

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΙΑΣ REAL TIME PCR ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ  
ΠΙΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΙΕΣ**

**ΖΗΣΗ ΖΑΦΕΙΡΩ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2015**

Δημιουργία μιας Real Time PCR για τη μέτρηση του ιικού τίτλου σε  
κυτταροκαλλιέργειες

Development of a Real Time PCR protocol for evaluating the viral titre in cell cultures

## Τριμελής Επιτροπή

---

**Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ:**  
**(ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ  
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ  
ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ –  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ:**

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ  
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ –  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:**

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ  
ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ –  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## Abstract

---

Human enteroviruses belong to genus *enterovirus* of Picornaviridae family. Their genome is a positive sense single-strand RNA, which consists of a highly conserved 5'-UTR, an Open Reading Frame (ORF), a 3'-UTR with a poly(A)-tract. The members of this genus are characterized by their non-enveloped icosahedral capsid of two-, three- and five-fold symmetry, which is made up to 60 copies of pentameric intermediates of 4 proteins: VP1, VP2, VP3 and VP4.

Most enterovirus infections are asymptomatic and occur more frequently in men than in women causing a range of distinct clinical syndromes leading to diseases.

The well-studied enterovirus is poliovirus, because of the emergence of poliomyelitis and for the urgent need of its eradication.

The current methods of enteroviral diagnosis include the inoculation of patient specimens in appropriate cell cultures followed by observation of characteristic for the enterovirus cytopathic effect. This process lasts from 3 to 7 days, and in addition of being time-consuming it is not effective for all enterovirus strains.

In the present thesis, a Real Time PCR protocol was developed in order to detect and quantify the viral load of enterovirus in cell culture samples. The experimental procedure that was used constituted from the inoculation of cell cultures with known viral titre, the application of the developed Real Time PCR protocol in the collected specimens, the creation of a standard curve for the quantification of the viral load and a test application of the method in unknown specimens.

The experimental procedure resulted in the construction of two standard curves for quantification of the viral load. The first one was used when the viral titre was high providing results in 24 hours after inoculation, and the second one was used for low viral loads providing results in 36 hours. The test application of the method in clinical samples confirmed the detection and evaluation of enteroviruses viral titers in a time ranging from 24-36 hours.

## Περίληψη

---

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών της οικογένειας *Picornaviridae*. Το γένωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας και αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'-αμετάφραστη περιοχή, ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, μία 3'-αμετάφραστη περιοχή με μία πολύ(A)-ουρά. Τα μέλη του γένους αυτού χαρακτηρίζονται από το μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικό καψίδιο μ που αποτελείται από 60 αντίγραφα πενταμερών 4 πρωτεϊνών. Οι περισσότερες λοιμώξεις των εντεροϊών είναι ασυμπτωματικές, και εμφανίζονται πιο συχνά σε άνδρες από ότι σε γυναίκες. Από την άλλη πλευρά, αυτοί οι ιοί μπορούν να προκαλέσουν ένα φάσμα από διακριτά κλινικά σύνδρομα οδηγώντας σε ασθένειες.

Ο καλύτερα μελετημένος εντεροϊός, είναι ο πολιοϊός, εξαιτίας της πολυμυελίτιδας και της ανάγκης για την εξάλειψή της.

Η διάγνωση των εντεροϊών συνήθως γίνεται με εμβολιασμό κυτταροκαλλιιεργειών κατάλληλης κυτταρικής σειράς με δείγμα που συλλέχθηκε από τον ασθενή και παρατήρηση για την εμφάνιση των χαρακτηριστικών για τους εντεροϊούς κυτταρικών αλλοιώσεων. Η διαδικασία αυτή είναι εξαιρετικά χρονοβόρος, διαρκεί 3-7 ημέρες, και επιπλέον δεν είναι αποτελεσματική για τα στελέχη των εντεροϊών τα οποία δεν προκαλούν τις χαρακτηριστικές κυτταρικές αλλοιώσεις.

Στην συγκεκριμένη εργασία αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο Real Time PCR για την ανίχνευση και τη μέτρηση του τίτλου εντεροϊού σε δείγματα μολυσμένων κυτταροκαλλιιεργειών. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν: μόλυνση των κυτταροκαλλιιεργειών με γνωστό τίτλο ιού, εφαρμογή του πρωτοκόλλου της Real Time PCR στα δείγματα που συλλέχθηκαν, δημιουργία πρότυπης καμπύλης υπολογισμού του ιικού τίτλου (φορτίου) και τέλος δοκιμαστική εφαρμογή της μεθόδου σε άγνωστα δείγματα.

Ως αποτέλεσμα της πειραματικής διαδικασίας δημιουργήθηκαν δύο πρότυπες καμπύλες υπολογισμού του ιικού τίτλου. Όταν ο ιικός τίτλος είναι υψηλός μπορούν να εξαχθούν αποτελέσματα σε 24 ώρες από τον εμβολιασμό του δείγματος σε κυτταροκαλλιέργεια και όταν ο τίτλος είναι χαμηλός σε 36 ώρες. Η εφαρμογή της μεθόδου σε άγνωστα κλινικά δείγματα επιβεβαίωσε την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των εντεροϊών αυτών σε χρονικό διάστημα 24-36 ωρών.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Βιολογία των εντεροϊών	8
1.1.1. Ταξινόμηση των εντεροϊών	8
1.1.2. Δομή και αντιγονικότητα των ικών σωματιδίων	10
1.1.3. Οργάνωση και δομή του ιικού γενόματος	14
1.2. Κύκλος ζωής των εντεροϊών	17
1.2.1. Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο	17
1.2.2. Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της ιικής πολυμεράσης	21
1.2.3. Αντιγραφή του ιικού RNA	25
1.2.4. Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ικών σωματιδίων	27
1.3. Διάγνωση	29
1.3.1. Διαφορική και προκαταρκτική διάγνωση	29
1.3.2. Διάγνωση μέσω κυτταρικής καλλιέργειας	30
1.3.3. Εργαστηριακή διάγνωση	33
2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	43
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
3.1. Στελέχη εντεροϊών	44
3.2. Μέτρηση της τιμής TCID <sub>50</sub> - Σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του ιού	44
3.3. Εκχύλιση του RNA	44
3.4. Αντίστροφη μεταγραφή (RT)	45
3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	45
3.6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR	47
3.7. Κλωνοποίηση	47
3.7.1. Δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων	47
3.7.2. Μετασηματισμός των βακτηρίων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια	48
3.7.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	48
3.8. Real Time PCR	48

3.9. Μόλυνση κυττάρων Rd	49
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
4.1. Αποτελέσματα PCR	50
4.2. Αποτελέσματα Real Time PCR	52
4.2.1. Δημιουργία καμπύλης αναφοράς	52
4.2.2. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης για τη μέτρηση του ιικού τίτλου	53
4.2.3. Αποτελέσματα εφαρμογής του πρωτοκόλλου της Real Time PCR σε άγνωστα δείγματα	55
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Βιολογία των εντεροϊών

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια ιών *Picornaviridae*. Είναι ιοί χωρίς έλυτρο και το γένωμά τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας. Το όνομα της οικογένειας αυτής των ιών είναι σύνθετο, καθώς αναφέρεται στο μικρό μέγεθος των ιών (*rico*), και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος που απαρτίζει το ιικό γένωμα (RNA) [Adams (2013)].

### 1.1.1. Ταξινόμηση των εντεροϊών

Η οικογένεια των ιών Picorna αποτελείται από εικοσιέξι γένη: *Aphthovirus*, *Aquamavirus*, *Anihepatovirus*, *Avisivirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicipivirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Gallivirus*, *Hepatovirus*, *Hunnivirus*, *Kobuvirus*, *Megrivirus*, *Mischivirus*, *Mosavirus*, *Oscivirus*, *Parechovirus*, *Pasivirus*, *Passerivirus*, *Rosavirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* and *Tremovirus* [(Adams (2013), Knowles (2012)]. Όσον αφορά τους εντεροϊούς, υπάρχουν δώδεκα διακριτά γένη με διάφορους οροτύπους ο καθένας (πίνακας 1.1.1.2)

Το γένος των εντεροϊών είναι το πιο σημαντικό ως προς τις ασθένειες που προκαλούν τα μέλη του στον άνθρωπο και απαρτίζεται από τους πολιοϊούς (3 ορότυποι), τους ιούς Coxsackie A (23 ορότυποι) και B (6 ορότυποι), τους Echo ιούς (28 ορότυποι), αλλά και άλλους εντεροϊούς που δεν έχουν ταξινομηθεί σε αυτές τις κατηγορίες, αλλά έχουν αριθμηθεί με βάση τη σειρά αναγνώρισής τους (εντεροϊοί 68-71). Οι εντεροϊοί πολλαπλασιάζονται στον πεπτικό σωλήνα, και είναι ανθεκτικοί στο χαμηλό pH [Racaniello (2007)].

Οι ιοί picorna είναι από τους πιο απλούς RNA ιούς, έχοντας ένα ισχυρά δομημένο καψίδιο. Άσχετα από το μικρό και περιορισμένο τους μέγεθος, η εξέλιξη στους ιούς picorna οδηγεί στη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού εύκολα διακριτών μελών, των επονομαζόμενων αντιγονικών οροτύπων [Racaniello (2007)].

Κάθε ορότυπος συσχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου ξενιστή και τη χρήση των ανάλογων υποδοχέων. Ο ορότυπος προσδιορίζεται από τις συνδετικές θηλιές και τα C- τελικά άκρα των καψιδιακών πρωτεϊνών που



περιβάλλουν την εξωτερική επιφάνεια του ιοσωμάτιου. Αυτά περιλαμβάνουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις του ιού. Μεταλλάξεις σε αυτές τις θέσεις μπορούν να προσδώσουν στον ιό νέες αντιγονικές παραλλαγές [Racaniello (2007)].

Οι συσχετισμοί αυτοί με βάση τις ασθένειες, παρ' όλα αυτά, έχουν μόνο μερική σχέση με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε πολιοϊούς, ιούς coxsackie A ή B και ιούς echo, η οποία βασίστηκε στην βιολογική ενεργότητα και νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με χαλαρή παράλυση (πολιοϊοί) - χαλαρή παράλυση σε νεογνά ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ και στοματικές φλύκταινες (ιοί coxsackie A) – σπαστική παράλυση σε νεογνά ποντίκια και ανθρώπινη καρδιακή νόσος και νόσος του ΚΝΣ (ιοί coxsackie B). Ανάμεσα στις ομάδες αυτές, οι ιοί μπορούν να ξεχωρίσουν βάσει της αντιγονικότητας τους όπως αυτή προσδιορίζεται με την βοήθεια αντι-ορών [Racaniello (2007)].

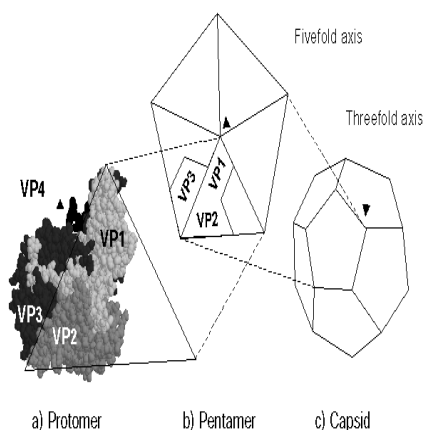
<i>Γένος Εντεροϊών</i>	<b>Αριθμός Οροτύπων</b>
Enterovirus A	25
Enterovirus B	61
Enterovirus C	23
Enterovirus D	5
Enterovirus E	4
Enterovirus F	6
Enterovirus G	11
Enterovirus H	1
Enterovirus J	6
Rhinovirus A	80
Rhinovirus B	32
Rhinovirus C	54

**Πίνακας 1.1.1.2:** Νέα ταξινόμηση των εντεροϊών και οι αντίστοιχοι ορότυποί τους (Πηγή: ICTV-2013)

Αυτές οι αντιγονικές ομαδοποιήσεις, που προσδιορίζουν τον ορότυπο, έγιναν περισσότερο πολύπλοκες καθώς αυξάνονταν ο αριθμός των διαφορετικών ιών. Η διάκριση μεταξύ οροτύπων άρχισε να περιπλέκεται καθώς ανακαλύπτονταν ιοί που σχετίζονταν ελάχιστα αντιγονικά με γνωστούς ορότυπους. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, ο ορότυπος παραμένει μια ιδιότητα που διαχωρίζει τους διαφορετικούς εντεροϊούς [Racaniello (2007)].

### 1.1.2. Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων

Τα ιοσωμάτια του εντεροϊού είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30 nm. Τα σωματίδια είναι απλά και αποτελούνται από πρωτεϊνικό νουκλεοκαψίδιο που περιβάλλει το γυμνό RNA. Τα ιοσωμάτια δεν διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο και η μολυσματικότητά τους είναι μικρή σε οργανικούς διαλύτες [Melnick (1996)]. Οι εντεροϊοί είναι σταθεροί σε όξινο περιβάλλον και διατηρούν τη μολυσματικότητά τους σε τιμές pH 3 και μικρότερες [Caspar (1962)].



**Εικόνα 1.1.2.1:** Απεικόνιση αξόνων συμμετρίας για το σχηματισμό εικοσαεδρικού καψιδίου

Τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 και VP4. Σύμφωνα με μελέτες των Caspar και Klug πάνω στις αρχές δόμησης των ιών [Caspar (1962)], ο καλύτερος τρόπος για να συναρμολογηθεί ένα κέλυφος με μη ταυτόσημες υπομονάδες είναι να διαταχθούν οι πρωτεΐνες με εικοσαεδρική συμμετρία. Ο μικρότερος αριθμός υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι 60. Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας, ενώ μεταξύ των πενταμερών

βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Τα αποτελέσματα μελετών περίθλασης ακτίνων X, ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και βιοχημικών μελετών στα ιοσωμάτια και τα προϊόντα διαχωρισμού τους οδήγησε στην υπόθεση ότι τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες σε εικοσαεδρική κατανομή [Rueckert (1969)]. Η αντίληψή μας για την δομή των

πολιοϊών έκανε ένα μεγάλο άλμα το 1985 όταν οι ατομικές δομές του πολιοϊού τύπου 1 καθορίστηκαν μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών X [Hogle (1985)].

Ο βασικός λίθος του καψιδίου των εντεροϊών είναι το πρωτομερές (P1), το οποίο περιέχει ένα αντίγραφο από κάθε δομική πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3 και VP4. Το κέλυφος σχηματίζεται από την VP1 έως τη VP3 και η VP4 υπάρχει στην εσωτερική επιφάνεια. Η VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν καμία αλληλουχική ομολογία, ωστόσο και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β'-βαρελίου. Η περιοχή αυτή είναι μια γωνιακή δομή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλα β'-φύλλα. Το ένα β'-φύλλο σχηματίζει τον «τοίχο» της γωνίας και το δεύτερο, που έχει μια κάμψη στο κέντρο, σχηματίζει τόσο τον «τοίχο» όσο και το «πάτωμα» της γωνίας. Το σχήμα αυτό διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων για να σχηματίσουν ένα πυκνό και άκαμπτο πρωτεϊνικό περίβλημα. Το πακετάρισμα των περιοχών των β'-βαρελίων ενισχύεται από ένα δίκτυο επαφών πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στο εσωτερικό του καψιδίου, συγκεκριμένα γύρω από τον πενταπλό άξονα. Το δίκτυο αυτό, που σχηματίζεται από τις N-τελικές προεκτάσεις των VP1, VP2, VP3 και VP4, είναι απαραίτητο για την σταθερότητα του ιοσωματίου. Η VP4 διαφέρει σημαντικά από τις άλλες τρεις πρωτεΐνες στο ότι παρουσιάζει μια εκτεταμένη διαμόρφωση. Η πρωτεΐνη αυτή είναι παρόμοια στη θέση και τη διαμόρφωση με τις N-τελικές αλληλουχίες των VP1 και VP3 και λειτουργεί σαν μια αποσπώμενη N-τελική επέκταση της VP2 παρά σαν μια ανεξάρτητη πρωτεΐνη του καψιδίου. Περαιτέρω τροποποίηση του N-τελικού άκρου της VP4, έχει προταθεί στην συμβολή της προσκόλλησης του ιού σε κυτταρικούς υποδοχείς, στην αποδιάταξη του καψιδίου, την απελευθέρωση του γενετικού υλικού στο κυτταρικό περιβάλλον αλλά και στη δημιουργία του καψιδίου, κατά τη συγκρότηση του ώριμου πλέον ιού (εικόνα 1.1.2.2) [72(1999)].

Οι κύριες δομικές διαφορές μεταξύ των VP1, VP2 και VP3 οφείλονται στους βρόγχους που συνδέουν τα β'-strands και τις N- και C-τελικές αλληλουχίες που εξέχουν της περιοχής του β'-βαρελίου. Αυτές οι αμινοξικές αλληλουχίες δίνουν σε κάθε *picorna* ιό την ξεχωριστή μορφολογία και αντιγονικότητα. Τα C-τελικά άκρα βρίσκονται στην επιφάνεια του ιοσωματίου και τα N-τελικά στο εσωτερικό του, δείχνοντας ότι προκύπτουν σημαντικές αναδιατάξεις του P1 προδρόμου κατά τον πρωτεολυτικό τεμαχισμό. Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους περιέχουν τις κύριες

αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Στους πολιοιούς έχουν αναγνωρισθεί τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIΑ και N-AgIIIΒ, [72(1999)].

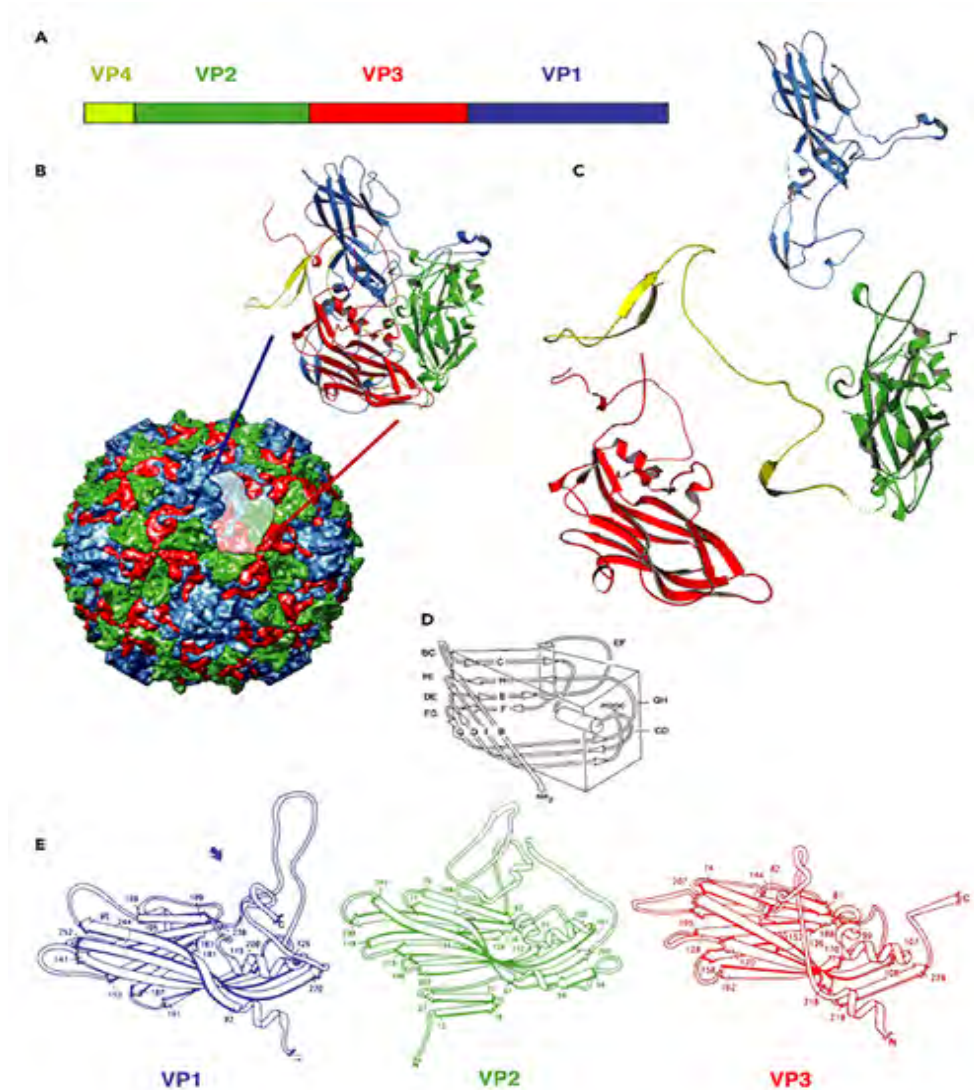
- Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 97, 99-101 της VP1
- Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-224 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.
- Η N-AgIIIΑ αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60, 66, 70 και 73 της VP3 καθώς και 236 της VP2 και 286-290 της VP1.
- Η N-AgIIIΒ από τα αμινοξέα 75-79 και 144 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2 [Chow (1987)].

Σχετικά με την επιφάνεια του ισοωματίου ανάλυση των δομών των πολιοϊών αποκάλυψε ότι έχουν μια συρρικνωμένη τοπογραφία. Μια προεξοχή (plateau), βρίσκεται στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, περιβαλλόμενος από μία αυλάκωση (canyon) και ακόμη μια προεξοχή στον τριπλό άξονα συμμετρίας. Η αύλακα αυτή βρίσκεται σε σταθερή ακτίνα γύρω από τον άξονα πενταπλούς συμμετρίας και στα πλάγια της βρίσκονται τμήματα των VP1, VP2 και VP3, αποτελεί την θέση πρόσδεσης στους υποδοχείς και είναι αρκετά μικρή, ώστε να αποφευχθεί η προσκόλληση των ογκωδών αντισωμάτων [Chow (1987)].

Στο εσωτερικό των ισοωμάτων, στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, τα N-τελικά άκρα πέντε μορίων της VP3 πρωτεΐνης σχηματίζουν ένα κυλινδρικό παράλληλο β'-φύλλο. Η δομή αυτή περιβάλλεται από πέντε τριπλά πλέγματα β'φύλλων σχηματισμένα από το N-τελικό άκρο των VP4 και VP1. Η ομάδα του μυριστικού οξέος συνδεδεμένη στο N-άκρο της VP4 επάγει την αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο αυτών δομών [Chow (1987)]. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών σταθεροποιούνται από ένα πλέγμα β'-φύλλων, που συντίθεται από τέσσερα β'-πλέγματα του VP3 βαρελιού και ένα πλέγμα από το N-άκρο της VP1 που περιβάλλει ένα διπλό πλέγμα β'-φύλλου του N-άκρου της VP2 ενός γειτονικού πενταμερούς [Filman (1989)].

Έχει προταθεί ότι τα καψίδια των Picorna ιών σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων με το γενωμικό RNA, πρόταση βασιζόμενη σε ευρήματα με τον *ιό bean rod*, ο οποίος σχετίζεται με τους ιούς picorna [Chen (1989)]. Ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την διάταξη του RNA των ιών Picorna. Μελέτες που αφορούσαν την ατομική δομή του πολιοϊού P2, έδειξαν ότι οι βάσεις του RNA, αλληλεπιδρούν με συντηρημένα αρωματικά κατάλοιπα της VP4 [Lentz

(1997)]. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην σταθερότητα του καψιδίου ή την απέκδυση.



**Εικόνα 1.1.2.2:** Δομικά χαρακτηριστικά των εντεροϊών.

A. Η οργάνωση των δομικών πρωτεϊνών στο γένωμα του ιού.

B. Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου του πολιοϊού, όπου φαίνεται το πακετάρισμα των VP1, VP2 και VP3 πρωτεϊνών. Η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου.

C. Τρισδιάστατα μοντέλα των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4.

D. Διάγραμμα που απεικονίζει το πώς τα οχτώ β'-πλέγματα κάθε πρωτεΐνης σχηματίζουν μια σφηνοειδή δομή με βρόγχους που συνδέουν τα πλέγματα μεταξύ τους.

E. Διάγραμμα τύπου ribbon των VP1, VP2 και VP3 όπου φαίνεται η κοινή δομή β'-βαρελιού.

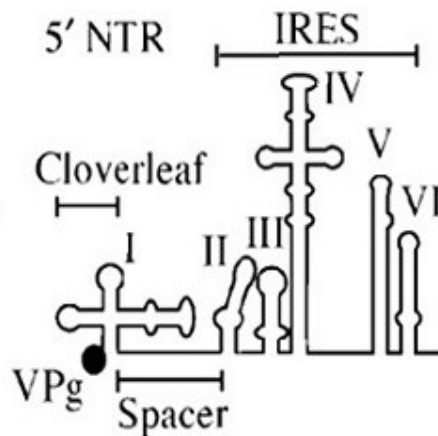
### 1.1.3. Οργάνωση και δομή του ιικού γενώματος

Το γένωμα των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA, μήκους περίπου 7.500 νουκλεοτιδίων. Το ικό RNA είναι μολυσματικό καθώς μεταφράζεται κατά την είσοδό του στο κύτταρο με σκοπό να παράγει όλες τις ικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή του ιού. Το RNA των εντεροϊών είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο( πλούσιο σε G+C) με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται VPg (Virion Protein, genome linked) [Flanegan (1977), Lee (1977)].

Η VPg διαφορετικών picorna ιών ποικίλλει σε μέγεθος από 22-24 κατάλοιπα αμινοξέων και κωδικοποιείται από ένα μοναδικό ιικό γονίδιο. Η VPg είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το 5'-ουριδυλιωμένο τμήμα του ικού RNA με δεσμό O<sub>4</sub>-(5'-ουριδύλιο)-τυροσίνης. Η VPg πιστεύεται ότι συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και εγκλεισμό του γενώματος στο καψίδιο, ενώ δεν είναι απαραίτητη για την μόλυνση κυττάρων από τους εντεροϊούς. Το mRNA των εντεροϊών διαφέρει από το ικό RNA μόνο στην έλλειψη της VPg. Τα ικά mRNA που αλληλεπιδρούν με τα κυτταρικά ριβοσώματα δεν φέρουν τη VPg πρωτεΐνη, αλλά περιέχουν μόνο ουριδινο-5'-φωσφορικό (pU) στα 5' άκρα τους [Nomoto

(a) (1977), Pettersson (1977)]. Η αφαίρεση της VPg από το ικό RNA καταλύεται από μια πρωτεΐνη του ξενιστή που ονομάζεται ένζυμο διαχωρισμού [Ambros (1978)]. Η VPg βρίσκεται στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, κάτι που οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η VPg είναι ένας εκκινητής για τη σύνθεση του RNA [Nomoto

(b) (1977), Pettersson (1978)]. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αποκάλυψε αρχικά ότι οι 5' μη-κωδικές περιοχές των εντεροϊών είναι μακριές και υψηλά δομημένες. Η περιοχή αυτή του γονιδιώματος περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και τη μετάφραση του γενώματος, ενώ η ύπαρξη δευτεροταγούς δομής φαίνεται να επηρεάζει τη σταθερότητα του RNA. Η 5' μη-κωδική περιοχή περιέχει την εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES-Internal



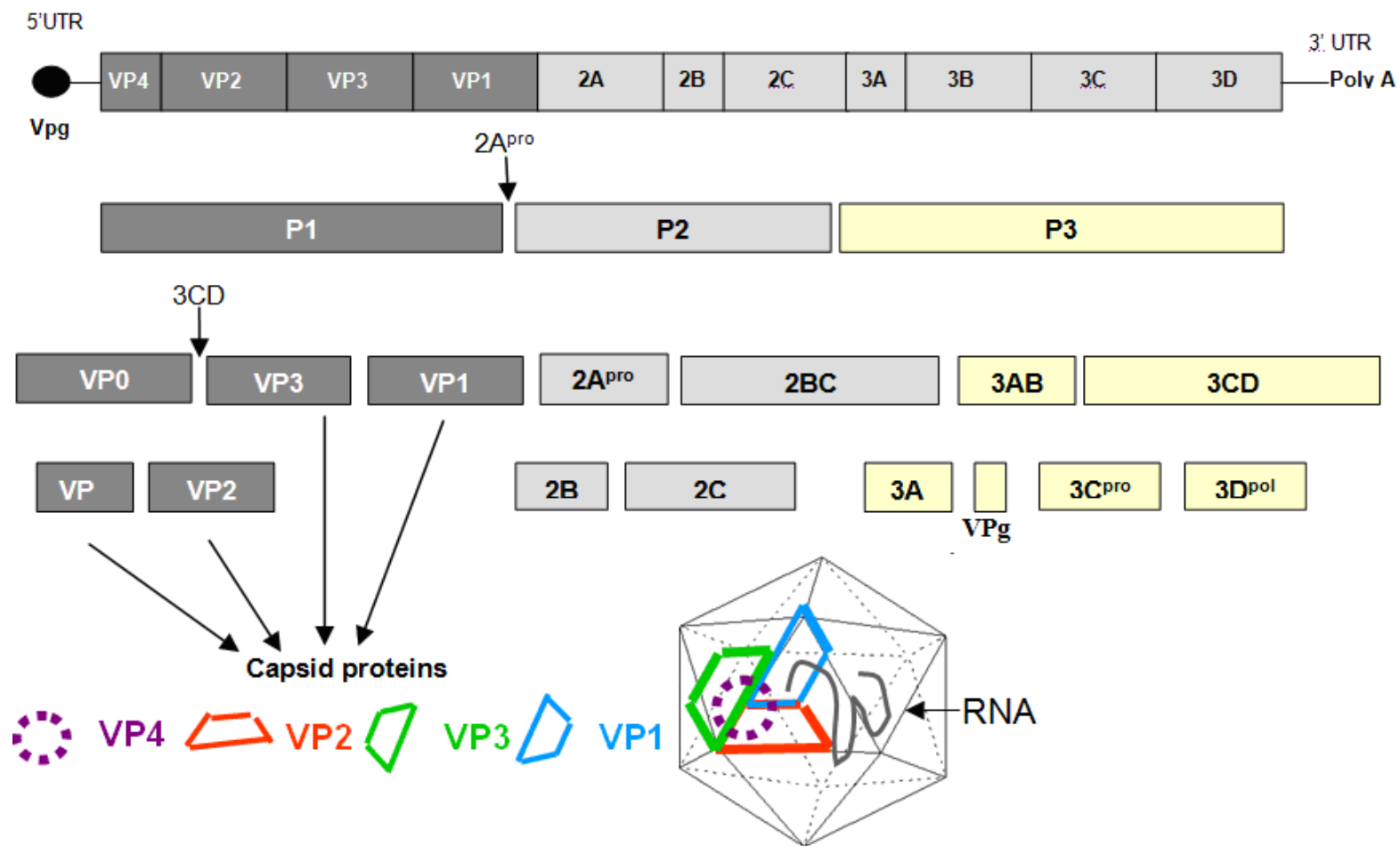
**Εικόνα 1.1.3.1:** Η 5' αμετάφραση περιοχή των εντεροϊών μαζί με το IRES.

Ribosome Entry Site) που κατευθύνει τη μετάφραση των mRNA με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα [Racaniello (2007)].

Η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών είναι μικρή, περίπου 72-100 νουκλεοτίδια, και φέρει επίσης μια δευτεροταγή δομή, που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA [Jacobson (1993)]. Ωστόσο, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών για τη μόλυνση των κυττάρων [Brown (2005), Todd (1997)]. Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA των εντεροϊών φέρει μια πολύ(A) ουρά [Yogo (1972)]. Το αρνητικής πολικότητας RNA φέρει μια 5' πολύ(U) ουρά, η οποία αντιγράφεται για να σχηματίσει την πολύ (A) του θετικού κλώνου [Yogo (1974)]. Ιικό RNA από το οποίο έχει αφαιρεθεί η πολύ(A) ουρά δεν είναι πια μολυσματικό [Spector (1974)].

Βιοχημικές μελέτες που έγιναν σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊούς, προέβλεψαν την παρουσία ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ιικό RNA, το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες [Summers (1968)]. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος των πολιοϊών, κάτι που αποκάλυψε ότι το ιικό RNA κωδικοποιεί για ένα μοναδικό ORF [Kitamura (1981), Racaniello (a) (1981)]. Παρόμοια στρατηγική γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιείται κατά την αντιγραφή όλων των picornaviruses. Η αρχική πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά την μετάφραση, έτσι ώστε το πλήρες προϊόν να μην εμφανίζεται. Ο τεμαχισμός γίνεται από πρωτεΐνάσες που κωδικοποιούνται από το ιικό γένωμα για να αποδώσουν στο τέλος 11 με 12 τελικά προϊόντα τεμαχισμού. Μερικά από τα πρόδρομα ατεμάχιστα μόρια έχουν επίσης ορισμένες λειτουργίες κατά την αντιγραφή.

Η πολυπρωτεΐνη χωρίζεται σε τρεις περιοχές: P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του ιικού καψιδίου, ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην περαιτέρω πρωτεϊνική επεξεργασία ( $2^{Apro}$ ,  $3C^{pro}$ ,  $3CD^{pro}$ ) και την αντιγραφή του γενώματος ( $2B$ ,  $2C$ ,  $3AB$ ,  $3B^{VPg}$ ,  $3CD^{pro}$ ,  $3D^{pol}$ ), ενώ ταυτόχρονα είναι φυλογενετικά περισσότερο συντηρημένες από την περιοχή που κωδικοποιεί για τις δομικές-καψιδιακές πρωτεΐνες. (εικόνα 1.1.3.2)



**1.1.3.2: Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών. Πάνω:** διάγραμμα του ιικού RNA γενώματος, με την VPg πρωτεΐνη στο 5'άκρο, το 5'UTR, τα γονίδια των δομικών και μη-δομικών πρωτεϊνών, την 3' UTR και την πολύ(A) ουρά. **Κάτω:** Ο τεμαχισμός της αρχικής πολυπρωτεΐνης αρχικά σε τρεις περιοχές P1,P2 και P3, στη συνέχεια στα ενδιάμεσα των ικών πρωτεϊνών και τέλος στις τελικές πρωτεΐνες του ιού.



## 1.2. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η αντιγραφή των εντεροϊών γίνεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Το πρώτο βήμα είναι η σύνδεση σε ένα κυτταρικό υποδοχέα. Το RNA τότε απεκδύεται, μια διαδικασία που περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στο καψίδιο. Μόλις, το θετικής πολικότητας ιικό RNA, εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, μεταφράζεται με σκοπό να παραχθούν ικές πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του ιικού γενώματος και την παραγωγή νέων ιοσωματίων. Οι ικές πρωτεΐνες συνθέτονται από μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται κατά την σύνθεσή της. Οι τεμαχισμοί γίνονται κυρίως από δύο ικές πρωτεΐνάσες: την 2A<sup>pro</sup> και την 3C<sup>pro</sup> ή 3CD<sup>pro</sup>. Μεταξύ των πρωτεϊνών που συντίθενται είναι και η ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση και οι βοηθητικές πρωτεΐνες οι οποίες απαιτούνται για την αντιγραφή του γενώματος και τη σύνθεση του mRNA. Το πρώτο βήμα της αντιγραφής του γενώματος είναι η αντιγραφή του θετικού RNA κλώνου. Κατά την αντιγραφή η ιική πολυμεράση συνθέτει αρχικά ένα συμπληρωματικό αρνητικής πολικότητας RNA κλώνο. Το βήμα αυτό ακολουθείται από την παραγωγή επιπρόσθετων θετικών κλώνων, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το νεοσυντιθέμενο RNA αρνητικής πολικότητας. Τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν σε μικρά μεμβρανικά κυστίδια που επάγονται από αρκετές ικές πρωτεΐνες. Όταν πλέον ο αριθμός των πρωτεϊνών του καψιδίου είναι αρκετός, αρχίζει η καψιδίωση. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται ώστε να παράγει ένα ανώριμο πρωτομερές, το οποίο στη συνέχεια συγκροτείται σε πενταμερή, σχηματίζοντας τελικά το εικοσαεδρικό καψίδιο. Τα νέο-συντεθειμένα, θετικής πολικότητας RNA εισέρχονται στα καψίδια με τα πενταμερή και και σχηματίζουν το μολυσματικό ιό [Racaniello (2007)].

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη κύκλο ενός εντεροϊού ποικίλλει από 5 έως 10 ώρες, κάτι που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο ξενιστής και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης [Racaniello (2007)].

Τα στάδια του κύκλου ζωής που περιγράφηκαν πιο πάνω αναλύονται στη συνέχεια (εικόνα 1.2.1.1):

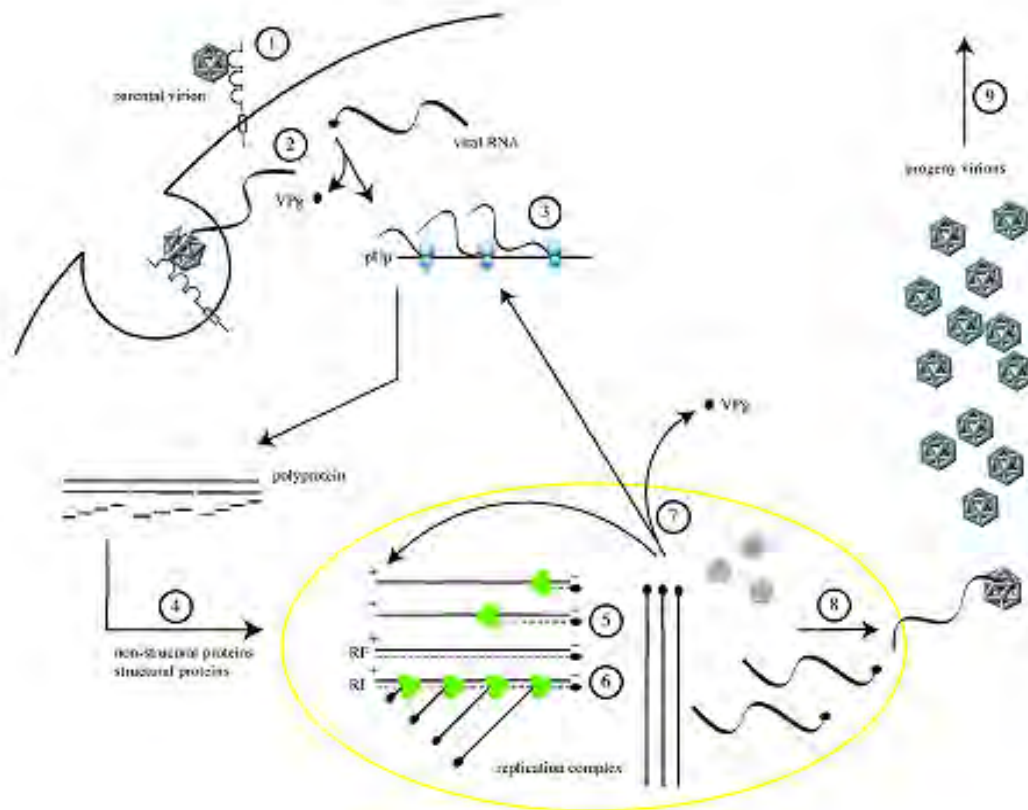
### 1.2.1. Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο.

Οι εντεροϊοί ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων μέσω της προσκόλλησής τους σε έναν ή περισσότερους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Οι ιοί έχουν προσαρμοστεί εξελικτικά για να χρησιμοποιούν τους υποδοχείς του κυττάρου, ως σημεία εισόδου στο κυτταρικό περιβάλλον. Η φύση των υποδοχέων αυτών παρέμενε άγνωστη μέχρι το 1989 που ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας των πολιοϊών (PVR) [Mendelsohn (1989)].

Πολλοί τύποι μορίων κυτταρικής επιφάνειας λειτουργούν ως κυτταρικοί υποδοχείς για τους *ricorna* ιούς, όπου και μερικοί μοιράζονται μεταξύ μελών άλλων οικογενειών. Η εξειδίκευση και έκφραση του υποδοχέα καθορίζει επίσης, εν μέρει, την παθολόγο δυναμική δράση ενός ιού, καθώς και τη φύση της ασθένειας που προκαλεί. Συγκεκριμένα για τους ευρέως μελετημένους πολιοϊούς, ο κυτταρικός υποδοχέας είναι ο CD155 ή PVR (poliovirus receptor). Η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα των πολιοϊών αποκάλυψε ότι ο υποδοχέας είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και μέλος της υπερικογενείας των ανοσοσφαιρινών, με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μια ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή ακολουθούμενη από δύο τύπου C2 περιοχές. Αποτελέσματα τριών διαφορετικών πειραμάτων έδειξαν ότι η πρώτη Ig-like περιοχή είναι η περιοχή που φέρει τη θέση σύνδεσης των πολιοϊών [Koike (1991), Morrison (1992)]. Μοντέλα των συμπλόκων πολιοϊών-PVR που παρήχθησαν από δεδομένα κρυσταλλογραφικής μικροσκοπίας δείχνουν ότι η πρώτη περιοχή έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του ιού.

Ορθόλογα του *pvr* γονιδίου βρίσκονται στα γονιδιώματα ενός αριθμού θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και αυτών που δεν είναι ευάλωτοι στην μόλυνση των πολιοϊών [Ida-Hosonuma (2003)]. Η αμινοξική αλληλουχία της περιοχής 1 του PVR ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των μη-ευάλωτων θηλαστικών, ειδικά στις περιοχές που είναι γνωστό ότι έρχονται σε επαφή με τους πολιοϊούς. Η απουσία θέσης σύνδεσης πολιοϊών σε αυτά τα μόρια PVR εξηγεί γιατί η μόλυνση των πολιοϊών είναι περιορισμένη στους πίθηκους. Αξίζει να σημειωθεί, πως αν και η κυτταρική λειτουργία του PVR είναι ακόμα άγνωστη, πιθανότατα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και συγκόλληση κυττάρων μεταξύ τους [Rossmann (1989)].

Οι αύλακες στο καψίδιο των πολιοϊών είναι οι θέσεις αλληλεπίδρασης με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Οι αύλακες αυτές είναι πάρα πολύ βαθιές ώστε να μην επιτρέπουν τη διείσδυση αντισωμάτων, [Rossmann (1989)].



**Εικόνα 1.2.1.1:** Σύνοψη του κύκλου ζωής του εντεροϊού. Σύνδεση σε κυτταρικό υποδοχέα (1) και απέκδυση του ιικού γενώματος (2). Αφαιρείται η VPg από το ιικό RNA, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται (3). Η πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά τη σύνθεσή της και παράγονται οι μεμονωμένες ικές πρωτεΐνες (4). Η σύνθεση του RNA γίνεται σε μεμβρανικά κυστίδια. Ο ιικός (+) RNA κλώνος αντιγράφεται από τις ικές RNA πολυμεράσες για να σχηματιστούν πλήρους μήκους (-) RNA κλώνοι (5), οι οποίοι αντιγράφονται στη συνέχεια για να παραχθεί επιπρόσθετο (+) RNA (6). Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, ο νέο-συντεθειμένος (+) RNA κλώνος μεταφράζεται για να παράγει επιπρόσθετες ικές πρωτεΐνες (7). Στα τελευταία στάδια της μόλυνσης, οι (+) κλώνοι εισέρχονται στο μορφογενετικό μονοπάτι (8). Τα νέο-συντεθειμένα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται από το κύτταρο με λύση (9).

Μεταλλάξεις στα αμινοξέα που σχηματίζουν την αύλακα μπορούν να αλλάξουν την συγγένεια σύνδεσης με τους υποδοχείς [Colston (1994), Colston (1995), Harber (1995), Liao (1997)].

Η αλληλεπίδραση του εντεροϊού με τον υποδοχέα του οδηγεί σε μείζονες δομικές αλλαγές του ιού. Τα επακόλουθα σωματίδια που ονομάζονται *altered* ή *σωμάτια A*, περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική πρωτεΐνη του καψιδίου VP4. Επιπροσθέτως, το N-άκρο της VP1, που συνήθως βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται πλέον στην επιφάνεια του σωματίου A [Fricks (1990)]. Η αλληλουχία αυτή της VP1 είναι υδρόφοβη και τα σωματίδια A έχουν μια αυξημένη συγγένεια προς τις μεμβράνες σε σχέση με τα ισωμάτια. Το λιπόφιλο N-άκρο της VP1 εισέρχεται στη συνέχεια στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Το RNA δεν είναι γνωστό εάν εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την κυτταρική μεμβράνη ή από την μεμβράνη των ενδοσωμάτων (ενδοκύτωση). Είναι όμως σίγουρο ότι η ενδοκύτωση από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει στην απέκδυση του πολιοϊού, καθώς οι αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση του πολιοϊού που οδηγούν στην απέκδυσή του επάγονται από τον PVR [Racaniello (2007)].

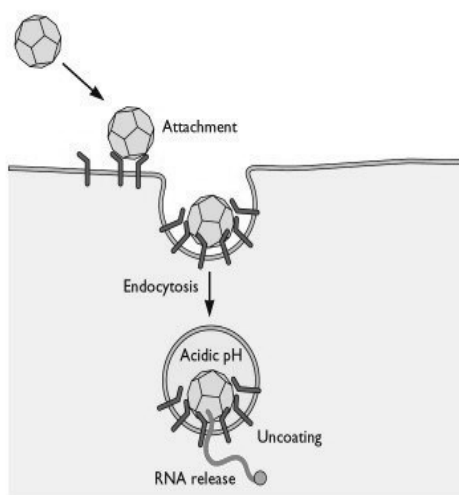
Δεν είναι γνωστό εάν η VP4 που απελευθερώνεται από το ιικό καψίδιο εγκαταλείπει το κύτταρο ή συμμετέχει στο σχηματισμό του πόρου. Είναι όμως ξεκάθαρο ότι η πρωτεΐνη αυτή απαιτείται στα αρχικά στάδια της εισόδου του ιού στο κύτταρο. Ένας ιός που φέρει μετάλλαξη στο 28<sup>ο</sup> αμινοξύ της VP4 μπορεί να συνδεθεί σε κύτταρα και να μετατραπεί σε σωματίο A, αλλά μπλοκάρεται σε επακόλουθο στάδιο κατά την είσοδο του ιού [Moscufo (1993)].

Επιπλέον μελέτες έδειξαν, ότι η αποτελεσματικότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των εντεροϊών και του PVR καθορίζεται, εν μέρει, από την αλληλουχία των αμινοξέων των αντιγονικών περιοχών και πιθανώς από την χωροταξική διαμόρφωση των αμινοξέων που βρίσκονται προσκείμενα σε αυτές τις περιοχές [Kew (1993)].

Αξίζει να σημειωθεί, πως πολλοί από τους ιούς αυτούς χρησιμοποιούν συστήματα σηματοδότησης του κυττάρου-ξενιστή για την ενεργοποίηση συνυποδοχέων, την επαγωγή ενδοκυτταρικών αποκρίσεων αλλά και την επαγωγή ενδοκυτταρικών συνθηκών, ευνοϊκών για την μόλυνση. Η σηματοδότηση που ξεκινά στην κυτταρική μεμβράνη πιθανότατα μπορεί να συνεχίσει σε κυτταροπλασματικά οργανίδια (πχ ενδοσώματα) [Kew (1993)]. Ανάλογα με τον ιό, τους υποδοχείς και το

κύτταρο-ξενιστή, η αρχική σύνδεση στους υποδοχείς μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση κινασών τυροσίνης ή άλλων κινασών, οι οποίες με τη σειρά τους, θα εκκινήσουν καταρράκτες αποκρίσεων στην πλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα [Pelkmans (2004), Greber (2002) , Tagawa (2005)]. Η επαγόμενη από τον ιό σηματοδότηση εξαρτάται από δεύτερους αγγελιαφόρους (phosphatidylinositides, διακυλογλυκερίδια, και ασβεστίου), και άλλους ρυθμιστές της μεταφοράς διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

Πολλοί από τους ιούς αυτής της κατηγορίας χρειάζονται μόνο την ύπαρξη ενός υποδοχέα για την είσοδό τους εντός της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ παράλληλα, για την είσοδο άλλων απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου μορίου, που ονομάζεται συνυποδοχέας. Για παράδειγμα, μερικοί από τους Coxsackieviruses B χρησιμοποιούν ως συνυποδοχέα τους, τις ιντεγκρίνες, ενώ πολλοί echoviruses την μικροσφαιρίνη για την είσοδό τους εντός του κυττάρου.



**Εικόνα 1.2.1.2:** Μοντέλο εισόδου των εντεροϊών στο κύτταρο. Το αρχικό ισωμάτιο προσδένεται στον PVR και υφίσταται μια αλλαγή στην διαμόρφωση επαγόμενη από τον υποδοχέα, η οποία οδηγεί στην παραγωγή των τροποποιημένων σωματίων A. Το ιικό RNA εξέρχεται από το σωματίο από την πλασματική μεμβράνη ή διαμέσω των ενδοσωμάτων.

### 1.2.2. Μετάφραση του ιϊκού RNA και επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης

Κατά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα το θετικής πολικότητας RNA πρέπει να μεταφραστεί καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση. Το θετικής πολικότητας RNA δεν φέρει δομές 5'-καλύπτρας, είναι όμως συνδεδεμένο με την VPg πρωτεΐνη, η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο [Ambros (1980)]. Η αλληλούχιση του θετικού κλώνου του πολιοϊού αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο που περιέχει επτά AUG κωδικόνια [Kitamura (1981), Racaniello (b) (1981)], κάτι που αργότερα βρέθηκε και σε άλλους picornaviruses, δείχνοντας την ύπαρξη υψηλά δομημένων RNA-δομών. Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα δεν ανιχνεύουν τις 5'-αμετάφραστες περιοχές, αλλά δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή που προάγει τη σύνδεση με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα ονομάστηκε εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος *IRES (Internal Ribosome Entry Site)* [Racaniello (2007)].

Τα IRES των ιών έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πέντε ομάδες με βάση ένα αριθμό κριτηρίων όπως: η αρχική αλληλουχία, η δευτεροταγής δομή, η τοποθεσία του κωδικονίου έναρξης και η ενεργότητα σε διάφορα κύτταρα. Μπορούμε να διακρίνουμε 2 τύπους IRES στους picorna ιούς. Τον τύπο I όπου ανήκουν οι εντεροϊοί και οι ρινοϊοί, τον τύπο II στον οποίο συγκαταλέγονται οι καρδοϊοί και αφθοϊοί. Στα τύπου I IRES το κωδικόνιο έναρξης βρίσκεται 50 με 100 νουκλεοτίδια πριν το 3'-άκρο του IRES [Racaniello (2007)].

Η έναρξη της μετάφρασης μέσω του τύπου I IRES περιλαμβάνει τη σύνδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας στο IRES και την ανίχνευση του κωδικονίου έναρξης. Η 40S υπομονάδα μπορεί να συνδεθεί απ' ευθείας στο RNA, ή στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με μεταφραστικές πρωτεΐνες έναρξης. Στην δεύτερη περίπτωση, η 40S υπομονάδα στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με την eIF3 συνδεδεμένη στην C- τελική περιοχή της eIF4G, που συνδέεται απευθείας στο IRES (εικόνα 1.2.2.1) [Racaniello (2007)].

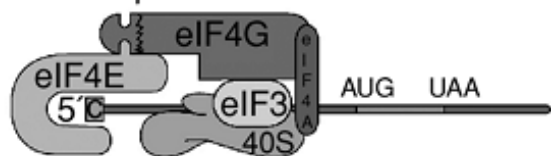
Υπάρχει μία μικρή διατήρηση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των IRES. Τα IRES των picorna ιών περιέχουν εκτεταμένες περιοχές δευτερεύουσας δευτεροταγούς δομής του RNA, που δεν είναι αυστηρά συντηρημένες μεταξύ των εντεροϊών αλλά είναι ζωτικής σημασίας για τη δέσμευση του ριβοσώματος. Ένα μοτίβο που είναι συντηρημένο μεταξύ των IRES των picorna ιών, είναι μία αλληλουχία GNRA (G γουανίνη, N οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, R πουρίνη, A

αδενίνη) στη θηλεία IV του τύπου I. Ένα άλλο συντηρημένο στοιχείο είναι ένα μοτίβο YN-Xm-AUG, στο οποίο η Yn είναι μία περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνη και το Xm είναι ένα διάστημα (spacer) 15 έως 25 νουκλεοτιδίων που ακολουθείται από ένα κωδικόνιο AUG [Racaniello (2007)].

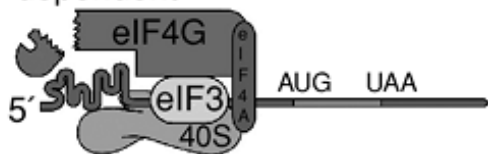
Οι πρωτεΐνες των εντεροϊών συνθέτονται από τη μετάφραση ενός μοναδικού, μεγάλου ORF που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας γικό RNA γένωμα και ακολουθεί τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης από πρωτεΐνάσες που κωδικοποιούνται από τον ιό. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει τη σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη δεν είναι εμφανής στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται κατά τη σύνθεσή της. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη επεξεργάζεται συμμεταφραστικά από ενδομοριακές αντιδράσεις (*in cis*) που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί, ακολουθούμενοι από δευτερεύουσες επεξεργασίες *in cis* ή *in trans* (διαμοριακές). Το γένωμα των εντεροϊών κωδικοποιεί για τρεις πρωτεΐνάσες: την L<sub>pro</sub>, την 2A<sup>pro</sup> και την 3C<sup>pro</sup> ή 3CD<sup>pro</sup> [Racaniello (2007)].

Σε μολυσμένα με εντεροϊό κύτταρα ο αρχικός τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης μεταξύ P1 και P2 γίνεται από την 2A<sup>pro</sup>. Διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες πρωτεολύονται από την 2A<sup>pro</sup>, όπως οι eIF4GI, eIF4GII και PABP. Στην πρόδρομη πρωτεΐνη των εντεροϊών, η θέση τεμαχισμού για την 2A<sup>pro</sup> είναι μεταξύ της τυροσίνης και της γλυκίνης. Η 3C<sup>pro</sup> είναι η πρωτεΐνάση που κάνει τον αρχικό τεμαχισμό μεταξύ 2C και 3A περιοχής. Σε αντίθεση με την 2A<sup>pro</sup>, η 3C<sup>pro</sup> τεμαχίζει και σε δεύτερο στάδιο τα P1 και P2 πρόδρομα μόρια. Η 3C<sup>pro</sup> των εντεροϊών τεμαχίζει μόνο διπεπτίδια Gln-Gly [Racaniello (2007)].

5'-end dependent

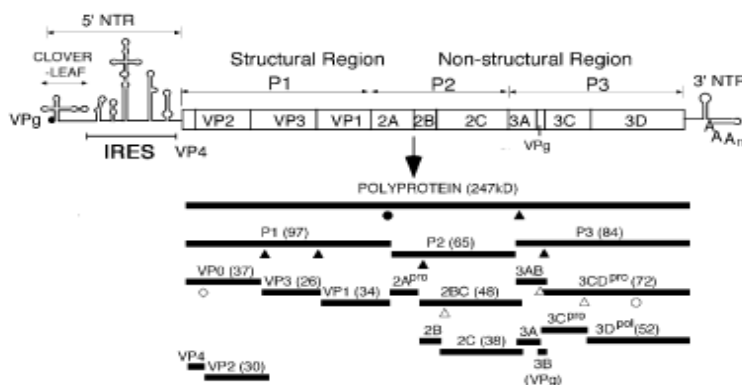


IRES-dependent



**Εικόνα 1.2.2.1:** Μοντέλα σχηματισμού συμπλόκων έναρξης της μετάφρασης. Πάνω φαίνεται η 5'-καλύπτρα-εξαρτώμενη έναρξη ενώ κάτω φαίνεται η IRES-εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης. Το eIF3-40S σύμπλοκο στρατολογείται στο RNA μέσω αλληλεπίδρασης του eIF4G με το IRES.

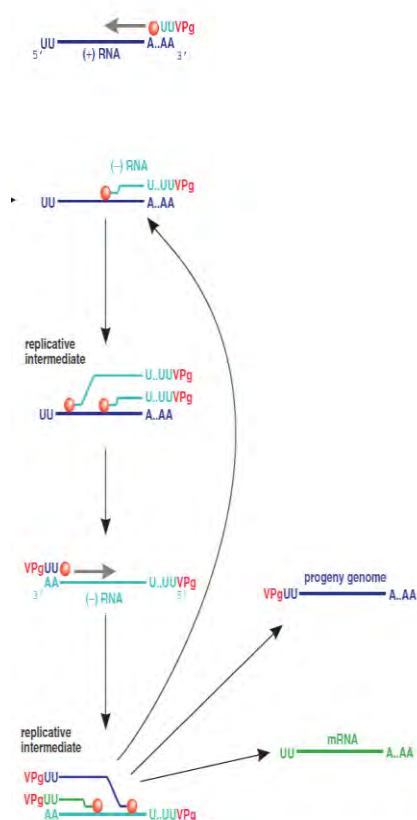
Τόσο η  $3C^{pro}$  όσο και η  $2A^{pro}$  είναι ενεργές στο πολυπεπίδιο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από την πολυπρωτεΐνη με αυτό-τεμαχισμό. Αφού απελευθερωθούν οι πρωτεΐνάσες, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη *in trans*. Ο αρχικός τεμαχισμός στον καταρράκτη επεξεργασίας της πολυπρωτεΐνης ξεκινάει με την απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2-P3 μέσω της  $2A^{pro}$ . Στη συνέχεια η  $3CD^{pro}$  απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο με αυτοκαταλυτικό τεμαχισμό. Η πρωτεΐνάση αυτή, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ικής RNA πολυμεράσης, κάνει δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπίδια γλουταμινικού-γλυκίνης στον τύπου 1 πολιοϊό πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την  $3C^{pro}$ . Τόσο η  $3C^{pro}$  όσο και η  $3CD^{pro}$  επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια δραστηριότητα. Σε μία αλληλουχία γεγονότων διάσπασης *in-trans* από την  $3CD^{pro}$ , οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg),  $3C^{pro}$ ,  $3D^{pol}$  και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Η  $3D^{pol}$  αλληλουχία μέσα στην  $3CD^{pro}$  απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας δραστική επεξεργασία από το  $3C^{pro}$  μέρος του ενζύμου. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Η παρουσία πολλαπλών δράσεων σε μια μοναδική πρωτεΐνη δεν υπάρχει στις ευκαρυωτικές πρωτεΐνάσες και είναι ένα παράδειγμα του πως η χωρητικότητα των μικρών ικών γενωμάτων μπορεί να μεγιστοποιηθεί [Racaniello (2007)].



**Εικόνα 1.2.2.2:** Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης. Τα τρίγωνα δείχνουν τα σημεία πρωτεόλυσης από τις  $3C^{pro}$  / $3CD^{pro}$  και οι κύκλοι από την  $2A^{pro}$  όπου τα μαύρα τρίγωνα δείχνουν γεγονότα πρωτεόλυσης που συμβαίνουν με γρήγορο ρυθμό και τα άσπρα τρίγωνα με αργό ρυθμό [Mueller (2005)].



### 1.2.3. Αντιγραφή του ιικού RNA



**Εικόνα 1.2.3.1:** Ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού RNA.

Η αντιγραφή του ιού ξεκινάει κατά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή. Αν και η διαδικασία της αντιγραφής των εντεροϊών, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, ένα απλό μοντέλο της αντιγραφής θα μπορούσε να είναι το εξής: ιικό RNA(+) $\rightarrow$ σύνθεση RNA(-) $\rightarrow$ RF $\rightarrow$  σύνθεση RNA(+) $\rightarrow$ RI $\rightarrow$  RNA(+), όπου RF (replicative form) δίκλωνο RNA πλήρους μήκους και RI (replicative intermediate) κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένους σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη. Η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών [Giachetti (1991), Novak (1991)].

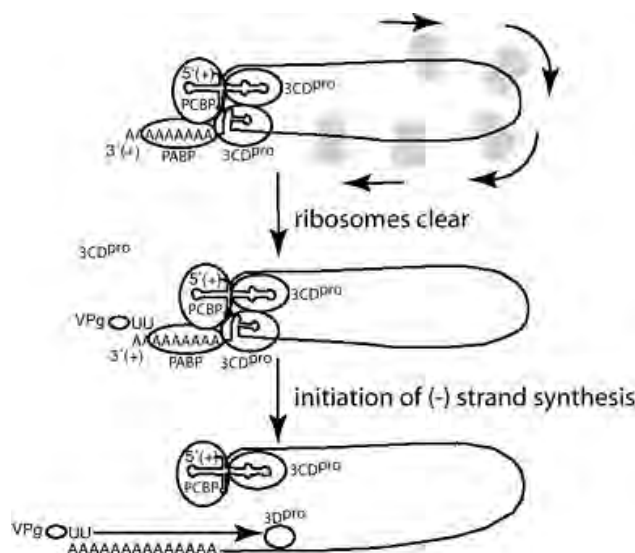
Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της αντιγραφής είναι η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Η RNA πολυμεράση του ιού ( $3D^{pol}$ ) παράγεται έπειτα από τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης  $3CD^{pro}$ , η οποία είναι άκρως δραστική ως πρωτεΐνωση αλλά δεν έχει δράση πολυμεράσης (εικόνα 1.2.3.1) [Wickman (1907), Rieder (2000)].

Η  $3D^{pol}$  είναι ένα ένζυμο που εξαρτάται από εκκινητή. Σε πειράματα *in vitro* η  $3D^{pol}$  δεν αντιγράφει το RNA των ιών χωρίς έναν ολίγο(U) εκκινητή. Τον ρόλο του εκκινητή στους εντεροϊούς έχει η πρωτεΐνη VPg, η οποία είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA, αλλά επίσης και στο 5'-άκρο των νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδιλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να σχηματίσει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element), που βρίσκεται στην

κωδική περιοχή των εντεροϊών [Wickman (1907), Rieder (2000)]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η *cre*-εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg γίνεται μόνο κατά τη σύνθεση των θετικών κλώνων και όχι στη σύνθεση των αρνητικών [Morasco (2003), Murray (2003)].

Μία μόλυνση με εντεροϊό οδηγεί σε αναδιάταξη των ενδοκυτταρικών μεμβρανών των μολυσμένων κυττάρων. Έτσι το ΕΔ και το σύμπλεγμα Golgi καταστρέφονται κατά τη διαδικασία αυτή και το κυτταρόπλασμα γεμίζει με κυστίδια διπλής μεμβράνης [Dales (1965), Schlegel (1996)]. Η ιική σύνθεση του RNA γίνεται στην επιφάνεια των κυστιδίων αυτών [Bienz (1987), Cho (1994), Egger (2000)]. Ο μεμβρανικός εντοπισμός των ιικών πρωτεϊνών αντιγραφής του RNA διασφαλίζει υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντιγραφής, αυξάνοντας τα επίπεδα δραστηριότητας των αντιδράσεων της αντιγραφής.

Τουλάχιστον δύο ικές πρωτεΐνες, η 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινητή VPg στην μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η 3AB δεσμεύει την 3D<sup>pol</sup> και την 3CD<sup>pro</sup>, στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να αγκυροβολήσει το ικό RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής [Echeverri (1995)].

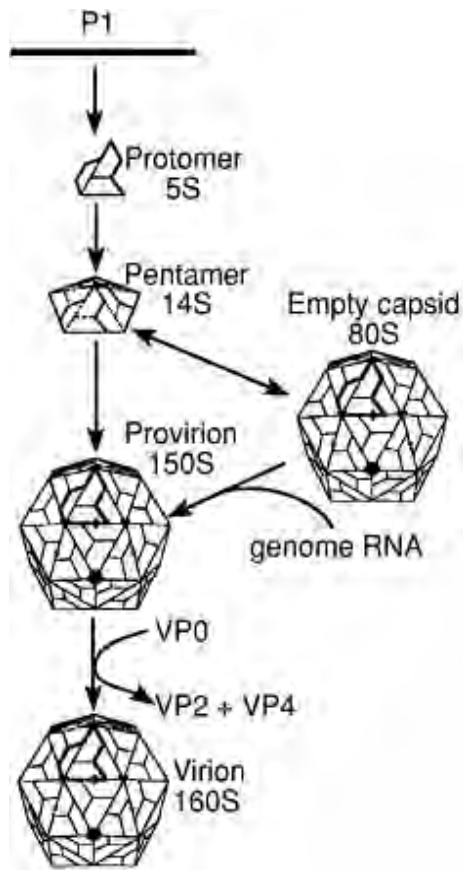


**Εικόνα 1.2.3.2:** Μοντέλο αλλαγής μεταξύ μετάφρασης και σύνθεσης του (-)RNA κλώνου. Οι ικές πρωτεΐνες 3CD<sup>pro</sup>, VPg, PABP και PCBP αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τα άκρα του RNA, σχηματίζοντας ένα κυκλικό RNP. Κατά την αναστολή της μετάφρασης, αρχικά, απομακρύνονται τα ριβοσώματα από το ικό RNA. Στη συνέχεια, η VPg-pUrpU αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του ικού RNA και σχηματίζει το κυκλικό πρωταρχικό RNA σύμπλοκο αντιγραφής. Η σύνθεση του (-)RNA κλώνου ξεκινάει με την επιμήκυνση του VPg-pUrpU από την 3D<sup>pol</sup>.

Το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή και των δυο διαδικασιών, δηλαδή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Προτάθηκε έτσι ένας μηχανισμός όπου η δομή cloverleaf (τριφυλλιού) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA ρυθμίζει, πότε το RNA αντιγράφεται και πότε μεταφράζεται. Στο μοντέλο αυτό, στις αρχές της μόλυνσης, η σύνδεση της πολύ-r(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης (*PCBP*-βοηθητική κυτταρική πρωτεΐνη) στην δομή αυτή επάγει τη μετάφραση. Όταν η 3CD<sup>pro</sup> συντεθεί, δεσμεύεται στη δομή cloverleaf, καταστέλλει την μετάφραση και επάγει τη σύνθεση του RNA. Ωστόσο, από πειραματικά στοιχεία, προκύπτει ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα τη σύγκρουση της RNA πολυμεράσης με το ριβόσωμα [Gamarnik (1998)].

#### **1.2.4. Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων**

Κατά τη σύνθεση της P1 πρωτεΐνης, της πρόδρομης καψιδιακής πρωτεΐνης, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές β-βαρελίου και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Όταν η P1 απελευθερώνεται από την 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 τεμαχίζονται από την πρωτεΐνάση 3CD<sup>pro</sup>. Αυτές οι θέσεις τεμαχισμού βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β-βαρελίων. Στο ώριμο καψίδιο, το καρβοξυτελικό άκρο της VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ το αμινοτελικό άκρο τους βρίσκεται στο εσωτερικό, όπου συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Η επεξεργασία αυτή παράγει το πρώτο συγκροτημένο ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, την ανώριμη δηλαδή δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο των VP0, VP3 και VP1. Πέντε πρωτομερή στη συνέχεια σχηματίζουν ένα πενταμερές, με συντελεστή καθίζησης 14S [Nomoto (a) (1977), Novak (1991)].



**Εικόνα 1.2.4.1:** Μορφογένεση του εντεροϊού. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται σε VP0+VP3+VP1 πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν το πρωτομερές 5S. Τα πρωτομερή σχηματίζουν τα πενταμερή 14S και αυτά με τη σειρά τους τα άδεια ικά καψίδια 80S. Τέλος, το (+)RNA εισέρχεται στο καψίδιο και η VP0 τεμαχίζεται σε VP2+VP4 σχηματίζοντας έτσι το μολυσματικό 160S ιοσωμάτιο.

Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει τον τεμαχισμό των περισσότερων VP0 μορίων σε VP4 και VP2. Η πρωτεΐνωση που πραγματοποιεί αυτόν τον τελευταίο τεμαχισμό ωρίμανσης δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα. Ο δεσμός της VP0 που κόβεται βρίσκεται στο εσωτερικό των άδειων καψιδίων και ώριμων ιοσωματίων και δεν είναι προσιτός σε ικές ή κυτταρικές πρωτεΐνες [Nomoto (a) (1977), Novak (1991)].

Η διαδικασία καψιδίωσης του εντεροϊού είναι ειδική, καταλήγοντας στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων RNA και όχι των ικών mRNA, αρνητικών ικών RNA ή οποιοδήποτε κυτταρικού RNA [Nomoto (a) (1977), Novak (1991)]. Επιπλέον μελέτες

έδειξαν, ότι η καψιδίωση του ικού γονιδιώματος συνδέεται με τη σύνθεση του RNA, και θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί μόνο τα RNA που περιέχουν VPg καψιδιώνονται [Tucker (1993)].

Κάτω από πειραματικές συνθήκες ο κύκλος ζωής των εντεροϊών είναι πολύ γρήγορος, καταλήγοντας στο θάνατο του κυττάρου ξενιστή περίπου 7-8 ώρες μετά τη

μόλυνση. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι εντεροϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης [Tucker (1993)]. Όταν τα κύτταρα μολυνθούν παραγωγικά με εντεροϊό, αναπτύσσουν τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές, γνωστές και ως κυτταροπαθογόνες επιδράσεις. Αυτές περιλαμβάνουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης, τον πολλαπλασιασμό των μεμβρανών κυστιδίων, αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης, διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών και τη σταδιακή αποικοδόμηση ολόκληρου του κυττάρου. Η αιτία των κυτταροπαθογόνων

επιδράσεων είναι άγνωστη. Μία υπόθεση είναι ότι η διαρροή των λυσοσωματικών περιεχομένων είναι εν μέρει υπεύθυνη [Guskey (1970)].

### **1.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

#### **1.3.1. Διαφορική και προκαταρκτική διάγνωση**

Η διάγνωση μίας μόλυνσης από εντεροϊό και η απόδειξη ότι μία μόλυνση που οφείλεται σε εντεροϊό οδηγεί σε ένα συγκεκριμένο κλινικό σύνδρομο είναι μια περίπλοκη διαδικασία και αποτελεί πρόκληση. Το γεγονός αυτό δημιουργείται τόσο από την ίδια τη βιολογία και την επιδημιολογία των μολύνσεων που προκαλούν οι εντεροϊοί όσο και από τους περιορισμούς που βάζουν τα σύγχρονα διαγνωστικά εργαλεία. Παρ' όλο που είναι δυνατό να αποδειχθεί ότι ένα άτομο έχει μολυνθεί από εντεροϊό, αυτό δεν οδηγεί στο άμεσο συμπέρασμα ότι είναι και η πιθανή αιτία της νόσου. Μία προκαταρκτική διάγνωση με υψηλό ποσοστό βεβαιότητας είναι, ωστόσο, δυνατή σε ορισμένες επιδημιολογικές και κλινικές καταστάσεις, βασισμένη μόνο σε κλινικά κριτήρια [Anonymous (1998)].

Ορισμένες βιολογικές ιδιότητες των εντεροϊών είναι αυτές που περιπλέκουν την διάγνωση των ασθενειών που οφείλονται σε αυτούς. Μία από αυτές είναι το γεγονός ότι η αντιγραφή των περισσότερων ιών και η μόλυνση λαμβάνουν χώρα στο αναπνευστικό και στο γαστρεντερικό σύστημα. Αυτού του είδους οι μολύνσεις είναι τις περισσότερες φορές ασυμπτωματικές, με πολύ λίγες κλινικές εκδηλώσεις όταν υπάρχουν. Επειδή οι μολύνσεις αυτές είναι εξαιρετικά συχνές ακόμα και η λήψη τυχαίων δειγμάτων από υγιή άτομα μπορεί να φανερώσει μολύνσεις από εντεροϊούς σε μεγάλα ποσοστά. Για το λόγο αυτό, η απομόνωση ή η ανίχνευση ιού από δείγμα μη αποστειρωμένων περιοχών δεν συνδέεται πάντα με ασθένεια αλλά μπορεί να είναι και τυχαίο γεγονός [Anonymous (1998)].

Μία δεύτερη δυσκολία είναι ότι ακόμα και όταν η ασθένεια προέρχεται από εντεροϊό, οι περισσότερες ενδείξεις και αποτελέσματα είναι αρκετά γενικής φύσης και συνήθως δεν έχουν εξειδίκευση. Αυτός είναι και ο λόγος που συχνά εξετάζεται η πιθανότητα μόλυνσης από εντεροϊό μόνο όταν έχουν αποκλειστεί οι άλλες πιθανές

αιτίες, οδηγώντας όμως έτσι σε απεμπλουτισμένα ή και μη διαθέσιμα πλέον δείγματα. Η συλλογή κατάλληλων κλινικών δειγμάτων για απομόνωση του ιού ή ανίχνευση είναι πολύ σημαντική για τον εργαστηριακό έλεγχο ώστε να επιβεβαιωθεί μια μόλυνση από εντεροϊό. Ορισμένες φορές δεν συλλέγονται δείγματα ακόμα και στην περίπτωση σοβαρών ασθενειών όπου οι εντεροϊοί ανήκουν ξεκάθαρα στις πιθανές αιτίες της μόλυνσης, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις μηνιγγίτιδας, εγκεφαλίτιδας ή μυοκαρδίτιδας [Anonymous (1998)].

Η αποκλειστική χρήση δειγμάτων από το κεντρικό νευρικό σύστημα και την καρδιά για τη διάγνωση τέτοιων ασθενειών περιορίζει την ευαισθησία ανίχνευσης της μόλυνσης. Για παράδειγμα, παρά το γεγονός ότι είναι δυνατό να ανιχνευθεί εντεροϊός στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε περιπτώσεις μηνιγγίτιδας δεν ισχύει το ίδιο και για εκείνες της εγκεφαλίτιδας. Η ανίχνευση ιού σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με εγκεφαλίτιδα είναι σπάνια, παρ' όλο που ο εντεροϊός αποτελεί μία λογική αιτία για την ασθένεια. Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις όπως σε εγκεφαλίτιδες που οφείλονται στον EV71, μπορεί να απομονωθεί ιός και από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό [Anonymous (1998)]. Το δείγμα που προσφέρει τη μεγαλύτερη ευαισθησία για την απόδειξη οξείας λοίμωξης ανεξάρτητα από τις κλινικές ενδείξεις, είναι το δείγμα κοπράνων [Mintz (1980)].

Η δυσκολία στην ανίχνευση του ιού επιτείνεται σε κάποιες περιπτώσεις καθώς η αποβολή του ιού από το γαστρεντερικό σύστημα μπορεί να σταματήσει πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την ευαισθησία της ιικής ανίχνευσης ακόμα περισσότερο.

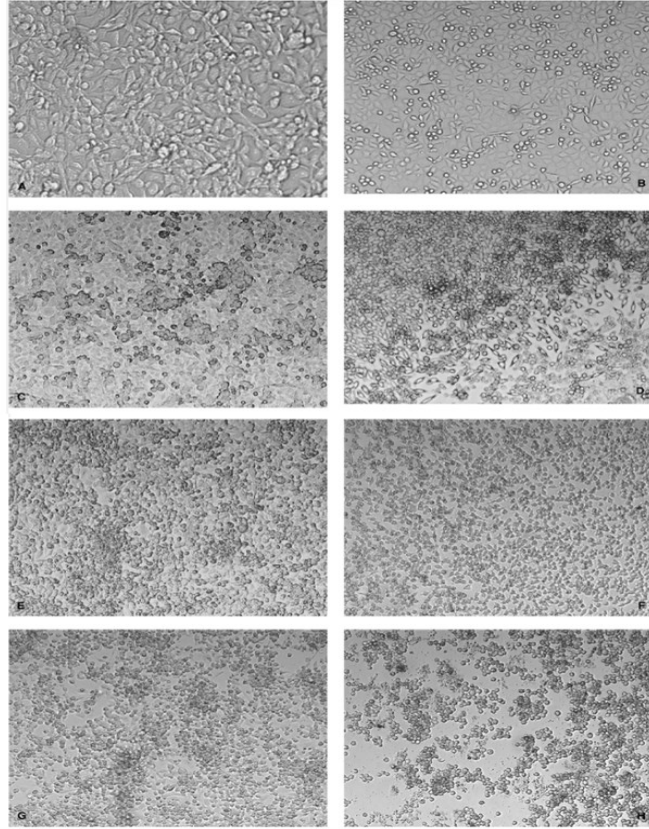
Κρούσματα άσηπτης μηνιγγίτιδας που εμφανίζονται στα τέλη του καλοκαιριού και τις αρχές του φθινοπώρου έχουν μεγάλη πιθανότητα να οφείλονται σε εντεροϊούς λόγω της έντονης εποχικότητας που παρουσιάζουν οι μολύνσεις από εντεροϊούς σε εύκρατα γεωγραφικά πλάτη. Έτσι στην περίπτωση αυτή μπορεί να γίνει μία προκαταρκτική διάγνωση μόλυνσης από εντεροϊό με βάση τις ενδείξεις και τα συμπτώματα.

### **1.3.2. Διάγνωση μέσω κυτταρικής καλλιέργειας**

Σε επίπεδο μικροσκοπίου , η μόλυνση εκδηλώνεται συνήθως μέσα σε 1 με 7 μέρες μέσω της εμφάνισης της χαρακτηριστικής κυτταρικής αλλοίωσης, η οποία χαρακτηρίζεται από ορατό στρογγύλεμα, συρρίκνωση, πυρηνική πύκνωση, διαθλαστικότητα και εκφυλισμό των κυττάρων (εικόνα 1.3.2.1) [Pezeshkpour (1987)].

Τα πρώτα αποτελέσματα μπορούν να είναι ορατά σε λιγότερο από 24 ώρες αν το ικό εμβόλιο περιέχει μεγάλο αριθμό λοιμογόνων παραγόντων. Ωστόσο, όταν το ικό φορτίο είναι μικρό οι αλλαγές στην κυτταρική καλλιέργεια δεν είναι ορατές για αρκετές μέρες παρά το γεγονός ότι ένας επαρκής αριθμός κυττάρων έχουν μολυνθεί. Επιπλέον, ορισμένοι εντεροϊοί είτε δεν προκαλούν καθόλου κυτταρικές αλλοιώσεις ή το κάνουν μετά από αρκετές ανακαλλιέργειες [Pezeshkpour (1987)].

Γενικά, όταν μπορούν να ανιχνευθούν εστιακές κυτταρικές αλλοιώσεις, η μόλυνση εξαπλώνεται γρήγορα στο στρώμα των κυττάρων με αποτέλεσμα την ολική καταστροφή της μονοστιβάδας, πολλές φορές μέσα σε μερικές ώρες. Η φύση των αλλοιώσεων σε διάφορες κυτταρικές καλλιέργειες είναι τόσο χαρακτηριστική ώστε μία προκαταρκτική διάγνωση μόλυνσης από εντεροϊό μπορεί να γίνει αρχικά με ανίχνευση για κυτταρικές αλλοιώσεις. Ωστόσο, ορισμένα από τα συστατικά του δείγματος που λαμβάνεται και ενίεται σε κυτταρικές καλλιέργειες για τη διάγνωση μπορούν να παράγουν κυτταροτοξικότητα στις πρώτες 24 ώρες, η οποία μπορεί να θεωρηθεί εσφαλμένα ως αλλοίωση οφειλόμενη στον ιο. Η διάκριση μεταξύ της κυτταροτοξικότητας και των κυτταρικών αλλοιώσεων που προκαλούνται από ική μόλυνση απαιτεί τη διεξαγωγή μιας επιπλέον ανακαλλιέργειας ώστε τα τοξικά συστατικά του δείγματος να αραιωθούν [Pezeshkpour (1987)].



**Εικόνα 1.3.2.1.** Φυσιολογικά και μολυσμένα με πολιοϊό κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος (RD) και L κύτταρα CD155 διαγονιδιακών ποντικών (κύτταρα L20B) σε κυτταροκαλλιέργεια. **A:** Μονοστοιβάδα φυσιολογικών RD κυττάρων σε καλλιέργεια. **B:** Κυτταροκαλλιέργεια RD που εμφανίζει τα πρώιμα στάδια των τυπικών κυτταρικών αλλοιώσεων μόλυνσης από πολιοϊό. Περίπου το 25% των κυττάρων εμφανίζουν αλλοιώσεις (κυκλικό σχήμα) που υποδεικνύουν ικό πολλαπλασιασμό (1+ βαθμός κυτταρικής αλλοίωσης). **C:** Κυτταροκαλλιέργεια RD που παρουσιάζει προχωρημένες αλλοιώσεις (3+ με 4+ βαθμός κυτταρικής αλλοίωσης). **D:** Σχεδόν το 100% των κυττάρων έχουν προσβληθεί και το μεγαλύτερο μέρος της κυτταρικής στοιβάδας έχει αποκολληθεί από το τοίχωμα του σωλήνα της κυτταροκαλλιέργειας. **E-H:** Παρόμοια στάδια με αυτά που φαίνονται στα **A-D**, στην περίπτωση μολυσμένων με πολιοϊό L20B κυττάρων ποντικού.



Οι ιοί μπορούν να ποσοτικοποιηθούν και οι κυτταρικές αλλοιώσεις που προκαλούν να οπτικοποιηθούν με το σχηματισμό πλακών σε κυτταρικές καλλιέργειες επικαλυμμένες με άγαρ. Οι πλάκες των πολιοϊών είναι πολύ χαρακτηριστικές καθώς παρουσιάζονται ως κυκλικές «τρύπες» με διαυγές κέντρο. Η ταχύτητα με την οποία εμφανίζονται οι πλάκες είναι συχνά μια εγγενής ιδιότητα ενός συγκεκριμένου ορότυπου και ενός τύπου κυτταρικής καλλιέργειας. Επιπλέον ορισμένοι ιοί οι οποίοι σχηματίζουν πλάκες σε μία κυτταρική σειρά, δεν μπορούν να σχηματίσουν αναγνωρίσιμες πλάκες σε μία άλλη κυτταρική σειρά [Pezeshkpour (1987)].

Όλοι οι γνωστοί εντεροϊοί μπορούν να πολλαπλασιάζονται είτε σε κυτταρικές καλλιέργειες είτε μέσω εμβολιασμού νεογέννητων ποντικών. Οι περισσότεροι ορότυποι μπορούν να αναπτυχθούν σε τουλάχιστον μία ή και περισσότερες κυτταρικές σειρές ανθρώπου ή πρωτευόντων θηλαστικών. Δεν υπάρχει, παρ' όλα αυτά, κυτταρική σειρά που να υποστηρίζει την ανάπτυξη όλων των εντεροϊών. Ακόμα και μετά από πολλά χρόνια πειραματισμών μερικοί ορότυποι μπορούν να αναπτυχθούν μόνο σε νεογέννητα ποντίκια. Το τυπικό φάσμα ξενιστών των ανθρώπινων εντεροϊών σε κυτταρικές σειρές ή σε ζώα φαίνεται στον πίνακα και δεν είναι ξεκάθαρα συνδεδεμένο με ένα συγκεκριμένο είδος ιού. Η μόλυνση των κυττάρων στόχων εξαρτάται από τη σύνδεση των ιών σε ειδικούς υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια. Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν πολλούς διαφορετικούς υποδοχείς. Μία πρακτική προσαρμογή, που προέρχεται από την ταυτοποίηση και τη γενετική κλωνοποίηση των υποδοχέων των εντεροϊών, είναι η εισαγωγή των υποδοχέων σε ζώα ή σε κύτταρα τα οποία δεν επιτρέπουν σε κανονικές συνθήκες την μόλυνση από τον ιο. Αυτή η προσέγγιση οδήγησε τόσο σε πρόοδο όσο και στην κατανόηση της παθογένειας των πολιοϊών σε μοντέλα μη πρωτευόντων ζώων όσο και στην πρακτική εφαρμογή της σε διαγνωστικά εργαστήρια [Pezeshkpour (1987)].

### **1.3.3. Εργαστηριακή διάγνωση**

Η εφαρμογή των τεχνικών της μοριακής βιολογίας στην κλινική ιολογία έχει αλλάξει σημαντικά τις προσεγγίσεις στη διάγνωση των εντεροϊών. Λόγω των σαφών

πλεονεκτημάτων που προσφέρουν σε ταχύτητα πολλές από αυτές τις διαδικασίες έχουν ήδη αντικαταστήσει τις παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης και χαρακτηρισμού. Συνεχής ανάπτυξη και τελειοποίηση αυτών των τεχνικών θα οδηγήσει, χωρίς αμφιβολία, σε περαιτέρω εφαρμογή των μεθοδολογιών σε ένα ακόμα πιο ευρύ φάσμα διαγνωστικών προβλημάτων πάνω στους εντεροϊούς και στην καθιέρωση της χρήσης τους σε διαδικασίες ρουτίνας.

Όπως και με την απομόνωση των ιών και τον καθορισμό του οροτύπου τους, οι μοριακές μέθοδοι προσπαθούν να ανιχνεύσουν την παρουσία εντεροϊού σε ένα δείγμα και να χαρακτηρίσουν περαιτέρω τον ιό σε μοριακό επίπεδο που ανίχνευσαν. Οι τεχνικές μπορούν να χωριστούν σε ομάδες με βάση την υποδομή και τις τεχνικές απαιτήσεις τους και τους τύπους δειγμάτων που μπορούν να εφαρμοστούν. Επιπλέον, τα τεστ μπορούν να χωριστούν με βάση τον τύπο της απάντησης που δίνει καθένα από αυτά και την προγνωστική αξία ενός θετικού και ενός αρνητικού αποτελέσματος.

Η πρώτη μεγάλη ομάδα δοκιμών βασίζονται στην PCR, η οποία χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για να ανιχνεύει το γονιδίωμα εντεροϊών σε κυτταροκαλλιέργειες, κλινικά δείγματα και ιστούς από βιοψίες και νεκροψίες. Η δεύτερη ομάδα τεστ, βασίζεται στον υβριδισμό μεταξύ ανιχνευτών νουκλεϊκών οξέων και χρησιμοποιείται τόσο για την αναγνώριση όσο και για τον χαρακτηρισμό παρά την μικρότερη ευαισθησία που παρουσιάζει σε σχέση με την PCR. Η τρίτη διαδικασμία χρησιμοποιεί γονιδιωματική αλληλούχιση για το χαρακτηρισμό των εντεροϊών στα υψηλότερα επίπεδα εξειδίκευσης.

## **I. Μοριακή ανίχνευση**

Η πιο συχνή χρήση της PCR για τη διάγνωση των εντεροϊών είναι η άμεση ανίχνευση του ιού σε κλινικά δείγματα [Kessler (1997), Olive (1990), Rotbart (1994)]. Παρά τον μεγάλο αριθμό των παραλλαγών που υπάρχουν για τις λεπτομέρειες της κάθε διαδικασίας, όλες οι μέθοδοι που μπορούν να ανιχνεύσουν εντεροϊούς έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Η πιο σημαντική ιδιότητα αυτών των δοκιμασιών είναι ότι οι εκκινητές στοχεύουν στο να ενισχύσουν την 5' UTR του ιικού γονιδιώματος. Έχουν δημοσιευθεί πολλοί διαφορετικοί εκκινητές που στοχεύουν σε

αυτή την περιοχή και στοχεύουν ο καθένας διαφορετική αλληλουχία παρέχοντας έτσι διαφορετικού μήκους προϊόντα. Πολλοί από αυτούς τους εκκινητές, ωστόσο, δεν έχουν αξιολογηθεί πλήρως από έναν μεγάλο αριθμό κλινικών δειγμάτων για να επιβεβαιωθεί ότι αντιδρούν με όλους τους οροτύπους και τα στελέχη των εντεροϊών και για το λόγο αυτό δεν έχει επικυρωθεί επαρκώς η χρήση τους για διαγνωστικούς σκοπούς [Muir (1999)]. Το βασικό πλεονέκτημα της PCR για όλους τους εντεροϊούς είναι ότι καθιστά δυνατή την ταχύτατη ανίχνευση του ιού ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις από κλινικά δείγματα, όπως συμβαίνει με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Είναι ακόμα πιθανό να ανιχνευθούν εντεροϊοί που δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε κυτταρική καλλιέργεια. Όπως συμβαίνει με όλες τις PCR, η ευαισθησία ενίσχυσης του RNA από βιολογικά δείγματα ποικίλει σε μεγάλο βαθμό και εξαρτάται από τη φύση του δείγματος. Παρ' όλο που έχει αποδειχθεί ότι η διαδικασία της PCR μπορεί να δώσει θετικό αποτέλεσμα ακόμα και από ένα μόνο ή πολύ λίγα αντίγραφα του ιικού RNA, δεν είναι σπάνιο σε ορισμένα δείγματα, όπως για παράδειγμα αυτά των κοπράνων, η ευαισθησία της να είναι αρκετές τάξεις μεγέθους χαμηλότερη [Ahmed (1997), Tanel (1996)].

Βασιζόμενες σε αυτές τις αρχές αναπτύχθηκε ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων PCR και RT-PCR που έχουν ως στόχο την ενίσχυση του RNA του εντεροϊού και ακολουθούνται από μια ποικιλία τεχνικών τελικού εντοπισμού και ορισμένες φορές ποσοτικοποίησής του. Μία τέτοια μέθοδος αναπτύχθηκε για τη διάγνωση της μηνιγγίτιδας που οφείλεται σε εντεροϊό κατά την οποία δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού υπέστησαν αντίστροφη μεταγραφή και ενίσχυση σε ένα βήμα για την αποφυγή επιμολύνσεων και στη συνέχεια η ανίχνευση έγινε χρωματομετρικά σε μικροπλάκα. Η ευαισθησία, η ειδικότητα και η θετική και αρνητική προγνωστική αξία της μεθόδου υπερέχαν σε σύγκριση με αυτές της διάγνωσης μέσω κυτταροκαλλιέργειας. [Harley (1994)]. Η διάγνωση της μηνιγγίτιδας που προκαλείται από εντεροϊούς οδήγησε στη δημιουργία και μίας άλλης μεθόδου όπου κατά την RT-PCR τα προϊόντα σημαίνονται με βιοτίνη και ακολουθεί ανίχνευσή τους με μία ενζυμική δοκιμή ολιγοπροσρόφησης (ELOSA). Και σε αυτή την περίπτωση η ειδικότητα και η ευαισθησία ήταν αυξημένες και ο χρόνος διεξαγωγής μειωμένος σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους [Stellrecht (2000)]. Άλλη μία μέθοδος που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση εντεροϊών σε κλινικά δείγματα ήταν με τη χρήση PCR ακολουθούμενη από μία δοκιμασία δέσμευσης σε

μικροπλάκα. Πιο συγκεκριμένα τα προϊόντα της PCR σημαίνονται με διγοξιγενίνη-dUTP κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης και υβριδίζονται με βιοτινυλιωμένους ολιγο-ανιχνευτές οι οποίοι δεσμεύονται σε μικροπλάκες με στρεπταβιδίνη. Η ανίχνευση των προϊόντων και συνεπώς της ιικής παρουσίας γίνεται με τμήματα Fab αντι-διγοξιγενίνη συνδεδεμένα σε περοξιδάση. Αυτή η μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύσει μεταξύ 1 και 10 αντιγράφων RNA εντεροϊού σε 100 μl βιολογικού δείγματος [Andreoletti (1996)].

Όπως έχει αναφερθεί η αντιγονική ιδιότητα των ιών που καθορίζει τον ορότυπο αποτελεί ιδιότητα των πρωτεϊνών του ιικού καψιδίου, για το λόγο αυτό ορισμένες αλληλουχίες αντιστοιχούν σε αυτές τις συντηρημένες αντιγονικές αλληλουχίες μέσα στην περιοχή του ιού που κωδικοποιεί την καψιδιακή περιοχή. Εκτεταμένες έρευνες της καψιδιακής περιοχής απομονωμένων πολιοϊών οδήγησαν στο σχεδιασμό εκκινητών που μπορούν να ενισχύουν επιλεκτικά απομονώσεις από έναν μόνο ορότυπο αλλά όχι από άλλες απομονώσεις ετερόλογων οροτύπων [Kilpatrick (1998)]. Αυτό επιτυγχάνεται παρά το υψηλό ποσοστό υποκαταστάσεων συνώνυμων νουκλεοτιδίων, με τη χρήση ινοσίνης κατά τη σύνθεση των εκκινητών. Με ανάλογο τρόπο, ικανότητα των πολιοϊών να δένουν με μοναδικό τρόπο στον υποδοχέα CD155 είναι και αυτή μια εγγενής ιδιότητα της καψιδιακής πρωτεΐνης. Τα αμινοξέα που εμπλέκονται στη δέσμευση με τον υποδοχέα έχουν χαρακτηριστεί από μελέτες της τρισδιάστατης δομής του ιικού σωματίου. Όταν οι εκκινητές σχεδιάζονται για να αντιστοιχούν σε αυτές τις πιθανόν ειδικές για πολιοϊούς αλληλουχίες, παρατηρείται ενίσχυση σε όλες τις απομονώσεις πολιοϊών αλλά σε κανέναν άλλο εντεροϊό [Kilpatrick (1996)]. Είναι δυνατή, όπως δείχνουν τα μέχρι τώρα δεδομένα, η επέκταση αυτών των αρχών και σε υποδοχείς άλλων ομάδων και οροτύπων εντεροϊών και η δημιουργία εργαλείων για γρήγορο χαρακτηρισμό των οροτύπων των εντεροϊών χωρίς τη χρήση κυτταροκαλλιεργειών [Hohenadl (1991)].

Οι ανιχνευτές νουκλεϊκών οξέων, αποτελούσαν την πρώτη εφαρμογή των μοριακών τεχνικών που αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση γονιδιωμάτων εντεροϊών, αντικαθίστανται σε ευρεία κλίμακα από την PCR. Η πρώτοι ανιχνευτές κατασκευάστηκαν με σύνθεση cDNA από ιικό RNA από CVB. Το cDNA στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε σε βακτήρια, και σημάνθηκε ραδιοχημικά για να δώσει το αντιδραστήριο για την ανίχνευση γονιδιωμάτων εντεροϊών με υβριδισμό των

νουκλεϊκών οξέων. Περαιτέρω τελειοποίηση της τεχνικής περιείχε τη χρήση ανιχνευτών RNA για βελτίωση της ευαισθησίας με την εισαγωγή μη ραδιοχημικής σήμανσης των ανιχνευτών και την εφαρμογή αυτών των τεχνικών για *in situ* υβριδισμό σε ιστό μυοκαρδίου [Hohenadl (1991)]. Αυτή η τεχνική ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη για την κατανόηση της κυτταροπαθολογίας της μόλυνσης από εντεροϊό, ιδιαίτερα σε μελέτες πάνω στη μυοκαρδίτιδα. Η τεχνική αυτή, ωστόσο, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αναγνωρίσει τον ορότυπο του εντεροϊού σε ένα δείγμα καθώς ο ανιχνευτής μπορεί να προσδεθεί επίσης και σε συγγενείς οροτύπους.

Η υβριδοποίηση με ανιχνευτές νουκλεϊκών οξέων έχει χρησιμοποιηθεί ακόμα ευρέως και στο πρόγραμμα εκρίζωσης των πολιοϊών ως βασική τεχνική για τον διαχωρισμό μεταξύ εκείνων που προέρχονται από εμβόλια και των άγριων πολιοϊών [De (1997)].

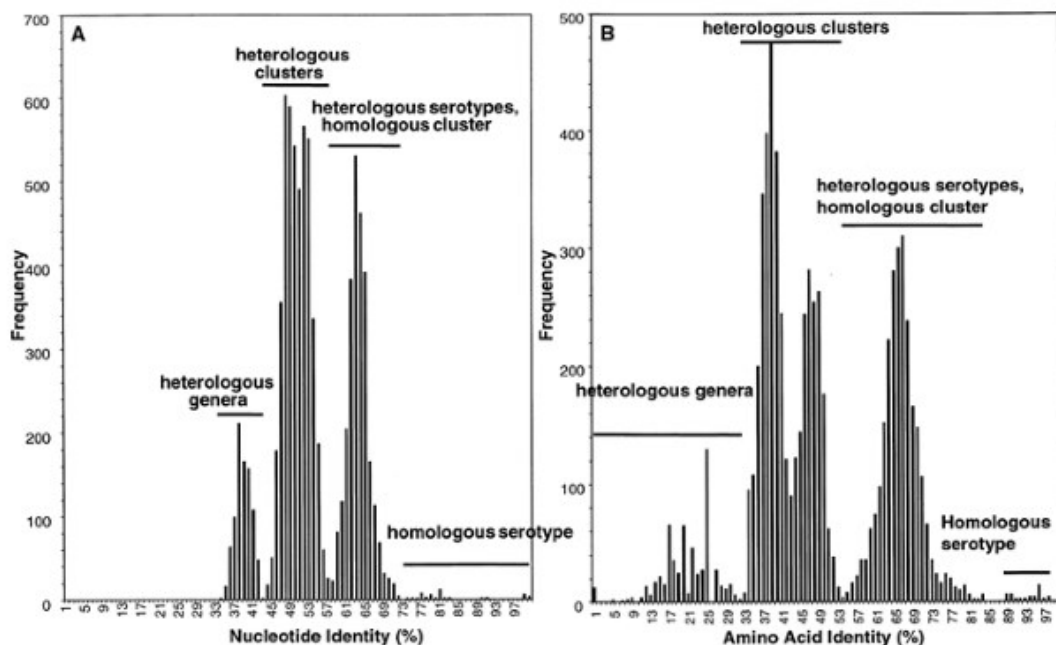
Ένας από τους στόχους της ιικής αναγνώρισης είναι η γνώση της αλληλουχίας του ιικού γονιδιώματος. Επομένως οι πληροφορίες της αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων ενός ιού αποτελούν τον πλήρη χαρακτηρισμό του. Όλες οι σημαντικές πληροφορίες για έναν ιό θα μπορούσαν, πιθανά, να αποκτηθούν μέσω PCR σε συνδυασμό με αλληλούχιση, αν όλοι οι μοριακοί συσχετισμοί των ιικών φαινοτυπικών καθοριστών ήταν κατανοητοί [Oberste (1999)].

Παρ' όλα αυτά, σήμερα είναι δυνατή η χρήση των πληροφοριών της αλληλουχίας για να ταξινομηθεί ένας απομονωμένος εντεροϊός στον ορότυπο που ανήκει [Oberste (1999)]. Το μοριακό σύστημα ταξινόμησης βασίζεται στην RT-PCR και σε νουκλεοτιδική αλληλούχιση της μισής ή ολόκληρης της 3' γονιδιοματικής περιοχής που κωδικοποιεί τη VP1. Η ταξινόμηση σε έναν ορότυπο ενός γνωστού απομονωμένου ιού γίνεται μέσω σύγκρισης της μερικής VP1 αλληλουχίας με μία βάση δεδομένων που περιέχει VP1 αλληλουχίες για το πρωτότυπο και τα διαφοροποιημένα στελέχη και από τους 92 ορότυπους ανθρώπινων εντεροϊών. Οι ακόλουθες κατευθυντήριες γραμμές έχουν προταθεί για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας ταξινόμησης:

- i. μία μερική ή πλήρης VP1 νουκλεοτιδική αλληλουχία με αντιστοιχία >75% (>85% αντιστοιχία αμινοξέων) μεταξύ ενός απομονωμένου εντεροϊού από κλινικό δείγμα και του πρωτότυπου στελέχους οροτύπου μπορεί να

- χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει τον ορότυπο του ιού, με προϋπόθεση ότι το δεύτερο υψηλότερο ποσοστό είναι <70%
- ii. μία αντιστοιχία με υψηλότερο ποσοστό <70% μπορεί να υποδεικνύει ότι ο απομονωμένος εντεροϊός ανήκει σε έναν άγνωστο, και πιθανά νέο, ορότυπο
  - iii. μία αντιστοιχία μεταξύ 70% και 75% υποδεικνύει ότι απαιτείται επιπλέον χαρακτηρισμός πριν την ταξινόμηση του απομονωμένου εντεροϊού [Oberste (2004)].

Με τη χρήση αυτών των κανόνων, στελέχη ομόλογων οροτύπων μπορούν εύκολα να διακριθούν από ετερόλογους οροτύπους και επιπλέον νέοι ορότυποι μπορούν να αναγνωρισθούν (εικόνα 1.3.3.I.1)



**Εικόνα 1.3.3.I.1.** Αναγνώριση οροτύπου με χρήση των δεδομένων αλληλουχίας. Κατανομή συχνότητας των βαθμολογιών ζευγών ταυτότητας για σύγκριση με VP1 νουκλεοτίδια και αλληλουχίες αμινοξέων. **A:** Κατανομή των αλληλουχικών νουκλεοτιδίων. **B:** Κατανομή αμινοξέων [Oberste (1999)]. Η αναγνώριση του οροτύπου ενός απομονωμένου δείγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί συγκρίνοντας την αλληλουχία του με γνωστές αλληλουχίες της VP1 περιοχής για όλους τους οροτύπους και ψάχνοντας για αντιστοιχίες μεγαλύτερες από το 75% σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και 88% σε αμινοξικές αλληλουχίες.

Αυτή η μέθοδος μπορεί να μειώσει σε μεγάλο βαθμό το χρόνο που απαιτείται για να ταξινομηθεί ένας εντεροϊός και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση απομονωμένων ιών που η ταξινόμησή τους με τη χρήση ανοσολογικών

αντιδραστηρίων είναι δύσκολη ή και αδύνατη. Η τεχνική είναι ακόμα χρήσιμη για να καθορίσει σε σύντομο χρονικό διάστημα εάν οι ιοί που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια μιας έξαρσης σχετίζονται επιδημιολογικά. [Monroeh (2002), Ishii (2014)].

Εκτός από την ανίχνευση μεγάλης σημασίας είναι και η μέτρηση του ιικού τίτλου των εντεροϊών τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά δείγματα. Η απαιτούμενη αυτή ποσοτικοποίηση είναι πολύ δύσκολο να γίνει με τις παραπάνω μεθόδους και τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα αξιόπιστα. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε μία νέα μέθοδος ποσοτικοποίησης που συνδυάζει την RT-PCR και τη Real Time PCR ή qPCR. Πολυάριθμες παραλλαγές της qPCR και της RT-qPCR έχουν εφαρμοσθεί, όπως για παράδειγμα η εφαρμογή της τελευταίας με χρήση ενός εσωτερικού θετικού δείγματος ελέγχου για την αύξηση της ευαισθησίας κατά τη μέτρηση του ιικού τίτλου σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Ακόμα για την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός μεγάλου αριθμού ιών συμπεριλαμβανομένων και των εντεροϊών σε δείγματα νερού έχει εφαρμοσθεί ένα πρωτόκολλο μικρορροϊκής qPCR [Monroeh (2002), Ishii (2014)].

## **II. Απομόνωση των ιών**

Πολλές από τις διαδικασίες εργαστηριακής διάγνωσης για μολύνσεις από εντεροϊό που περιγράφηκαν πιο πάνω απαιτούν ική απομόνωση [Grandien (1989)]. Οι παραδοσιακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των εντεροϊών βασίζονται στις χρονοβόρες και επίπονες διαδικασίες της ικής απομόνωσης σε κυτταρική καλλιέργεια και της εξουδετέρωσης με αντιορό αναφοράς. Η απομόνωση των εντεροϊών από δείγματα με τη χρήση των κατάλληλων κυτταρικών σειρών είναι συνήθως δυνατή μέσα σε 2 ή 3 μέρες και παραμένει μια πολύ ευαίσθητη τεχνική για την ανίχνευση αυτών των ιών. Τα καλύτερα δείγματα για απομόνωση ιών, κατά σειρά καταλληλότητας, είναι: δείγματα κοπράνων ή επιχρίσματα από το ορθό, επιχρίσματα ή πλύσεις φάρυγγα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Τα επιχρίσματα και οι πλύσεις φάρυγγα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι πιθανά να δώσουν ικές απομονώσεις αν συλλεχθούν νωρίς στην οξεία φάση της ασθένειας. Σε περιπτώσεις οξείας αιμοραγικής επιπεφυκίτιδας, το καλύτερο δείγμα είναι το επίχρισμα του επιπεφυκότος [Yin-Murphy (1984)], ενώ σε μερικές περιπτώσεις ο ιός μπορεί να απομονωθεί από δάκρυα [Yin-Murphy (1985)]. Παρ'όλα αυτά ο χαρακτηρισμός του

EV70 από ασθενείς με οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα, μετά τη μεγάλη πανδημία του 1981, ήταν πολύ δύσκολος και οι μοριακές μέθοδοι απετέλεσαν τη μόνη ευαίσθητη διαδικασία για την ανίχνευση αυτού του ιού [Shulman (1997)].

Η διαδικασία για την ιική απομόνωση περιέχει τον εμβολιασμό του κατάλληλου δείγματος σε δεκτικά κύτταρα καλλιέργειας. Ωστόσο δεν υπάρχει μία κυτταρική σειρά στην οποία να είναι δυνατό να αναπτυχθούν όλοι οι ανθρώπινοι εντεροϊοί. Για το λόγο αυτό η χρήση αρκετών τύπων κυτταρικών σειρών πρωτεύοντων θηλαστικών και ανθρώπων για να αυξηθεί το φάσμα των ιών που μπορούν να ανιχνευθούν αποτελεί συνήθη πρακτική [Chonmaitree (1988)]. Παρά το ευρύ φάσμα κυττάρων, όμως, αρκετοί ορότυποι του CVA δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε καλλιέργεια.

Οι πρόσφατες δραστηριότητες για την εξάλειψη των πολιοϊών και ο μεγάλος κίνδυνος που αποτελούν για τη δημόσια υγεία οδήγησαν στην ανάπτυξη εξειδικευμένων διαγνωστικών διαδικασιών για την ανίχνευση αυτών των ιών. Οι πολιοϊοί μπορούν εύκολα να αναπτύσσονται σε ποικίλες κυτταρικές σειρές πρωτεύοντων και ανθρώπινες, αλλά δεν μπορούν να διαχωριστούν από άλλους εντεροϊούς μόνο με βάση τις κυτταρικές αλλοιώσεις που προκαλούν. Η χρήση του υποδοχέα CD155 από τους πολιοϊούς είναι μοναδική, γεγονός που τους διαχωρίζει από τους υπόλοιπους εντεροϊούς που χρησιμοποιούν ποικίλους υποδοχείς για να μολύνουν τα κύτταρα. Μία κυτταρική σειρά ποντικού η οποία υπό κανονικές συνθήκες δεν μπορεί να μολυνθεί από τους περισσότερους εντεροϊούς αλλά επιτρέπει την ιική αντιγραφή όταν το ιικό γονιδίωμα βρίσκεται στο κύτταρο, επιμολύνθηκε και εκφράζει τον υποδοχέα CD155. Ένα από τα επιμολυσμένα κύτταρα της σειράς, το L20B, είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη πολιοϊών και έχει αξιοποιηθεί για την απομόνωση πολιοϊών [Hovi (1994)]. Η απομόνωση του ιού από ένα δείγμα γίνεται μετά τον εμβολιασμό του στα κύτταρα αυτά και την εμφάνιση των χαρακτηριστικών κυτταρικών αλλοιώσεων των εντεροϊών. Ωστόσο επειδή ορισμένα στελέχη συγκεκριμένων οροτύπων μη πολιο-εντεροϊών είναι ικανά να αναπτυχθούν στα γονικά κύτταρα του ποντικού, η ανάπτυξη σε κύτταρα L20B δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την αναγνώριση των πολιοϊών και απαιτούνται επιπλέον διαγνωστικά τεστ [Melnick (b) (1973)].



Στα διαγνωστικά τεστ ρουτίνας η ανάπτυξη όλων των εντεροϊών στις κυτταρικές καλλιέργειες ανιχνεύεται από τις κυτταρικές αλλοιώσεις που αυτή προκαλεί και ο απομονωμένος ιός στη συνέχεια ταξινομείται μέσω εξουδετέρωσης με εξειδικευμένο αντιορό. Το αντιδραστήριο αντιορού που έχει την πιο ευρεία χρήση πλέον κατασκευάστηκε σε άλογα και μπορεί να αποκτηθεί μέσω την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ) [Melnick (a) (1973)]. Η ύπαρξη τουλάχιστον 66 διαφορετικών εντεροϊών καθιστά πρακτικά αδύνατη την προσπάθεια εξουδετέρωσης με χρήση όλων των πιθανών αντιορών αναφοράς ξεχωριστά. Έτσι η χρήση τους συνδυάζεται μέσω αλληλεπικαλυπτόμενων δεξαμενών με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε αντίσωμα να βρίσκεται μόνο σε έναν περιορισμένο αριθμό δεξαμενών. Για παράδειγμα στο σύστημα δεξαμενών Lim, Benyesh-Melnick (LBM) [Melnick (b) (1973)], τα αντισώματα για 42 διαφορετικούς εντεροϊούς χωρίζονται σε 8 δεξαμενές. Ακόμα, όμως, και με τη χρήση αυτών των διαδικασιών υπάρχουν εντεροϊοί που δεν μπορούν να ταξινομηθούν. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να οφείλονται σε μικτές μολύνσεις, σε μίγματα ιών, σε αντιγονική εκτροπή ή σε ικούς τύπους που δεν έχουν ανακαλυφθεί. Θεωρητικά όλα τα παραπάνω θα μπορούσαν να διασαφηνιστούν εργαστηριακά, ωστόσο η εργασία και ο χρόνος που απαιτεί η πρακτική εφαρμογή των απαραίτητων μεθόδων τις καθιστά πολύ χρονοβόρες.

### **III. Τεστ αντισωμάτων**

Η ορολογική διάγνωση μιας μόλυνσης από εντεροϊούς μπορεί να γίνει μέσω σύγκρισης των τίτλων κατά την οξεία και κατά την φάση της ανάρρωσης δειγμάτων ορού, τα οποία χρησιμοποιούνται ως ζεύγος. Στην περίπτωση που έχει γίνει απομόνωση και αναγνώριση του εντεροϊού, το ζεύγος των ορών συγκρίνεται με την απομόνωση από τον ασθενή. Η οροδιάγνωση των εντεροϊών, ωστόσο, έχει μεγαλύτερη σχέση με επιδημιολογικές μελέτες παρά με την κλινική διάγνωση [Bell (1986), Magnius (1988)].

Η πιο βασική ορολογική δοκιμασία είναι αυτή της εξουδετέρωσης σε κυτταρική καλλιέργεια. Οι τεχνικές της δοκιμασίας είναι σχεδόν όμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση ιών που έχουν απομονωθεί με εξαίρεση το γεγονός ότι ένας γνωστός ιός αναμειγνύεται με σειριακές αραιώσεις αντιορού από τον ασθενή. Μία αύξηση τεσσάρων ή περισσότερων τάξεων στον τίτλο των τυπο-ειδικών

αντισωμάτων εξουδετέρωσης θεωρείται επαρκής για τη διάγνωση μόλυνσης. Τα αντισώματα, ωστόσο, μπορεί να είναι παρόντα κατά τη συλλογή του αρχικού δείγματος περιπλέκοντας την ερμηνία των αποτελεσμάτων, και αυτό συμβαίνει λόγω της μεγάλης περιόδου επώασης και της πρόδρομης περιόδου πολλών ασθενειών που οφείλονται σε εντεροϊούς [Bell (1986), Magnius (1988)].

Υπάρχουν και άλλες λιγότερο διαδεδομένες ορολογικές μέθοδοι, κάθε μία με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της, όπως είναι η εξουδετέρωση μείωσης πλακών, το συμπληρωματικό δέσιμο, η παθητική αιμοσυσσωμάτωση, η αιμοσυσσωμάτωση αναστολής και ο ανοσοφθορισμός [Bell (1986), Magnius (1988)].

## **2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η δημιουργία, ενός κατάλληλου πρωτοκόλλου Real Time PCR, για τη μέτρηση του ιικού τίτλου σε δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών μολυσμένων με εντεροϊούς.

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1. Στελέχη εντεροϊών**

Στο πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το εμβολιακό στέλεχος Sabin 2 για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και των πρότυπων καμπυλών μέτρησης του ιικού τίτλου. Επιπλέον για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου που δημιουργήθηκε χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη: Echo19, Echo12, Coxsackie B6, Coxsackie A1.

#### **3.2. Μέτρηση της τιμής TCID<sub>50</sub> – Σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του ιού**

Η μέτρηση του ιικού τίτλου γίνεται με τον υπολογισμό της τιμής TCID<sub>50</sub>. Το μέγεθος αυτό αντιστοιχεί στην ποσότητα του ιού που είναι απαραίτητος για να προκαλέσει κυτταρικές αλλοιώσεις στο 50% των εμβολιασμένων κυττάρων μιας κυτταροκαλλιέργειας.

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης ήταν απαραίτητη η δημιουργία σειριακών αραιώσεων του ιού. Έτσι χρησιμοποιώντας δείγμα Sabin 2 το TCID<sub>50</sub> του οποίου είχε μετρηθεί στο εργαστήριο ως 10<sup>6</sup> δημιουργήθηκαν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις με προσθήκη, σε erpendorf των 2 ml, 100 μl ιού και 900 μl D-MEM.

#### **3.3. Εκχύλιση του RNA**

Πρώτο βήμα ήταν η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) που έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas και συνεργατών [Casas (1995)]. Συγκεκριμένα, μέσα σε erpendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiothreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (100 mg/ml) και τέλος 100μl δείγματος από τη φιάλη κυτταροκαλλιέργειας. Ακολούθησε vortex του

μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20 °C) και ακολούθησε ξανά vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε vortex για την διαλυτοποίηση του ιζήματος και ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH<sub>2</sub>O. Το RNA των δειγμάτων φυλάχθηκε στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

### **3.4. Αντίστροφη μεταγραφή (RT)**

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γενώματος που μας ενδιαφέρει (συγκεκριμένα 458bp).

Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 1μl random primers d(N7) (Metabion) (100pmol/μl), 1μl 40mM dNTPs και ddH<sub>2</sub>O (5μl/tube). Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65 °C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Techne TC-512. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 4μl 5X first strand Buffer , 2μl 0,1M DTT, 0,5μl RNase out 20units/μl, 0,5μl Superscript II (Invitrogen) (100units/μl) και 1μl ddH<sub>2</sub>O. Αφού προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και εν συνεχεία ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 12 λεπτά στους 25 °C, 50 λεπτά στους 42 °C και 15 λεπτά στους 70 °C.

### **3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Για την διαδικασία της PCR, με σκοπό την ενίσχυση ενός μικρού τμήματος της 5'-UTR που επιτρέπει τη μετέπειτα χρήση του σε πρωτόκολλο Real-Time PCR,

χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών UG52 flap/UC53 flap. Το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος ήταν 458 bp. Η ανίχνευση γίνεται σε αυτήν την γενωμική περιοχή, καθώς αποτελεί την πιο συντηρημένη περιοχή των εντεροϊών. Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Αυτά τα 47μl αποτελούνται από: 5μl διαλύματος dNTPs 10mM, 1 μl MgCl<sub>2</sub> 25mM, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (KAPA Taq Buffer 10x), 0,2 μl από τον κάθε εκκινητή 50pmol/μl, 0,5 Units ενζύμου KAPA Taq Polymerase και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA. Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Techne TC-512) στις εξής συνθήκες:

1 κύκλο	2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA -30 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA.
40 κύκλους	-30 δευτερόλεπτα στους 60 °C, για τον υβριδισμό των εκκινητών -30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλο	2 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

Εκκινητής	Γενωμική Περιοχή	Θέση	Αλληλουχία (5'-3')
UG-52-FLAP	5'-UTR	168-188	ΑΑΤΑΑΑΤCΑΤΑΑCΑΑGCACTTCTGTTTCCCGG
UC-53-FLAP	5'-UTR	588-606	ΑΑΤΑΑΑΤCΑΤΑΑΤTGTCAACCAACCAGCCA

### **3.6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR**

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης σε συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 1,2 gr αγαρόζης (Invitrogen Ultra-Pure Gel Agarose) και 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) αναμίχθηκαν, σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr2) τέτοια 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. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 10 µl από κάθε PCR προϊόν αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 30 min. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

### **3.7. Κλωνοποίηση**

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης ήταν απαραίτητο τα προϊόντα της PCR να αραιωθούν σειριακά και να γίνει χρήση τους επανειλημμένα στο πρωτόκολλο της Real-Time PCR. Για το λόγο αυτό τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς, με σκοπό να ενισχυθεί η σταθερότητά τους.

#### **3.7.1. Δημιουργία Ανασυνδυασμένων πλασμιδίων**

Η αντίδραση σύνδεσης έγινε με το Strata Clone Cloning Kit. Αρχικά προετοιμάζεται μείγμα το οποίο περιέχει 3 µl Strata Clone Cloning Buffer και 1µl Strata Clone Vector Mix. Το μείγμα προστίθεται σε μικροσωληνάρια των 200 µl μαζί

με 2 μl από το PCR προϊόν και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Τέλος η αντίδραση τοποθετείται στον πάγο.

### 3.7.2. Μετασχηματισμός των βακτηρίων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Ο μετασχηματισμός έγινε σε κύτταρα JM109. Αρχικά μεταφέρθηκαν 200 μl από τα δεκτικά κύτταρα σε αποστειρωμένα erpendorf των 2 ml, προστέθηκαν τα 6 μl από την αντίδραση ανασυνδυασμού των πλασμιδίων και ακολούθησε προσεκτική ανάμειξη. Το μείγμα επώασθηκε για 30 λεπτά στον πάγο και ακολούθως μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο 42 °C για 90 δευτερόλεπτα. Έπειτα μεταφέρθηκε αμέσως στον πάγο για 2 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl από τα ανασυνδυασμένα, πλέον, κύτταρα σε erpendorf των 2 ml με 800 μl LB-Broth και το μείγμα επώασθηκε στους 37 °C με γρήγορη ανάδευση (180 στροφές/λεπτό) για 1 ώρα. Έπειτα για μεγαλύτερη απόδοση όλη η ποσότητα (1 ml) φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για ένα λεπτό, αφαιρέθηκαν 800 μl από το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύθηκε στα 200 μl που έμειναν στο erpendorf. Τέλος τα 200 μl της καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε τρυβλία Petri με LB-agar με αμπικιλίνη 1 μl/ml LB-Broth για την επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων και προστέθηκαν 12 μl X-Gal (50mg/ml) για την επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Το μείγμα απλώθηκε στην επιφάνεια του τρυβλίου με τη χρήση αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου και τα τρυβλία επώασθηκαν στους 37 °C overnight.

### 3.7.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Από τις καλλιέργειες που δημιουργήθηκαν συλλέχθηκαν οι λευκές αποικίες και κάθε μία από αυτές μεταφέρθηκε σε falcon των 10 ml με 2 ml LB-Broth με αμπικιλίνη 1μl/ml LB-Broth. Οι υγρές καλλιέργειες επώασθηκαν στους 37 °C με γρήγορη ανάδευση (210 στροφές/λεπτό) overnight. Στη συνέχεια έγινε εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel).

## 3.8. Real Time PCR

Η κατασκευή τόσο της καμπύλης αναφοράς όσο και των πρότυπων καμπυλών υπολογισμού του ιικού φορτίου έγιναν με τη χρήση Real-Time PCR. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν οι UG52 flap/ UC53 flap εκινητές και το κομμάτι που ενισχύθηκε βρίσκεται στην 5'-UTR περιοχή και έχει μήκος 458 bp. Η αντίδραση



έγινε σε μικροσωληνάρια κατάλληλα για Real-Time PCR των 200 μl. Αρχικά κατασκευάζεται μείγμα από το οποίο προστίθενται 17 μl σε κάθε μικροσωληνάριο. Αυτά τα 17 μl αποτελούνται από: 0,1 μl από κάθε εκκινητή, 10 μl KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X), 0,4 μl ROX Low και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 17 μl. Στη συνέχεια στο μικροσωληνάριο προστίθενται 3 μl πλασμιδιακού DNA για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και cDNA για την πρότυπη καμπύλη μέτρησης του ιικού τίτλου. Στη συνέχεια τα σωληνάρια τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

1 κύκλο	1 λεπτό στους 95 °C για αποδιάταξη του DNA (πλασμιδιακό ή cDNA)
40 κύκλους	3 δευτερόλεπτα στους 95 °C για αποδιάταξη του DNA 20 δευτερόλεπτα στους 60 °C για τον υβριδισμό των εκκινητών 10 δευτερόλεπτα στους 60 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλο	Μετάβαση από 55 °C στους 95 °C και πάλι στους 55 °C για την ανάλυση της ειδικότητας των προϊόντων

### 3.9. Μόλυνση Κυττάρων Rd

Η δημιουργία των πρότυπων καμπύλων για τον προσδιορισμό του ιικού φορτίου αλλά και η εφαρμογή του πρωτοκόλλου της Real Time PCR για να εξετασθεί αν οι καμπύλες που δημιουργήθηκαν μπορούν να έχουν πρακτική εφαρμογή απαιτούν τη μόλυνση κυτταρικής σειράς, τη συλλογή και την εξέταση με Real Time PCR μολυσμένων δειγμάτων που λαμβάνουν τη θέση που θα είχαν τα κλινικά δείγματα σε μία πρακτική εφαρμογή.

Η μόλυνση των κυττάρων έγινε σε 96-well plate. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετήθηκαν 100 μl κυττάρων της σειράς Rd (D-MEM 2% FBS) και 100 μl του στελέχους S2 με TCID<sub>50</sub> 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10 και 1. Οι μικροπλάκες επώασθηκαν

στους 37 °C και έγινε απομόνωση του RNA στο υπερκείμενο για κάθε ένα από τα δείγματα στις 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 και 48 ώρες.

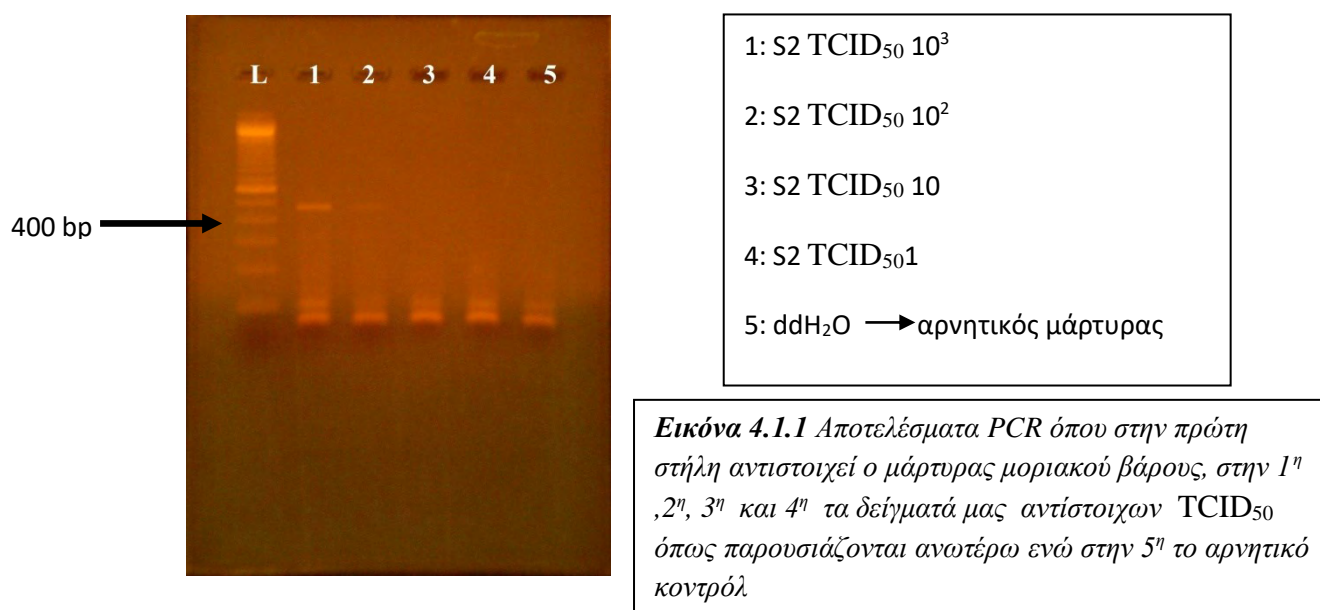
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Αποτελέσματα PCR

Αρχικά για την ανίχνευση του ενός ιικού αντιγράφου πραγματοποιήθηκε PCR με το ζεύγος εκκινητών UG52 flap/UC53 flap σε πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 2 ελαττούμενων TCID<sub>50</sub>. Το μέγεθος του προϊόντος ήταν 458bp. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό για να διαπιστωθεί η ύπαρξη τυχόν επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία και διεξαγωγή της PCR.

Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα:

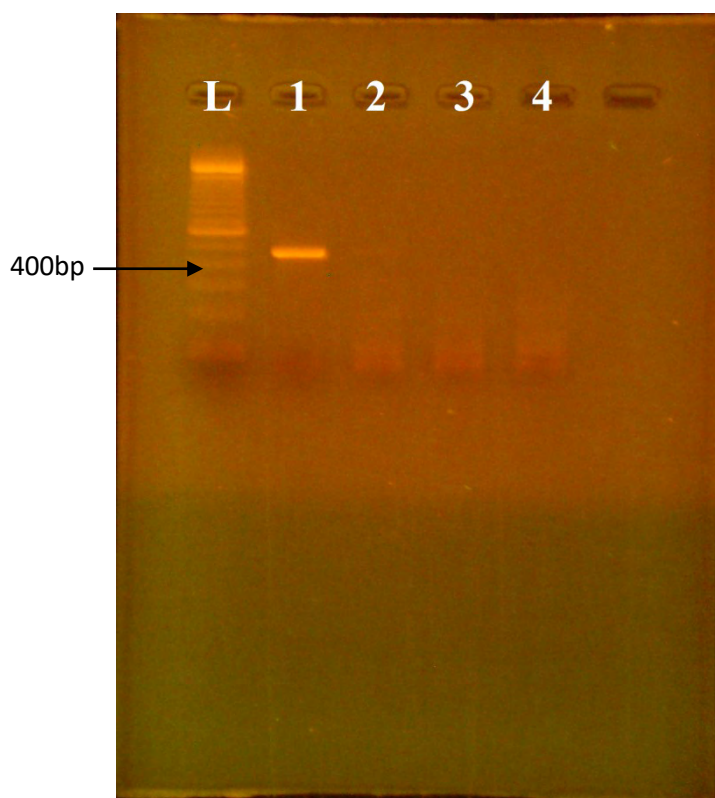
Εκκινητές	Γενωμική Περιοχή	Μέγεθος Προϊόντος	Συγκέντρωση MgCl <sub>2</sub>
UG52 Flap /UC53 Flap	5'-UTR	458bp	2 mM



Στην συνέχεια τα στελέχη S2 TCID<sub>50</sub> 10<sup>3</sup> και S2 10<sup>2</sup> κλωνοποιήθηκαν, ανακτήθηκαν τα πλασμίδια και έγιναν διαδοχικές αραιώσεις των πλασμιδίων έως συγκέντρωσης 10<sup>-9</sup>. Ακολούθησε PCR για τον προσδιορισμό του ενός ιικού αντιγράφου και επιλογή του εύρους των πλασμιδιακών δειγμάτων που θα χρησιμοποιούνταν στην Real Time PCR για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς. Η PCR πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών UG52 flap/UC53 flap σε πλασμίδια ελαττούμενης συγκέντρωσης 10<sup>-5</sup> 10<sup>-7</sup> έως 10<sup>-9</sup>. Το μέγεθος του προϊόντος ήταν 458bp. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό για να διαπιστωθεί η ύπαρξη τυχόν επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία και διεξαγωγή της PCR.

Στην εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα:

Εκκινητές	Γενωμική Περιοχή	Μέγεθος Προϊόντος	Συγκέντρωση MgCl <sub>2</sub>
UG52 Flap /UC53 Flap	5'-UTR	458bp	2 mM



1: S2 συγκέντρωσης 10<sup>-5</sup>  
 2: S2 συγκέντρωσης 10<sup>-7</sup>  
 3: S2 συγκέντρωσης 10<sup>-9</sup>  
 4: ddH<sub>2</sub>O → αρνητικός μάρτυρας

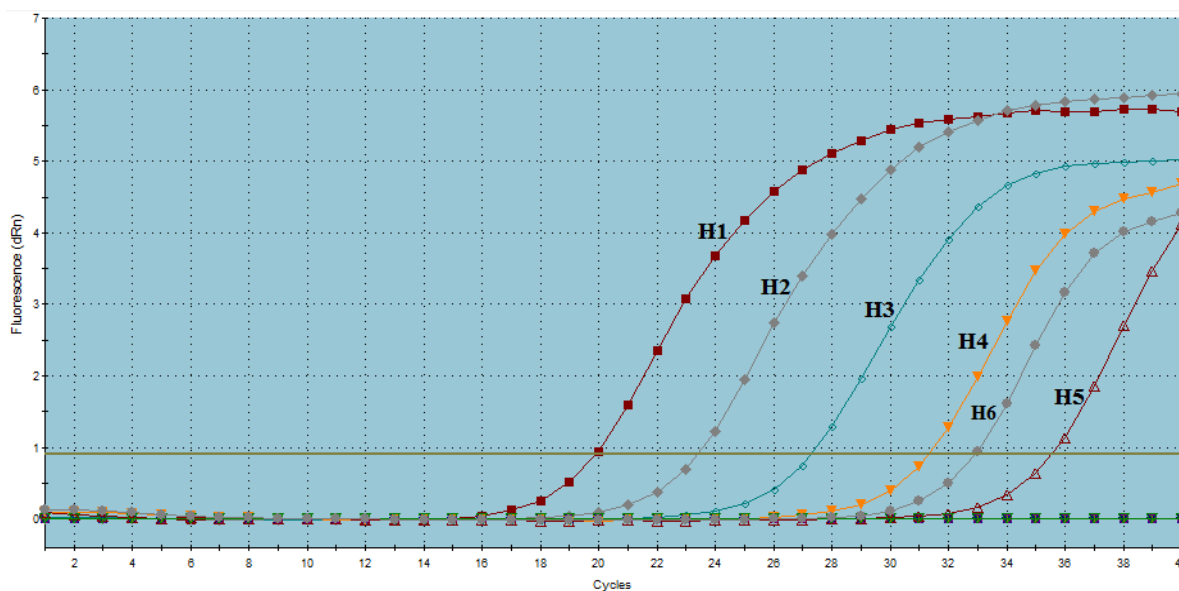
**Εικόνα 4.1.2.** Αποτελέσματα PCR όπου στην πρώτη στήλη αντιστοιχεί ο μάρτυρας μοριακού βάρους, στην 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> τα πλασμίδια αντίστοιχης συγκέντρωσης ενώ στην 4<sup>η</sup> το αρνητικό κοντρόλ

## 4.2. Αποτελέσματα Real Time PCR

### 4.2.1. Δημιουργία καμπύλης αναφοράς

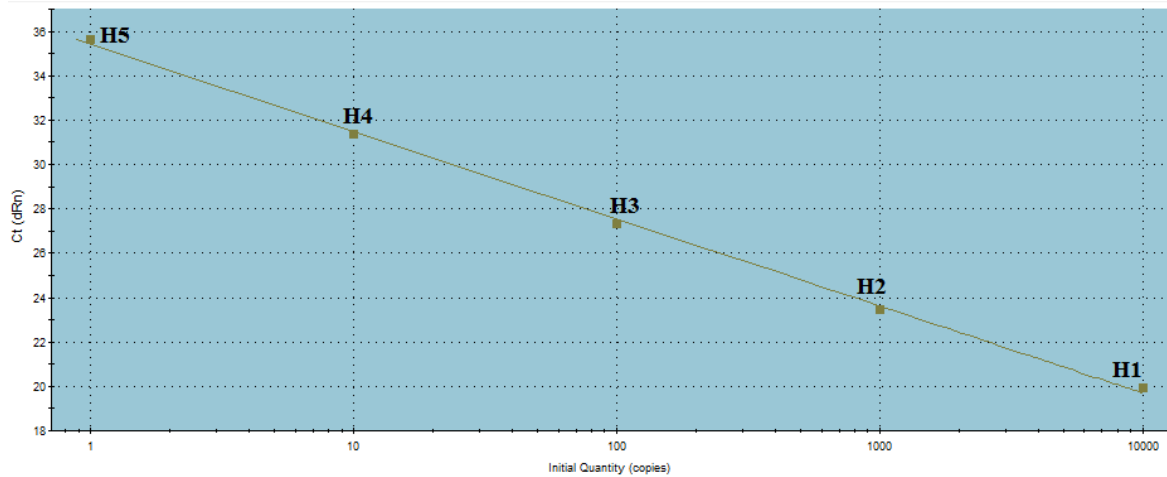
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκαν οι πλασμιδιακές αραιώσεις συγκέντρωσης  $10^{-6}$ -  $10^{-10}$  για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς του πρωτοκόλλου της Real Time PCR. Η Real Time PCR πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών UG52 flap/UC53 flap. Το μέγεθος του προϊόντος ήταν 458bp. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό για να διαπιστωθεί η ύπαρξη τυχόν επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία και διεξαγωγή της PCR.

Στην εικόνα 4.2.1.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα:

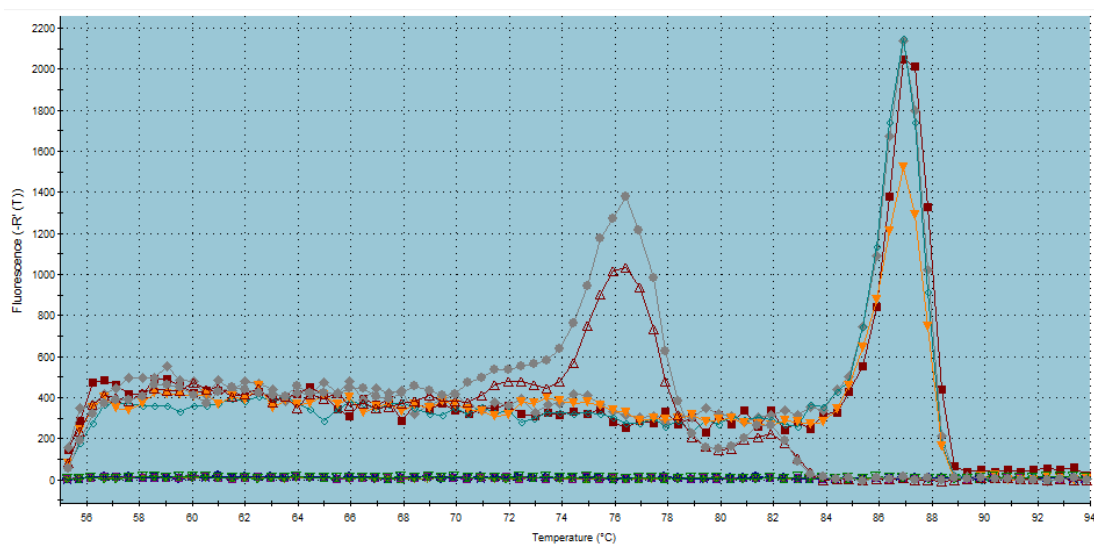


H1	H2	H3	H4	H5	H6
S2 πλασμίδιο συγκέντρωσης $10^{-6}$	S2 πλασμίδιο συγκέντρωσης $10^{-7}$	S2 πλασμίδιο συγκέντρωσης $10^{-8}$	S2 πλασμίδιο συγκέντρωσης $10^{-9}$	S2 πλασμίδιο συγκέντρωσης $10^{-10}$	ddH <sub>2</sub> O → αρνητικός μάρτυρας

Η καμπύλη αναφοράς που προκύπτει φαίνεται στην εικόνα 4.2.1.2:

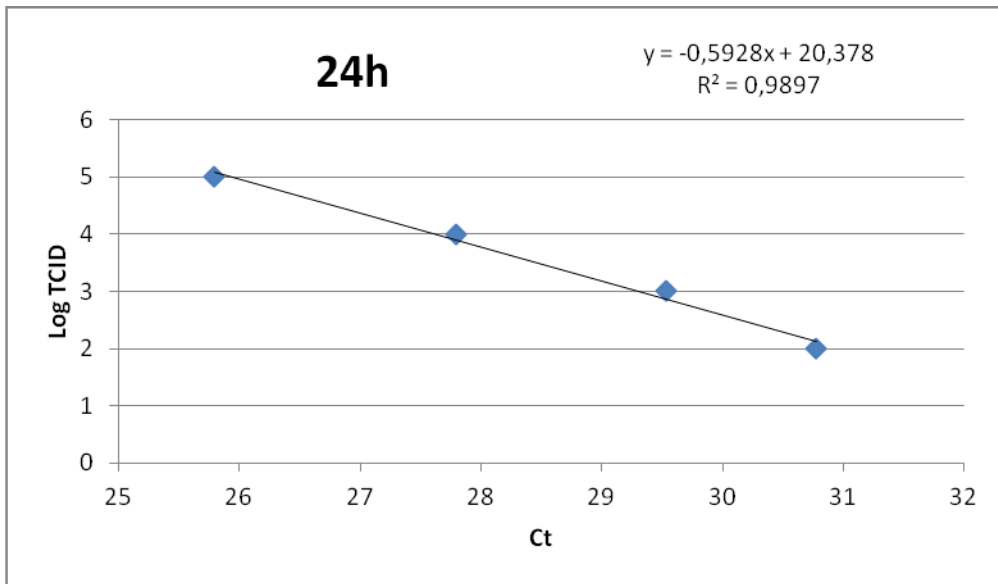


Και η εικόνα 4.2.1.3 από το Dissociation curve φαίνεται παρακάτω. Όλα τα δείγματα έχουν δώσει ειδικό προϊόν και δεν υπάρχει επιμόλυνση στο νερό.

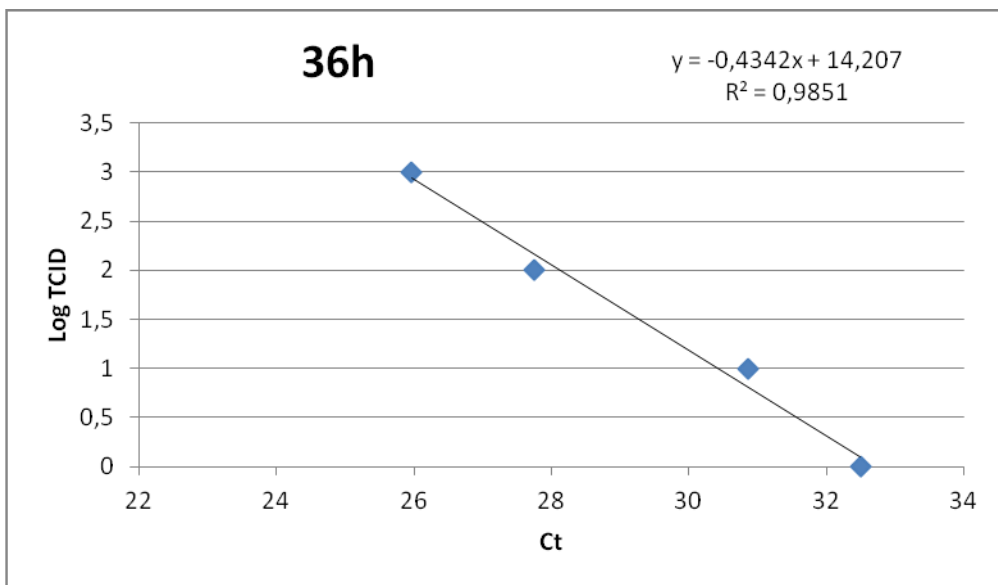


#### 4.2.2. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης για τη μέτρηση του ιικού τίτλου

Με τα δείγματα που συλλέχθηκαν μετά από τη μόλυνση της κυτταρικής σειράς Rd, και αφού υποβλήθηκαν σε RT-PCR, πραγματοποιήθηκε μία σειρά Real Time PCR τα αποτελέσματα των οποίων συγκεντρώθηκαν και μετά από την κατάλληλη στατιστική επεξεργασία δημιουργήθηκαν οι παρακάτω πρότυπες καμπύλες:

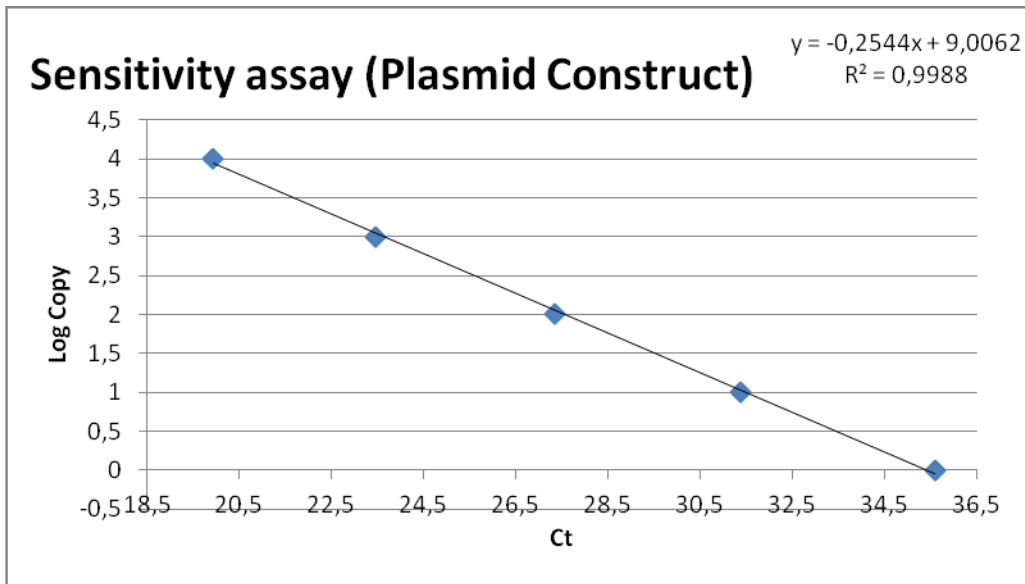


**Εικόνα 4.2.2.1.** Πρότυπη καμπύλη για τη μέτρηση ιικού τίτλου σε 24 ώρες από τον εμβολιασμό του δείγματος. Στον άξονα των x βρίσκεται η τιμή του κύκλου (Ct) και στον άξονα των y βρίσκεται ο λογάριθμος του TCID<sub>50</sub> (Log TCID<sub>50</sub>). Η καμπύλη επιτρέπει τη μέτρηση του ιικού φορτίου με ένα εύρος από TCID<sub>50</sub> 10<sup>5</sup> έως 10<sup>2</sup>.

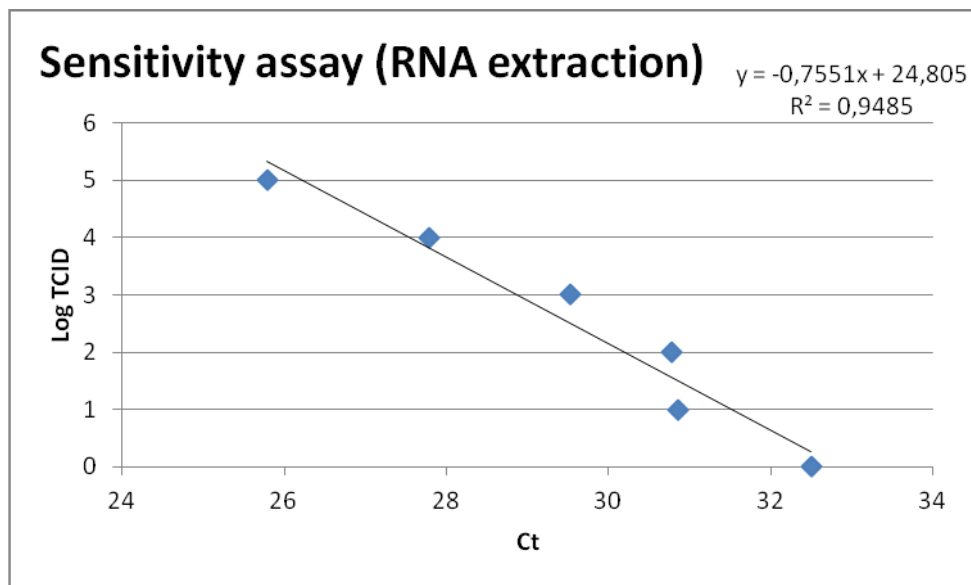


**Εικόνα 4.2.2.2.** Πρότυπη καμπύλη για τη μέτρηση ιικού τίτλου σε 36 ώρες από τον εμβολιασμό του δείγματος. Στον άξονα των x βρίσκεται η τιμή του κύκλου (Ct) και στον άξονα των y βρίσκεται ο λογάριθμος του TCID<sub>50</sub> (Log TCID<sub>50</sub>). Η καμπύλη επιτρέπει τη μέτρηση του ιικού φορτίου με ένα εύρος από TCID<sub>50</sub> 10<sup>3</sup> έως 1 TCID<sub>50</sub>.

Ακόμα σχεδιάστηκαν καμπύλες για την ευαθησία της μεθόδου όταν αυτή εφαρμόζεται σε πλασμίδια και όταν εφαρμόζεται σε cDNA:



**Εικόνα 4.2.2.3.** Καμπύλη υπολογισμού ευαισθησίας του πρωτοκόλλου όταν αυτό εφαρμόζεται σε πλασμιδιακό DNA. Στον άξονα των x βρίσκεται η τιμή του κύκλου (Ct) και στον άξονα των y βρίσκεται ο λογάριθμος της συγκέντρωσης του πλασμιδίου (Log αντιγράφων). Η καμπύλη παρουσιάζει μεγάλη γραμμικότητα που αντιστοιχεί στην καλή ευαισθησία της μεθόδου, επιτρέποντας τον προσδιορισμό ενός αντιγράφου περί τον κύκλο (Ct) 35.



**Εικόνα 4.2.2.4** Καμπύλη υπολογισμού ευαισθησίας πρωτοκόλλου όταν αυτό εφαρμόζεται σε cDNA του ιικού RNA από δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών. Στον άξονα των x βρίσκεται η τιμή του κύκλου (Ct) και στον άξονα των y βρίσκεται ο λογάριθμος του TCID<sub>50</sub> (Log TCID<sub>50</sub>). Η καμπύλη παρουσιάζει μικρότερη γραμμικότητα από αυτή της εφαρμογής σε πλασμιδιακό DNA ωστόσο η ευαισθησία της μεθόδου παραμένει υψηλή επιτρέποντας τον προσδιορισμό ενός αντιγράφου περί τον κύκλο (Ct) 33.

#### **4.2.3. Αποτελέσματα εφαρμογής του πρωτοκόλλου της Real Time PCR σε άγνωστα δείγματα**

Για να ελέγξουμε την αποτελεσματικότητα του πρωτοκόλλου το οποίο αναπτύξαμε, το εφαρμόσαμε σε δείγματα άλλων στελεχών με γνωστό TCID<sub>50</sub> καθώς και σε ένα άγνωστο δείγμα το TCID<sub>50</sub> του οποίου μετρήθηκε παράλληλα σε κυτταροκαλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε τα ακόλουθα στελέχη:

Στέλεχος	TCID <sub>50</sub>	Ωρα συλλογής μετά τη μόλυνση
E12	10 <sup>4</sup>	24h
E12	10 <sup>2</sup>	36h
E19	10 <sup>3</sup>	24h
E19	10	36h
CBV6	10 <sup>3</sup>	24h
CBV6	1	36h
CAV1	άγνωστο	24h
CAV1	άγνωστο	36h

Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα της Real Time PCR και ο υπολογισμός του TCID<sub>50</sub> από την εφαρμογή των εξισώσεων που αντιστοιχούν στις πρότυπες καμπύλες:

Στέλεχος	Ct	Υπολογισμός logTCID <sub>50</sub>
E12 24h	24	5,6
E12 36h	23,76	3,5
E19 24h	26,7	3,9
E19 36h	27,57	1,8
CBV6 24h	29,62	2,81
CBV6 36h	31,88	0,36
CAV1 24h	25,53	4,6
CAV1 36h	25,60	2,7

Το TCID<sub>50</sub> του δείγματος CAV1 που απομονώθηκε στις 24h μετρήθηκε 10<sup>4</sup> και του δείγματος CAV1 που απομονώθηκε στις 36h μετρήθηκε 10<sup>2</sup>.

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής έχουν αποκλίσεις από 0,3-1,5 από τις τιμές TCID<sub>50</sub> που μετρήθηκαν στο εργαστήριο.



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι εντεροϊοί υπολογίζεται ότι είναι υπεύθυνοι για το 80-92% των περιπτώσεων ιικής μηνιγγίτιδας. Τα κλινικά συμπτώματα της ασθένειας πολλές φορές δεν μπορούν να διακριθούν από εκείνα άλλων ιικών μολύνσεων στην ίδια περιοχή. Η διάκριση μεταξύ άσηπτης μηνιγγίτιδας που οφείλεται σε εντεροϊούς και άλλου τύπου μηνιγγίτιδας όπως βακτηριακή ή μόλυνση από τον ιό του απλού έρπητα, απαιτεί εργαστηριακή διάγνωση. Συγκεκριμένα για την καλύτερη διαχείριση των ασθενών θα πρέπει να εφαρμόζεται μία γρήγορη και εξειδικευμένη μέθοδος διάγνωσης ή αποκλεισμού της μόλυνσης από εντεροϊό.

Η μέθοδος που εφαρμόζεται αυτή τη στιγμή για τη διάγνωση σε δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού είναι η απομόνωση του ιού από κυτταροκαλλιέργεια σε αρκετές κυτταρικές σειρές. Η μέθοδος αυτή είναι εξαιρετικά χρονοβόρος καθώς χρειάζονται κατά μέσω όρο 5 μέρες για να είναι ανιχνεύσιμες οι κυτταρικές αλλοιώσεις που προκαλεί ο ιός, διάστημα που πολλές φορές είναι υπερβολικά μεγάλο για να παρέχει χρήσιμες κλινικές πληροφορίες. Ακόμα, με αυτή την προσέγγιση εντεροϊοί ανιχνεύονται μόνο στο 65-75% των περιπτώσεων μηνιγγίτιδας που οφείλεται σε αυτούς. Η χαμηλή απόδοση μπορεί να είναι αποτέλεσμα του χαμηλού τίτλου του ιού στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό καθώς και της εγγενούς χαμηλής ευαισθησίας της κυτταρικής σειράς. Σε σύγκριση που έγινε μεταξύ της συμβατικής μεθόδου και της απλής PCR πέρα από το σύντομο χρόνο στον οποίο έδωσε αποτελέσματα η τελευταία, επιπλέον ανίχνευσε τον ιό στο 89% των δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά και με καλλιέργειες αλλά και στο 31% των αρνητικών αποτελεσμάτων της συμβατικής μεθόδου. [Gunev (2003)].

Επιπλέον οι τρέχουσες πρακτικές υπαγορεύουν πως τα βρέφη με πυρετό και πλειοκυττάρωση εισάγονται συνήθως στο νοσοκομείο και τους παρέχεται αγωγή με αντιβιοτικά μέχρι να αποκλισθεί η βακτηριακή λοίμωξη. Η διαδικασία αυτή διαρκεί, τις περισσότερες φορές, 72 ώρες μετά τον εμβολιασμό της καλλιέργειας με το δείγμα του βρέφους. Η χρήση της PCR για την ανίχνευση εντεροϊών σε δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού βρεφών με πλειοκυττάρωση, κυρίως κατά τις περιόδους έξαρσης των εντεροϊών, έχει δείχθει ότι θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά τα έξοδα των νοσοκομείων. Άλλα πιθανά οφέλη μίας γρήγορης μοριακής διάγνωσης περιλαμβάνουν τη μείωση διαγνωστικών τεστ που δεν είναι απαραίτητα όπως η υπολογιστική τομογραφία και το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα και την πρόληψη άλλων

εμπειρικών θεραπειών όπως το acyclovir. Επιπλέον η μοριακή ιική διάγνωση θα οδηγήσει σε μείωση της χρήσης των αντιβιοτικών, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση λιγότερων ανθεκτικών βακτηρίων [Marshall (1997)].

Η χρήση της Real Time PCR παρουσιάζει στη διαδικασία της διάγνωσης και της ποσοτικοποίησης ορισμένα επιπλέον πλεονεκτήματα σε σχέση με την απλή PCR. Αρχικά κατά τη Real Time PCR δεν είναι απαραίτητες οι προφυλάξεις που λαμβάνονται ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση των ενισχυμένων προϊόντων καθώς όλη η αντίδραση γίνεται σε σφραγισμένα μικροσωληνάρια. Το γεγονός αυτό αποτελεί σημαντική βελτίωση σε σχέση με τις απλές PCR που συχνά συνδέονται με μεταφορά επιμολύνσεων και απαιτούν περισσότερο χρόνο.

Ακόμα το γονιδίωμα των εντεροϊών μπορεί να ποσοτικοποιηθεί εύκολα μέσω της Real Time PCR με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης. Αυτό το πλεονέκτημα καθιστά τη μέθοδο ιδανική για την ανίχνευση και την παρακολούθηση της προόδου και εκκρίωσης των μολύνσεων από εντεροϊούς [Μοπροεθο (2002)].

Πέρα από την εφαρμογή της μεθόδου για διαγνωστικούς σκοπούς η Real Time PCR έχει εφαρμογές και στην αντιμετώπιση περιβαλλοντικών προβλημάτων. Οι εντεροϊοί αποτελούν έναν από τους κυριότερους μη βακτηριακούς παράγοντες γαστρεντερίτιδας. Έχει υπολογισθεί από το Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Ασθενειών ότι η εμφάνιση ασθενειών που προκαλούνται από ύδατα σχετίζεται πιο συχνά με ικές παρά με βακτηριακές λοιμώξεις. Επιπλέον, με τη βοήθεια της μοριακής επιδημιολογίας έχει βρεθεί ότι η μετάλλαξη των εντεροϊών συμβαίνει τόσο γρήγορα που είναι αναπόφευκτες καινούριες επιδημίες στο μέλλον. Εντεροϊοί έχουν ανιχνευθεί σε διάφορους τύπους περιβαλλοντικών υδάτων όπως ύδατα υπονόμων, θαλάσσια ύδατα και κυρίως σε ποτάμια. Για το λόγο αυτό είναι πολύ σημαντικό να αναπτυχθεί μία μέθοδος ανίχνευσης ευαίσθητη και γρήγορη ώστε να ελέγχονται τα περιβαλλοντικά ύδατα και να αποτρέπεται η εξάπλωση εντεροϊών. Μία τέτοια μέθοδος αναπτύχθηκε με το συνδυασμό των συμβατικών τεχνικών κυτταροκαλλιέργειας και της qPCR, όπου μέσα από κυτταροκαλλιέργειες αυξάνεται το ικό φορτίο πριν την ενίσχυση ώστε να γίνει στόχευση ειδικών ικών γονιδιωμάτων ανεξάρτητα από την παρατήρηση της κυτταροπαθογένειας. Η μέθοδος αυτή είναι ένα ευαίσθητο, γρήγορο και ακριβές εργαλείο για την ανίχνευση μολυσματικών εντεροϊών και τον έλεγχο των υδάτων και σε σύγκριση με τις προηγούμενες

μετρήσεις γίνεται φανερό πως τα αποτελέσματά της προσεγγίζουν περισσότερο την πραγματική συγκέντρωση του ιού[Ming (2011)].

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, στην παρούσα εργασία έγινε μία προσπάθεια για τη δημιουργία μίας γρήγορης και ευαίσθητης μεθόδου που με τη βοήθεια της Real Time PCR να μπορεί να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί το ιικό φορτίο από δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών.

Το πρώτο βήμα για το σχεδιασμό μιας πρότυπης καμπύλης για τη μέτρηση του ιικού τίτλου σε κυτταροκαλλιιεργίες ήταν η δημιουργία μίας καμπύλης αναφοράς που θα αρχίζει από το ένα ιικό αντίγραφο. Για το λόγο αυτό στην παρούσα εργασία ενισχύθηκαν με PCR δείγματα από το εμβολιακό στέλεχος Sabin 2 με ελαττούμενο TCID<sub>50</sub>. Το δείγμα με το μικρότερο TCID<sub>50</sub> που έδωσε αποτέλεσμα κλωνοποιήθηκε και στη συνέχεια αραιώθηκε εκ νέου ώστε να γίνει όσο το δυνατόν καλύτερη προσέγγιση του ενός ιικού αντιγράφου με το 1 TCID<sub>50</sub>. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε Real Time PCR στο ένα αντίγραφο και σε πολλαπλάσιά του και σχεδιάστηκε η καμπύλη αναφοράς. Με βάση αυτή την καμπύλη αναφοράς έγιναν οι υπόλοιπες μετρήσεις για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης.

Τέλος μολύνθηκαν κύτταρα της σειράς Rd με εμβολιακά στελέχη Sabin 2 για τα οποία το TCID<sub>50</sub> είχε υπολογισθεί στο εργαστήριο και είχε τιμές από 10<sup>5</sup> έως 1 TCID<sub>50</sub>. Στη συνέχεια έγινε συλλογή των δειγμάτων από κάθε TCID ανά 6 ώρες και για 48 ώρες και τα δείγματα ενισχύθηκαν με Real Time PCR.

Ως αποτέλεσμα της πειραματικής διαδικασίας δημιουργήθηκαν δύο πρότυπες καμπύλες υπολογισμού του ιικού τίτλου. Όταν ο ιικός τίτλος είναι υψηλός μπορούν να εξαχθούν αποτελέσματα σε 24 ώρες από τον εμβολιασμό του δείγματος σε κυτταροκαλλιιεργία (η καμπύλη επιτρέπει τη μέτρηση του ιικού φορτίου με ένα εύρος από TCID<sub>50</sub> 10<sup>5</sup> έως 10<sup>2</sup>) και όταν ο τίτλος είναι χαμηλός σε 36 ώρες (η καμπύλη επιτρέπει τη μέτρηση του ιικού φορτίου με ένα εύρος από TCID<sub>50</sub> 10<sup>3</sup> έως 1). Η εφαρμογή της μεθόδου σε άγνωστα κλινικά δείγματα επιβεβαίωσε την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των εντεροϊών αυτών σε χρονικό διάστημα 24-36 ωρών.

Ο χρόνος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των ιικών αντιγράφων της μεθόδου έχει μεγάλη σημασία καθώς όπως έχει αναφερθεί οι συμβατικές μέθοδοι κυτταροκαλλιιεργειας χρειάζονται αρκετές μέρες για να δώσουν αποτελέσματα.

Στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου στο πλασμιδιακό DNA η γραμμικότητα της καμπύλης ήταν πολύ καλή ( $R^2=0,9988$ ) ενώ στην εφαρμογή του στο cDNA, που δημιουργήθηκε από την RT-PCR στην οποία υποβλήθηκαν τα δείγματα των κυτταροκαλλιιεργειών, ήταν μειωμένη ( $R^2=0,9485$ ). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι τα προϊόντα της RT-PCR δεν είναι τόσο σταθερά όσο η πλασμιδιακή κατασκευή και έτσι είναι πιθανές οι απώλειες ικών αντιγράφων λόγω αποικοδόμησης.

Τέλος θεωρήθηκε απαραίτητη μία εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε άλλους εντεροϊούς με γνωστά TCID<sub>50</sub> αλλά και σε ένα άγνωστο δείγμα για να ελεγχθεί το πόσο αποτελεσματική ήταν η μέθοδος η οποία αναπτύχθηκε. Τα αποτελέσματα είχαν αποκλίσεις από τις τιμές των TCID που μετρήθηκαν στο εργαστήριο και πιο συγκεκριμένα παρατηρούνται μεγαλύτερες αποκλίσεις στα δείγματα Echo από ότι στα Coxsackie A και B. Οι αποκλίσεις αυτές μπορεί να οφείλονται τόσο στο επίπεδο ευαισθησίας της μεθόδου όσο και στην τυπική απόκλιση κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Ακόμα όπως αναφέρθηκε παραπάνω η μέτρηση του TCID<sub>50</sub> είναι μία διαδικασία που βασίζεται στην παρατήρηση στο ανάστροφο μικροσκόπιο και στην εκτίμηση του βαθμού των κυτταρικών αλλοιώσεων που προκαλεί ο εντεροϊός. Ο καθορισμός του συγκεκριμένου μεγέθους, επομένως, εξαρτάται σε μεγάλο ποσοστό από τον παρατηρητή και μπορεί να παρουσιάζει μεγάλες αποκλίσεις.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 **Adams, M.J., King, A.M.Q. and Carstens, E.B.** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology* **2013**;158: 2023–2030.
- 2 **Ahmed A, Brito F, Goto C, et al.** Clinical utility of the polymerase chain reaction for diagnosis of enteroviral meningitis in infancy. *The Journal of Pediatrics* **1997 Sep**131(3):393-7.
- 3 **Ambros V, Baltimore D.** Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'- terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem* **1980**; 255:6739–6744.
- 4 **Ambros V, Pettersson RF, Baltimore D.** An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell* **1978**;15:1439–1446.
- 5 **Andreoletti L., Hober D., Belaich S., Lobert P.E., Dewilde A., Wattre P.** Rapid detection of enterovirus in clinical specimens using PCR and microwell capture hybridization assay. *J Virol Methods.* **1996 Oct**;62(1):1-10.
- 6 **Anonymous.** Deaths among children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease --Taiwan, Republic of China, April-July 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **1998 Sep 4**;47(34):718.
- 7 **Bell EJ, McCartney RA, Basquill D, et al.** Mu-antibody capture ELISA for the rapid diagnosis of enterovirus infections in patients with aseptic meningitis. *Journal of Medical Virology* **1986 Jul**;19(3):213-7.
- 8 **Bienz K, Egger D, Pasamontes L.** Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* **1987**;160:220–226.
- 9 **Brown DM, Cornell CT, Tran GP, et al.** An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol* **2005**;79:11962–11973.
- 10 **Casas I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator** New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* **1995**;53:25-36.

- 11 **Caspar DL, Klug A.** Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1962**;27:1–22.
- 12 **Chen ZG, Stauffacher C, Li Y, et al.** Protein-RNA interactions in an icosahedral virus at 3.0 Å resolution. *Science* **1989**;245:154–159
- 13 **Cho MW, Teterina N, Egger D, et al.** Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* **1994**;202:129–145.
- 14 **Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL.** Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol.* **1988 Dec**;26(12):2576–80
- 15 **Chow M, Newman JF, Filman D, et al.** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* **1987**;327:482–486.
- 16 **Colston E, Racaniello VR.** Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J* **1994**;13:5855–5862.
- 17 **Colston EM, Racaniello VR.** Poliovirus variants selected on mutant receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition. *J Virol* **1995**;69:4823–4829.
- 18 **Dales S, Eggers HJ, Tamm I, et al.** Electron Microscopic Study of the Formation of Poliovirus. *Virology* **1965**;26:379–389.
- 19 **De L, Yang CF, Da Silva E, et al.** Genotype-specific RNA probes for direct identification of wild polioviruses by blot hybridization. *J Clin Microbiol.* **1997 Nov**;35(11):2834–40.
- 20 **Echeverri AC, Dasgupta A.** Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* **1995**;208:540–553.
- 21 **Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, et al.** Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol* **2000**;74:6570–6580.
- 22 **Filman DJ, Syed R, Chow M, et al.** Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J* **1989**;8:1567–1579.
- 23 **Flanegan JB, Petterson RF, Ambros V, et al.** Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**;74:961–965.

- 24 Fricks CE, Hogle JM.** Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* **1990**;64:1934–1945.
- 25 Gamarnik AV, Andino R.** Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* **1998**;12:2293–2304.
- 26 Giachetti C, Semler BL.** Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *J Virol* **1991**;65(7):3972 and **1991**;65(10):5653. *J Virol* **1991**;65:2647-2654.
- 27 Grandien M, Forsgren M Ehrnst A.** Enteroviruses and reoviruses. In “Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections” (N. J. Schmidt and R. W. Emmons, eds.) 6<sup>th</sup> Ed., p. 513. *American Public Health Association, Washington, D.C.* **1989**
- 28 Greber UF.** Signaling in viral entry. *Cell Mol Life Sci* **2002**;59(4):608-626
- 29 Guney Cakir, Ozkaya Etem, Yapar Mehmet, Gumus Ismail, Kubar Ayhan, Doganci Levent** Laboratory diagnosis of enteroviral infections of the central nervous system by using a nested RT-polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2003 Dec**;47(4):557-62.
- 30 Guskey LE, Smith PC, Wolff DA.** Patterns of cytopathology and lysosomal enzyme release in poliovirus- infected HEp-2 cells treated with either 2-(alpha-hydroxybenzyl)-benzimidazole or guanidine HCl. *J Gen Virol* **1970**;6:151-161.
- 31 Harber J, Bernhardt G, Lu H-H, et al.** Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology* **1995**;214:559–570.
- 32 Harley A. Rotbart, Mark H. Sawyer, Samantha Fast, Carol Lewinski, Neva Murphy, Enid F. Keyser, Joanne Spadoro, Shaw-Yi Kao, Michael Loeffelholz.** Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microbiol.* **1994 Oct**;32(10):2590-2.
- 33 Hogle JM, Chow M, Filman DJ.** Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* **1985**;229:1358–1365.
- 34 Hohenadl C, Klingel K, Mertsching J, et al.** Strand-specific detection of enteroviral RNA in myocardial tissue by in situ hybridization. *Mol Cell Probes.* **1991 Feb**;5(1):11-20.

- 35 **Hovi T, Stenvik M.** Selective isolation of poliovirus in recombinant murine cell line expressing the human poliovirus receptor gene. *J Clin Microbiol.* **1994** May;32(5):1366-8.
- 36 **Ida-Hosonuma M, Sasaki Y, Toyoda H, et al.** Host range of poliovirus is restricted to simians because of a rapid sequence change of the poliovirus receptor gene during evolution. *Arch Virol* **2003**;148:29–44.
- 37 **Ishii Satoshi, Kitamura Gaku, Segawa Takahiro, Kobayashi Ayano, Miura Takayuki, Sano Daisuke, Okabe Satoshi.** Microfluidic quantitative PCR for simultaneous quantification of multiple viruses in environmental water samples. *Appl Environ Microbiol.* **2014** Dec;80(24):7505-11. doi: 10.1128/AEM.02578-14. Epub 2014 Sep 26.
- 38 **Jacobson SJ, Konings DA, Sarnow P.** 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* **1993**;67:2961–2971.
- 39 **Kessler HH, Santner B, Rabenau H, et al.** Rapid diagnosis of enterovirus infection by a new one-step reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol.* **1997** Apr;35(4):976-7.
- 40 **Kew O, De L, Yang C-F, et al.** The role of virological surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. *Appl Virol Res* **1993**;215-246.
- 41 **Kilpatrick DR, Nottay B, Yang CF, et al.** Group-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residue at positions of codon degeneracy. *J Clin Microbiol.* **1996** Dec;34(12):2990-6.
- 42 **Kilpatrick DR, Nottay B, Yang CF, et al.** Serotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. *J Clin Microbiol.* **1998** Feb;36(2):352-7.
- 43 **Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al.** Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* **1981**;291:547–553.
- 44 **Knowles, N.J., Hovi, T, Hyypiä, T., King, A.M.Q., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and Zell, R.** *Picornaviridae.* In *Virus Taxonomy: Classification and*



Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: (2012) Elsevier, pp 855-880.

- 45 **Koike S, Ise I, Nomoto A.** Functional domains of the poliovirus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**;88:4104-4108
- 46 **Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, et al.** A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**;74:59–63.
- 47 **Lentz KN, Smith AD, Geisler SC, et al.** Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent SCH48973: comparison of the structural and biological properties of three poliovirus serotypes. *Structure* **1997**;5:961–978.
- 48 **Liao S, Racaniello V.** Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J Virol* **1997**;71:9770–9777.
- 49 **Magnius LO, Saleh LH, Vikerfors T, et al.** A solid-phase reverse immunosorbent test for the detection of enterovirus IgM. *J Virol Methods*. **1988** May;20(1):73-82.
- 50 **Marshall GS, Hauck MA, Buck G, Rabalais GP.** Potential cost savings through rapid diagnosis of enteroviral meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. **1997** Nov;16(11):1086-7.
- 51 (a) **Melnick JL, Hampil B.** WHO collaborative studies on enterovirus reference antisera; fourth report. *Bull World Health Organ*. **1973**;48(4):381-96.  
(b) **Melnick JL, Rennick V, Hampil B, et al.** Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull World Health Organ*. **1973**;48(3):263-8.
- 52 **Melnick JL.** Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields Virology, 3rd ed.* Philadelphia: Lippincott-Raven; **1996**:655–712.
- 53 **Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR.** Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **1989**;56:855–865.
- 54 **Ming Hong-Xia, Zhu Lin, Zhang Yuan.** Rapid quantification of infectious enterovirus from surface water in Bohai Bay, China using an integrated cell culture-qPCR assay. *Mar Pollut Bull*. **2011** Oct;62(10):2047-54. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.07.024. Epub 2011 Sep 1.

- 55 **Mintz L, Drew WL.** Relation of culture site to the recovery of nonpolio enteroviruses. *Am J Clin Pathol.* **1980 Sep**;74(3):324-6.
- 56 **Monpoeho S., Coste-Burel M., Costa-Mattioli M., Besse B., Chomel J. J., Billaudel S., Ferré V.** Application of a real-time polymerase chain reaction with internal positive control for detection and quantification of enterovirus in cerebrospinal fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2002 Jul**;21(7):532-6. *Epub 2002 Jul 13.*
- 57 **Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al.** Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **2003**;77:5136–5144.
- 58 **Morrison ME, Racaniello VR.** Molecular cloning and expression of a murine homolog of the human poliovirus receptor gene. *J Virol* **1992**;66:2807-2813
- 59 **Moscufo N, Yafal AG, Rogove A, et al.** A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. *J Virol* **1993**;67:5075–5078.
- 60 **Mueller S, Wimmer E, Cello J.** Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Research* **2005**; 111(issue 2): 175-193
- 61 **Muir P, Ras A, Klapper PE, et al.** Multicenter quality assessment of PCR methods for detection of enteroviruses . *J Clin Microbiol.* **1999 May**;37(5):1409-14.
- 62 **Murray KE, Barton DJ.** Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **2003**;77:4739–4750.
- 63 (a) **Nomoto A, Detjen B, Pozzatti R, et al.** The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* **1977**;268:208–213.
- (b) **Nomoto A, Kitamura N, Golini F, et al.** The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**;74:5345–5349.
- 64 **Novak JE, Kirkegaard K.** Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* **1991**;65:3384–3387

- 65 **Oberste MS, Maher K, Kennett ML, et al.** Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol* **1999**;37:3928-3933
- 66 **Oberste MS, Michele SM, Maher K, et al.** Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J Gen Virol.* **2004 Nov**;85(Pt 11):3205-12.
- 67 **Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, et al.** Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J Gen Virol.* **1990 Sep**;71 ( Pt 9):2141-7.
- 68 **Pelkmans L, B'Orli T, Zerial M, et al.** Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* **2004**;118(6):767-780.
- 69 **Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D.** Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol* **1978**;27:357–365.
- 70 **Pettersson RF, Flanagan JB, Rose JK, et al.** 5'-Terminal nucleotide sequences of polio virus polyribosomal RNA and virion RNA are identical. *Nature* **1977**;268:270–272.
- 71 **Pezeshkpour GH, Dalakas MC.** Pathology of spinal cord in post-poliomyelitis muscular atrophy. *Birth Defects Orig Artic Ser.* **1987**;23(4):229-36.
- 72 **Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer.** Molecular Biology of poliovirus. *Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.* **1999**
- 73 **Racaniello V.** Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology 5<sup>th</sup> edition.* Lippincott Williams & Wilkins; **2007**, p. 796-830.
- 74 (a) **Racaniello VR, Baltimore D. et al.** Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science.* **1981 Nov 20**;214(4523):916-9.  
 (b) **Racaniello VR, Baltimore D.** Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**;78:4887–4891.
- 75 **Rieder E, Paul AV, Kim DW, et al.** Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* **2000**;74:10371–10380.

- 76 Rossmann MG.** The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J Biol Chem* **1989**;264:14587-14590.
- 77 Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, et al.** Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microbiol.* **1994 Oct**;32(10):2590-2.
- 78 Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM.** The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1969**;62:912–919.
- 79 Schlegel A, Giddings Jr TH, Ladinsky MS, et al.** Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* **1996**;70:6576–6588.
- 80 Shulman LM, Manor Y, Azar R, et al.** Identification of a new strain of fastidious enterovirus 70 as the causative agent of an outbreak of hemorrhagic conjunctivitis. *J Clin Microbiol.* **1997 Aug**;35(8):2145-9.
- 81 Spector DH, Baltimore D.** Requirement of 3'-terminal poly(adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**;71:2983–2987.
- 82 Stellrecht K.A., Harding I., Hussain F.M., Mishrik N.G., Czap R.T., Lepow M.L., Venezia R.A..** A one-step RT-PCR assay using an enzyme-linked detection system for the diagnosis of enterovirus meningitis. *J Clin Virol.* **2000 Sep 1**;17(3):143-9.
- 83 Summers DF, Maizel JV.** Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1968**;59:966–971.
- 84 Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, et al.** Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol* **2005**;170(5):769-779
- 85 Tanel RE, Kao SY, Niemiec TM, et al.** Prospective comparison of culture vs genome detection for diagnosis of enteroviral meningitis in childhood. *Arch Pediatr Adolesc Med.* **1996 Sep**;150(9):919-24.
- 86 Todd S, Towner JS, Brown DM, et al.** Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol* **1997**;71:8868–8874.

- 87 Tucker S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer, and R. W. Compans** Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 1993;67:4274-4282.
- 88 Wickman I.** Beitrage zur Kenntnis der Heine-Medinschen Krankheit (Poliomyelitis acuta und verwandter Erkernkungen). Berlin: Karger; **1907**
- 89 Yin-Murphy M, Abdul Rahim N, Phoon MC, et al.** Early and rapid diagnosis of acute haemorrhagic conjunctivitis with tear specimens. *Bull World Health Organ.* **1985**;63(4):705-9.
- 90 Yin-Murphy M.** Acute hemorrhagic conjunctivitis. *Prog Med Virol.* **1984**;29:23-44.
- 91 Yogo Y, Teng MH, Wimmer E.** Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res Commun* **1974**;61:1101–1109.
- 92 Yogo Y, Wimmer E.** Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1972**;69:1877–1882.