, B. A. Brown,**
400 **and M. A. Pallansch.** 1999. Typing of human enteroviruses by partial
401 sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* **37(5)**:1288-93.
- 402 35. **Oberste, M. S., S. Peñaranda, and M. A. Pallansch.** 2004. RNA
403 recombination plays a major role in genomic change during circulation of
404 coxsackie B viruses. *J. Virol.* **78(6)**:2948-55.
- 405 36. **Oberste, M. S., S. Peñaranda, K. Maher, and M. A. Pallansch.** 2004.
406 Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus
407 A. *J. Gen. Virol.* **85(6)**:1597-607.
- 408 37. **Oberste, M. S., W. A. Nix, K. Maher, and M. A. Pallansch.** 2003. Improved
409 molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing.
410 *J. Clin. Virol.* **26(3)**:375-7.

- 411 38. **Oprisan, G., M. Combiescu, S. Guillot, V. Caro, A. Combiescu, F.**
412 **Delpeyroux, and R. Crainic.** 2002. Natural genetic recombination between co-
413 circulating heterotypic enteroviruses. *J. Gen. Virol.* **83**:2193-200.
- 414 39. **Palacios, G., and M. S. Oberste.** 2005. Enteroviruses as agents of emerging
415 infectious diseases. *J. Neurovirol.* **11(5)**:424-33.
- 416 40. **Papa A., L. Skoura, K. Dumaidi, A. Spiliopoulou, A. Antoniadis, and F.**
417 **Frantzidou.** 2009. Molecular epidemiology of Echovirus 6 in Greece. *Eur. J.*
418 *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28(6)**:683-7.
- 419 41. **Paximadi, E., I. Karakasiliotis, D. Papaventsis, G. Papageorgiou, and P.**
420 **Markoulatos.** 2008. Recombinant Sabin environmental isolates in Greece and
421 Cyprus. *J. Appl. Microbiol.* **104(4)**:1153-62.
- 422 42. **Paximadi, E., I. Karakasiliotis, E. Bolanaki, A. Krikelis, and P.**
423 **Markoulatos.** 2007. Vaccine derived bi- and multi-recombinant Sabin strains.
424 *Virus Genes.* **35(3)**:541-8.
- 425 43. **Paximadi, E., I. Karakasiliotis, Z. Mamuris, C. Stathopoulos, V. Krikelis,**
426 **and P. Markoulatos.** 2006. Genomic analysis of recombinant sabin clinical
427 isolates. *Virus Genes.* **32(2)**:203-10.
- 428 44. **Ruiz-Jarabo, C. M., A. Arias, E. Baranowski, C. Escarmís, and E. Domingo.**
429 2000. Memory in viral quasispecies. *J. Virol.* **74(8)**:3543-7.
- 430 45. **Santti, J., T. Hyypiä, L. Kinnunen, and M. Salminen.** 1999. Evidence of
431 recombination among enteroviruses. *J. Virol.* **73(10)**:8741-9.
- 432 46. **Siafakas, N., P. Markoulatos, and S. Levidiotou-Stefanou.** 2004. Molecular
433 identification of enteroviruses responsible for an outbreak of aseptic meningitis;
434 implications in clinical practice and epidemiology. *Mol. Cell. Probes.* **18(6)**:389-
435 98.

- 436 47. **Williams, C. H., S. Oikarinen, S. Tauriainen, K. Salminen, H. Hyöty, and G.**
437 **J. Stanway.** 2006. Molecular analysis of an echovirus 3 strain isolated from an
438 individual concurrently with appearance of islet cell and IA-2 autoantibodies.
439 Clin. Microbiol. **44(2)**:441-8.
- 440 48. **World Health Organization.** 3 March 2003, posting date. Guidelines for
441 environmental surveillance of poliovirus circulation. World Health Organisation,
442 Geneva, Switzerland. [http://www.who.int/vaccines-](http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF03/www737pdf)
443 [documents/DocsPDF03/www737pdf](http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF03/www737pdf).
444

445 **Figure legends:**

446 Figure 1: Phylogenetic tree of 269nt (2692-2960nt) of a region of VP1 of LR31G7
447 and other Echo3 strains.

448 Figure 2: (a) Full genome SimPlot analysis of LR31G7, (b) SimPlot analysis of
449 recombination junction between PicoBankDM1E3 and NO-519 strain, (c)
450 recombination junction of LR31G7. Identities between LR31G7 and
451 PicoBankDM1E3 are highlighted in yellow, while identities between LR31G7 and
452 NO-519 are highlighted in green.

453 Table 1: Primers used in the present study

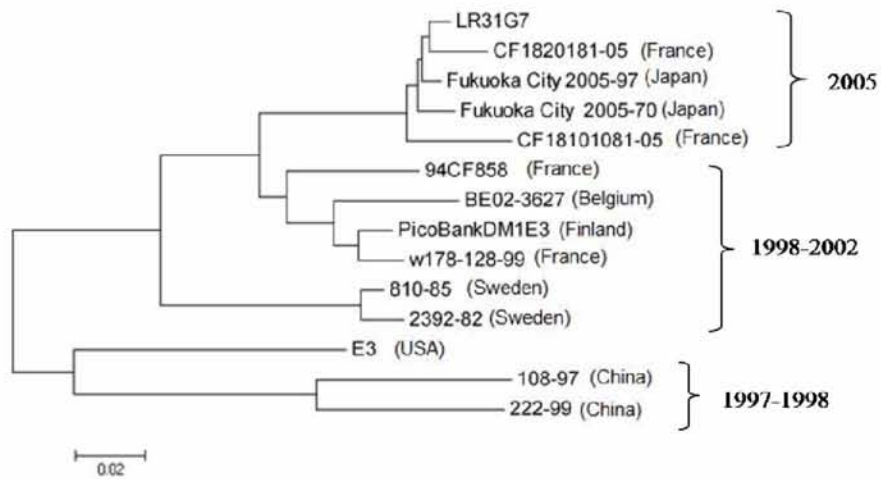
Primer	Position	Polarity	Sequence (5'-3')	Reference
72437 216616	001-020 545-565	Sense Antisense	TTAAAAACAGCTCTGGGGTTG GAAACACGGACACCCAAAGTA	Mulders et al., 1999 Blomqvist et al., 1999
0340F 1200R	310-333 1177-1196	Sense Antisense	TAGATCAGGCYGATGAGTCACCGC GGGAATTTCCACCACCACCC	Lukashev et al., 2005
BL870 BR3231	870-890 3231-3211	Sense Antisense	CGACAGGATTTTCACACAGGA GCTTTTCACATACGGGCTAA	Present study
BL1369 BR2580	1369-1389 2580-2560	Sense Antisense	GAGGTTGTGCGAGCTTCTCT GGGAACCACTTGTGAGGTGT	Present study
292 222	2612-2627 2969-2951	Sense Antisense	MIGCIGYIGARACNGG CICCIGGIGGIAYRWACAT	Oberste et al., 2003
EUG3a EUG3b EUG3c EUC2 EUC2a EUC2b	2946-2965 2946-2965 2946-2965 4413-4433 4428-4448 4428-4448	Sense Sense Sense Antisense Antisense Antisense	TGGCAAACCTCCWCCAACCC TGGCAAACATCTTCMAATCC TGGCAGACTTCAACHAACCC TTTGCACCTGAAGTGTATGTA GGTTCAATACGGCATTG GGTTCAATACGGTGTGTTGCT	Caro et al. (2001)
CHR1 CHR2	4284-4308 5084-5081	Sense Antisense	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKA	Kottaridi et al 2007
BL4709 BR6063	4709-4729 6063-6043	Sense Antisense	TACATCCCCATTTGTGTTGG TGCTGGCTCCTTGTACCTT	Present study
CHR3 CHR4	5047-5065 5860-5841	Sense Antisense	CIACYCTWGARGCRCTVTT GACRTGAGIACHCCRCRCA	Present study
5850F 6500R	5837-5859 6531-6506	Sense Antisense	CAGTGYGGIGGIGTICTCATGTC AGRTTGCCAAAYGTYTGYCTCATTGC	Lukashev et al., 2003
CHR5 CHR6	6485-6507 7250-7227	Sense Antisense	ATCCAGYTTGAAYGAYTCIGIRG GAAYTCYTCRTAYTCKTGCTCYCC	Present study

454

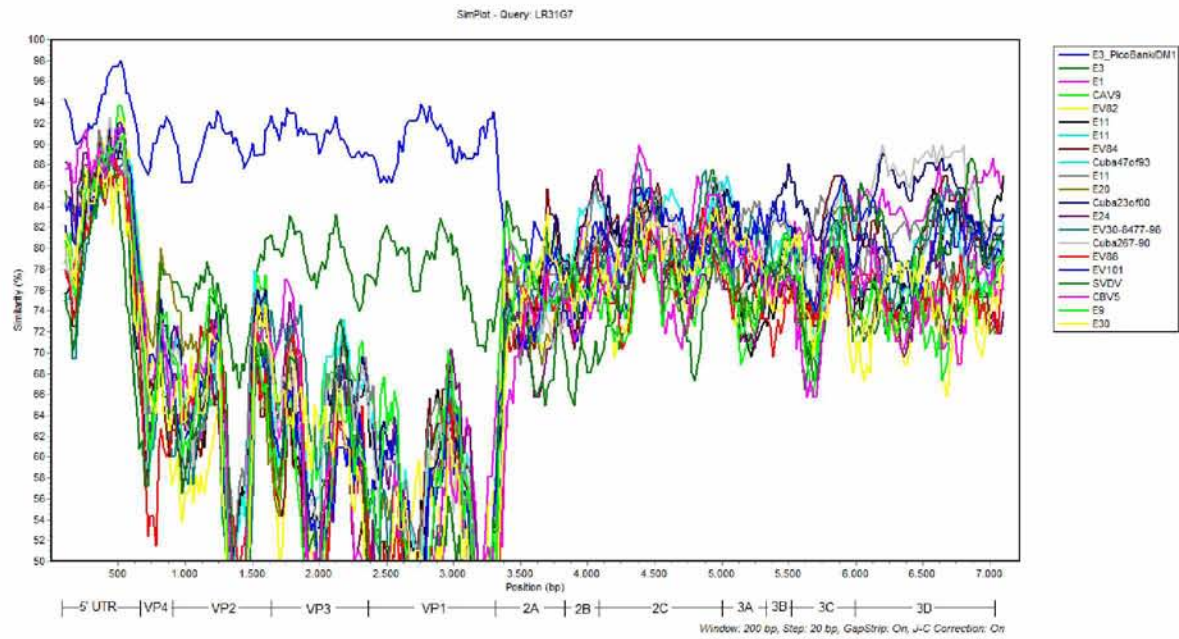
455 Table 2: Nucleotide and amino acid sequence identity between LR31G7, Echo3 prototype
 456 strain Morrissey and PicoBankDM1E3 strain.
 457 *1251nt of 3D genomic region.
 458

Genomic Region	Morrissey		PicoBankDM1E3	
	% nucleotide identity	%amino acid identity	% nucleotide identity	%amino acid identity
5' UTR	86		93	
P1	80		90	
VP4	80	98	92	100
VP2	79	97	90	99
VP3	82	97	91	99
VP1	79	96	90	98
P2	81		81	
2A	82	94	82	94
2B	76	94	79	98
2C	81	98	82	97
P3	79		81	
3A	79	97	80	97
3B	83	95	80	95
3C	78	93	81	97
3D*	78	96	80	97

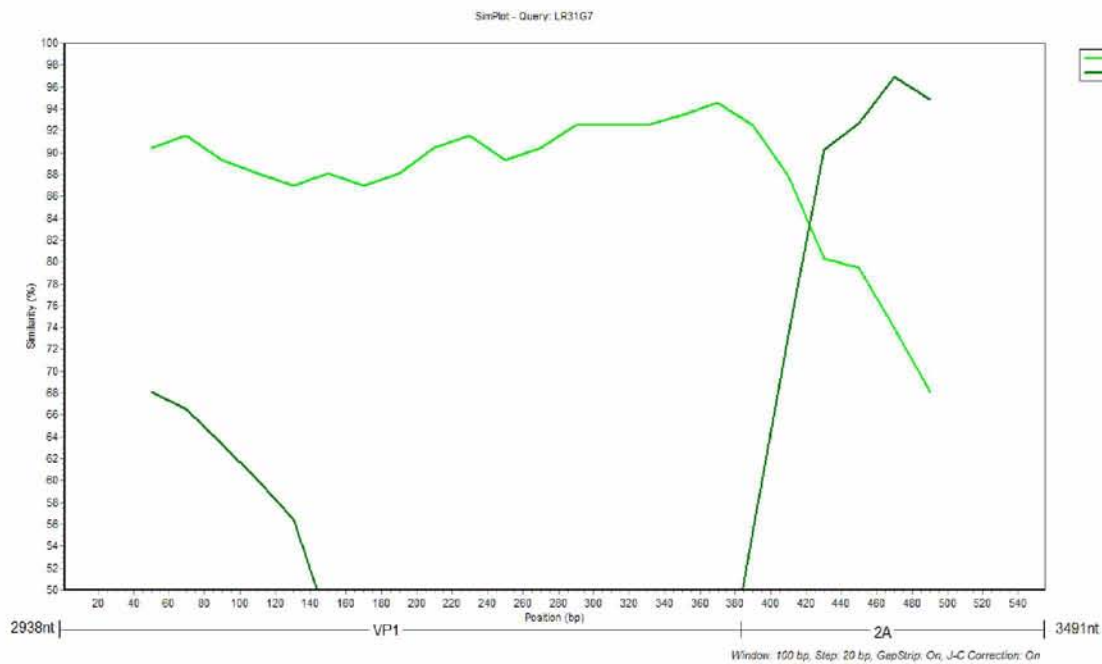
459



(a)



(b)



(c)

PicoBank/DM1/E3	TATGGGGACGCTCCGCCCATGGGTTATACCAGCCATGGGGCATTCTGGGCAGCAGTCTGG
LR31G7	TGTGGGGACGCTTCGCCCATGGGTTATACTAACCATGGAGCATTCTGGGCAGCAATCTGG
NO-519	AGAGAGATGACCATTGCCCCTCAATGGCA--AACCATGGGGCGTTTCGGCCAGCAATCCGG
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
	3357 3364
PicoBank/DM1/E3	GGCTATCTATGTGGGTAACTACAGAGTAGTCAATAGGCACCTAGCCACGCATGTAGACTG
LR31G7	GGCTATCTATGTGGGCAACTACAGAGTGGTCAACCGGGCACTTAGCAACACACACTGACTG
NO-519	AGCTGTATATGTGGGCAACTACAGAGTGGTCAACCGGGCACTTAGCAACACACACTGATTG
	*** * ***** *
PicoBank/DM1/E3	GAGCAATTGTGTCTGGGAGGACTATAACAGAGATTTACTAATCAGCACCCTACGGCCCT
LR31G7	GCAAAATTGTGTCTGGGAGAAATAACAGAGATCTCTAGTGAGCACAACCACAGCACA
NO-519	GCAAAATTGTGTCTGGGAGAAATAACAGAGATCTCTAGTGAGCACAACCCTGCACA
	* ***** *