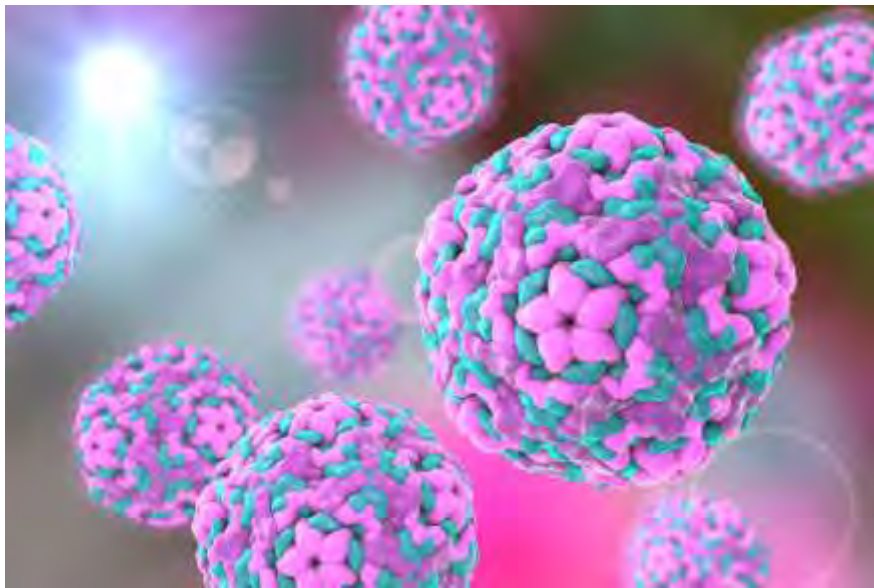




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



Πτυχιακή Εργασία

Colorimetric LAMP για την ανίχνευση Εντεροϊών της
ομάδας Β και C

Αλεξοπούλου Δήμητρα

Λάρισα, 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ):

ΣΥΜΒΑΣΙΟΥΧΟΣ ΔΙΔΑΣΚΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ:

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

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ:

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

Colorimetric LAMP για την ανίχνευση Εντεροϊών της ομάδας B και C.

Colorimetric LAMP for the detection of enteroviruses B and C strains.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων-Μοριακής βακτηριολογίας-Ιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, απο τον Οκτώβριο του 2018, μέχρι και τον Ιούλιο του 2019.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ.Παναγιώτη Μαρκουλάτο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγησή του, κατά διάρκεια διεξαγωγής της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο, που δέχθηκε να συμμετάσχει στην τριμελή επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Συμβασιούχο Διδάσκοντα Δημητρίου Τηλέμαχο, επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας, για την βοήθεια και ενθάρρυνση που επέδειξε, καθώς και για τις συνεχείς γνώσεις που μου προσέφερε στο εργαστήριο.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Δάσκου, για την ανεκτίμητη βοήθειά της, την συνεχή στήριξη αλλά και υπομονή που επέδειξε, καθώς και για την άψογη και ευχάριστη συνεργασία μας όλους αυτούς τους μήνες.

Τελος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια και φιλική τους διάθεση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae και στο γένος των εντεροϊών. Είναι μικροί σε μέγεθος ιοί, χωρίς φάκελο με το γονιδίωμα τους να είναι ένα μονόκλωνο, θετικής πολικότητας +ssRNA, μήκους περίπου 7.500 βάσεων, το οποίο περιβάλλεται από καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το γονιδίωμα των εντεροϊών, αποτελείται από ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο ORF, το οποίο συνορεύει με μια υψηλά συντηρημένη 5' αμετάφραστη περιοχή και με μία 3' αμετάφραστη περιοχή που διαθέτει πολυ(A) ουρά. Οι εντεροϊοί συνήθως προκαλούν ασυμπτωτικές ή ήπιες μολύνσεις, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες, όπως παραλυτική πολιομυελίτιδα, άσηπτη μениγγίτιδα και μυοκαρδίτιδα.

Η διάγνωση των εντεροϊών προϋποθέτει κυρίως την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων. Ωστόσο, τις περισσότερες φορές οι μολύνσεις που προκαλούνται από τους εντεροϊούς, είναι συνήθως ασυμπτωματικές, εμφανίζοντας λίγα έως και καθόλου κλινικά σημάδια. Το γεγονός αυτό, τους επιτρέπει να κυκλοφορούν στον πληθυσμό χωρίς να γίνονται αντιληπτοί, το οποίο συνεπάγεται πιθανή επερχόμενη έξαρση του ιού. Έτσι, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για την ανάπτυξη μιας γρήγορης και ευαίσθητης μεθόδου ανίχνευσης των εντεροϊών, που να μπορεί να προλαμβάνει τέτοιου είδους γεγονότα.

Στη συγκεκριμένη εργασία, περιγράφεται η ανάπτυξη μιας εύκολης, γρήγορης και ευαίσθητης ισοθερμικής Colorimetric LAMP τεχνικής για την ανίχνευση των εντεροϊών της ομάδας Β και C, η οποία επιτρέπει την ταχύτατη και άμεση οπτικοποίηση της ενίσχυσης, μέσω αλλαγής χρώματος. Η εξειδίκευση της αντίδρασης, οφείλεται στην χρήση έξι εκκινητικών μορίων, ειδικών για τις πρότυπες αλληλουχίες των εντεροϊών αυτών και εφαρμόστηκε τόσο σε πρότυπα στελέχη, όσο και σε κλινικά δείγματα.

Η επιτυχία της εφαρμογής της Colorimetric LAMP στα κλινικά και πρότυπα δείγματα, καθιστά την τεχνική αυτή ιδανική για την ανίχνευση των εντεροϊών που ανήκουν στις ομάδες Β και C, επιδεικνύοντας αυξημένη ταχύτητα και εξειδίκευση, καθιστώντας δυνατή την ανίχνευσή τους με σημαντικά χαμηλό κόστος εξοπλισμού.

ABSTRACT

Enteroviruses belong to Picornaviridae family and to enteroviruses genus. They are small in size viruses, without envelope, with their genome being a single-stranded, of positive polarity +ssRNA, of approximately 7.500 bases in length, surrounded by an icosahedral capsid. The genome of enteroviruses consists of only one open reading frame ORF, flanked by a highly conserved structures 5'-untranslated region and a 3' untranslated region with a poly(A) tail. Enteroviruses usually cause asymptomatic or mild infections, however in some cases they can cause serious diseases, such us paralytic poliomyelitis, aseptic meningitis and myocarditis.

Diagnosis of enteroviruses mainly involves the appearance of clinical symptoms. However, most of the time the infections caused by enteroviruses are usually asymptomatic, showing few or any clinical signs. This fact allows them to circulate within the population without being noticed, which may result in a potential outbreak of the virus. Thus, there is an urgent need to develop a rapid and sensitive method of detection of enteroviruses that can prevent such incidents.

In the present study, we describe the development of a simple, rapid and sensitive isothermal Colorimetric LAMP technique for the detection of enteroviruses that belong to the species B and C, which enables rapid and immediate visualization of amplification through color change. The specificity of the reaction is due to the use of several primers, specific for the reference sequences of these enteroviruses and was applied to both reference strains and clinical isolates.

The successful application of Colorimetric LAMP to reference strains and clinical isolates makes this method ideal for the detection of enteroviruses belonging to species B and C, showing increased speed and specificity and enabling their detection with significantly lower cost equipment

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1	Βιολογία εντεροϊών.....	8
1.2	Ταξινόμηση των εντεροϊών.....	8
1.3	Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων.....	9
1.4	Οργάνωση και δομή του ιϊκού γονιδιώματος.....	12
1.5	Κύκλος ζωής των εντεροϊών.....	13
1.6	Παθογένεια εντεροϊών.....	21
1.7	Μηχανισμοί εξέλιξης εντεροϊών.....	23
1.8	Επιδημιολογία.....	25
2.	ΣΚΟΠΟΣ.....	28
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
3.1	Πρότυπα και Κλινικά Δείγματα:.....	29
3.2	Εκχύλιση RNA.....	30
3.3	Σχεδιασμός εκκινητικών μορίων.....	31
3.4	LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification).....	31
3.5	Real time Colorimetric LAMP.....	34
3.6	Colorimetric LAMP(Loop mediated isothermal amplification).....	35
3.7	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Colorimetric LAMP.....	38
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
4.1	Αποτελέσματα της Real Time Colorimetric LAMP σε Sabin1.....	39
4.2	Colorimetric LAMP σε πρότυπα στελέχη.....	40
4.3	Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προτύπων στελεχών.....	41
4.4	Colorimetric LAMP σε κλινικά δείγματα.....	44
4.5	Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης κλινικών δειγμάτων.....	45
4.6	Έλεγχος ευαισθησίας Colorimetric LAMP.....	47
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιολογία εντεροϊών.

Η ομάδα των εντεροϊών συγκαταλέγεται στην οικογένεια Picornaviridae και στο γένος Enterovirus. Εκτός από τους εντεροϊούς, στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται και άλλοι παθογόνοι ιοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα θηλαστικά, όπως ο ιός της ηπατίτιδας Α, ο FMDV (foot and mouth disease virus) και οι ρινοϊοί. Οι εντεροϊοί και γενικά οι picorna ιοί δε διαθέτουν φάκελο, ενώ το γονιδίωμα τους είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας (+) ss RNA, με μήκος περίπου 7.500 βάσεις. Το όνομα picorna είναι ενδεικτικό του μικρού μεγέθους των ιών της ομάδας αυτής (pico), αλλά και του είδους του νουκλεϊκού οξέος από το οποίο αποτελείται το γονιδίωμα τους (RNA) (1).

1.2 Ταξινόμηση των εντεροϊών

Η οικογένεια των Picornaviridae αποτελείται από 35 διακριτά γένη, σύμφωνα με τη νέα ταξινόμηση των ιών το 2017, από τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV) (2).

Ampivirus	Aphthovirus	Aquamavirus	Avihepatovirus	Avisivirus
Cardiovirus	Cosavirus	Dicivirus	<u>Enterovirus</u>	Erbovirus
Gallivirus	Harkavirus	Hepatovirus	Hunnivirus	Kobuvirus
Kunsagivirus	Limnipivirus	Megrivirus	Mischivirus	Mosavirus
Oscivirus	Parechovirus	Pasivirus	Passerivirus	Potamipivirus
Rabovirus	Rosavirus	Sakobuvirus	Salivirus	Sapelovirus
Senecavirus	Sicinivirus	Teschovirus	Torchvirus	Tremovirus

Πίνακας 1.2.1: Πίνακας με τα 35 γένη των Picornaviridae.

Τα παραπάνω γένη αποτελούνται από διακριτά αντιγονικά στελέχη, τα οποία διαμορφώνονται με βάση τις ομοιότητες στις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιοσωματίου, την οργάνωση καθώς και την αλληλουχία του ιϊκού γονιδιώματος (1).

Όσον αφορά το γένος των εντεροϊών, αυτό προκαλεί και τις πιο σημαντικές ανθρώπινες ασθένειες. Παλαιότερα, οι ιοί αυτοί κατατάσσονταν σε 4 κατηγορίες οι οποίες ήταν: ιοί Coxsackie A (CAV, ορότυποι 1-24), ιοί Coxsackie B (CBV, ορότυποι 1-6), Poliovirus (PV, ορότυποι 1-3) και τέλος Echovirus (E, ορότυποι 1-6). Ωστόσο, λόγω της ταξινομικής εξέλιξης, διαχωρίστηκαν σε 12 είδη με πολλαπλούς ορότυπους ο καθένας.

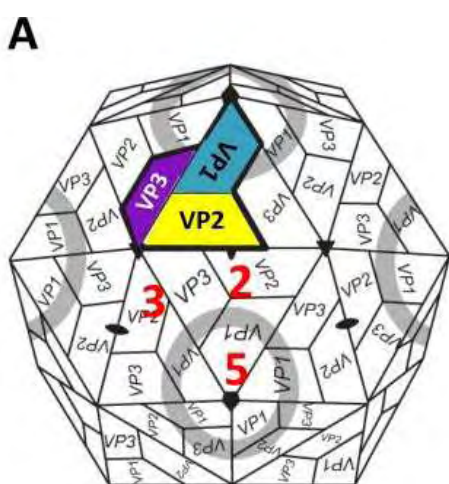
<u>Γένος εντεροϊών</u>	<u>Ορότυποι</u>
Enterovirus A	25
Enterovirus B	61
Enterovirus C	23
Enterovirus D	5
Enterovirus E	4
Enterovirus F	6
Enterovirus G	11
Enterovirus H	1
Enterovirus J	6
Rhinovirus A	80
Rhinovirus B	32
Rhinovirus C	54

Πίνακας 1.2.2: Τα γένη των εντεροϊών και οι ορότυποι, σύμφωνα με τη νέα ταξινόμηση

1.3 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων

Κάθε ορότυπος έχει σχέση με την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, την προστασία από την ασθένεια, τη χρήση υποδοχέων και σε μικρότερο βαθμό το κλινικό φάσμα της νόσου. Ωστόσο, οι παραπάνω συσχετισμοί συνάδουν μερικώς με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε πολιοϊούς, Coxsackie A, Coxsackie B, και Echo ιούς, η οποία βασίστηκε στη βιολογική ενεργότητα και νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με ελαφριά παράλυση από πολιοϊό— χαλαρή παράλυση σε νεογνά ποντίκια, στοματικές φλύκταινες και ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ από τους ιούς Coxsackie A—και τέλος σπαστική παράλυση σε νεογνά ποντίκια, ανθρώπινη καρδιακή νόσος και νόσος του ΚΝΣ προκαλούμενα από τους ιούς Coxsackie B. Μέσα στις ομάδες αυτές, οι ιοί μπορούν να διακριθούν με βάση την αντιγονικότητά τους, όπως αυτή προσδιορίζεται με τη βοήθεια αντι-ορών.

Αυτές οι αντιγονικές ομαδοποιήσεις, που υποδεικνύουν τον ορότυπο, έγιναν ακόμα πιο περίπλοκες, λόγω του αυξανόμενου αριθμού των ιών με το πέρασμα των χρόνων. Η διάκριση των οροτύπων άρχισε να γίνεται όλο και πιο δύσκολη, καθώς ανακαλύπτονταν ιοί που αντιγονικά σχετίζονταν ελάχιστα με γνωστούς ορότυπους. Παρά τους περιορισμούς αυτούς όμως, ο ορότυπος παραμένει σημαντικό κριτήριο για το διαχωρισμό των διαφόρων εντεροϊών (1). Πλέον όμως, οι νέοι εντεροϊοί ταξινομούνται κατά χρονολογική σειρά με αύξαντα αριθμό (EV-X 68-121), όπου X είναι το γράμμα της ομάδας στην οποία ανήκουν.



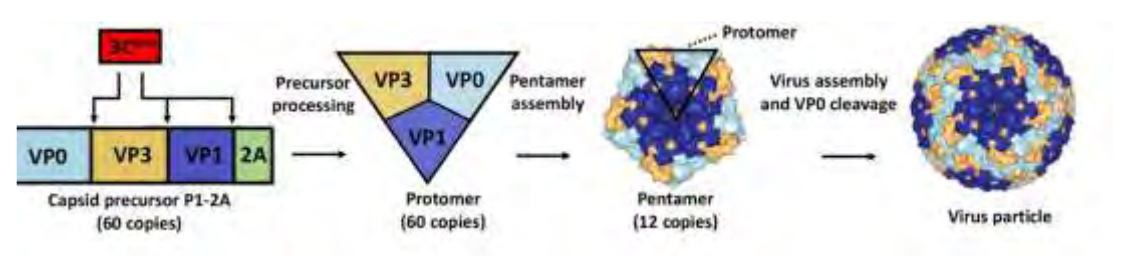
Εικόνα 1.3.1: Δομή Picornavirus
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187686/>

Οι εντεροϊοί διαθέτουν σφαιρικά ισωμάτια χωρίς φάκελο (27 με 30 nm διάμετρο), τα οποία είναι απλά αφού αποτελούνται μόνο από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα που περιβάλλει το γυμνό RNA (3). Τα ισωμάτια στερούνται λιπιδικού ελύτρου, γεγονός το οποίο μειώνει τη μολυσματικότητα τους σε οργανικούς διαλύτες. Επιπλέον, μερικοί picorna ιοί, ανάμεσα τους και οι έντεροϊοί, είναι πολύ σταθεροί σε περιβάλλοντα με χαμηλό pH

(μικρότερο του 3), οπότε και είναι μολυσματικοί ακόμα και σε όξινες συνθήκες (1).

Τα καψίδια των ιών αυτών, αποτελούνται από 4 δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4 και σχηματίζονται από 60 αντίγραφα των 4 αυτών πρωτεϊνών. Σύμφωνα με μελέτες των Caspar and Klug, ο πιο αποτελεσματικός τρόπος συναρμολόγησης όμοιων ασύμμετρων όμως υπομονάδων, είναι να διαταχθούν οι πρωτεϊνικές υπομονάδες με εικοσαεδρική συμμετρία (4). Ένα εικοσάεδρο, είναι ένα πολύεδρο στέρεο σώμα με 20 τριγωνικές πλευρές και 12 κορυφές. Ο ελάχιστος αριθμός των υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία τέτοιας δομής, είναι 60. Οι άξονες συμμετρίας που διακρίνονται στο εικοσάεδρο καψίδιο είναι 3, ένας πενταμερής άξονας στο κέντρο των πενταμερών (5X), ένας διμερής (2X) και ένας τριμερής (3X) που βρίσκονται μεταξύ των πενταμερών. Από αποτελέσματα που προέκυψαν από ακτίνες περίθλασης Χ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, διαπιστώθηκε ότι τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές υπομονάδες πρωτεϊνών διατεταγμένες σε μια εικοσαεδρική δομή (5).

Το βασικό δομικό στοιχείο του καψιδίου των εντεροϊών είναι το πρωτομερές P1, το οποίο περιλαμβάνει ένα αντίγραφο από κάθε πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3, VP4. Βασική δομική μονάδα του καψιδίου είναι το πενταμερές, το οποίο αποτελείται από αντίγραφα των VP1, VP3 και VP0 (πρόδρομος πρωτεΐνη), στην οποία συνδέονται ομοιοπολικά οι VP4 και VP2 δομικές πρωτεΐνες (6). Συγκεκριμένα, το κέλυφος του καψιδίου σχηματίζεται από τις VP1 και VP3 ενώ στο εσωτερικό του βρίσκεται η VP4 πρωτεΐνη. Οι VP1, VP2, VP3 δεν εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία τους ωστόσο, έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλα β-βαρέλι με 8 αλυσίδες. Αυτή η δομή, σχηματίζεται από 2 αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα. Αυτή η πολύπλοκη δομή, διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών πρωτεϊνών, ώστε να σχηματίσουν ένα πυκνό και άκαμπτο περίβλημα (1). Κατά την καψιδίωση του RNA του ιού, πραγματοποιείται η ωρίμανση, όπου η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 διασπάται στις VP2 και VP4, με σκοπό τη σταθεροποίηση του ώριμου πλέον ιού (3).

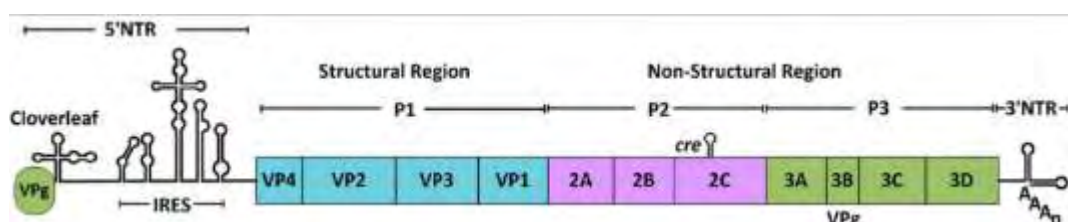


Εικόνα 1.3.2 Συναρμολόγηση του καψιδίου (7)

Όσον αφορά τα COOH-τελικά άκρα των δομικών πρωτεϊνών, αυτά βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις του ιού (N-Ags I-II). Αντίθετα, τα NH₂-τελικά άκρα των VP1, VP2, VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό και σχηματίζουν ένα σύνθετο δίκτυο με τη VP4, οποία συνδέεται μέσω τους μυριστικού οξέος στο αμινοτελικό άκρο (8). Επιπλέον, η εξωτερική επιφάνεια του ιού περιέχει προεξοχές και αυλακώσεις. Η σημαντικότερη και βαθύτερη αυλάκωση που δημιουργείται είναι το canyon, περιοχή η οποία σχηματίζεται από την σύνδεση των VP1 και VP3, γύρω από τον πενταμερή άξονα. Η θέση αυτή, αποτελεί θέση σύνδεσης για κυτταρικούς υποδοχείς που έχουν μια αναδίπλωση immunoglobulin-like (9).

1.4 Οργάνωση και δομή του ιϊκού γονιδιώματος.

Το γονιδίωμα των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας +ssRNA και έχει μήκος περίπου 7.500 βάσεις. Έτσι, κατά την είσοδο του στο κύτταρο του ξενιστή, το γονιδίωμα ως RNA θετικής πολικότητας, μπορεί να μεταφραστεί κατευθείαν από μηχανισμούς του ξενιστή και να παράγει τις ιϊκές πρωτεΐνες που χρειάζονται για την αναπαραγωγή του ιού. Στη συνέχεια η θετική έλικα του RNA, μπορεί να αντιγραφεί και να δώσει τον συμπληρωματικό αρνητικό κλώνο, ο οποίος θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση νέων +ssRNA γονιδιωμάτων του ιού. Το γονιδίωμα των εντεροϊών περιλαμβάνει: την 5' αμετάφραστη περιοχή (5' UTR), ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF, που κωδικοποιεί για την πολυπρωτεΐνη του ιού, την 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) και τέλος μια πολυαδενυλιωμένη ουρά. Αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό, είναι ότι αντί για μεθυλιωμένη καλύπτρα στο 5' άκρο του γονιδιώματος, αυτό (5' UTR) είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με μια VPg πρωτεΐνη (Virion Protein, genome-linked) (10). Η VPg πρωτεΐνη, είναι πολύ σημαντική για τη σύνθεση του ιϊκού RNA, καθώς αποτελεί εκκινήτη για τη σύνθεση



Εικόνα 1.4 1 Οργάνωση του γονιδιώματος των εντεροϊών (9)

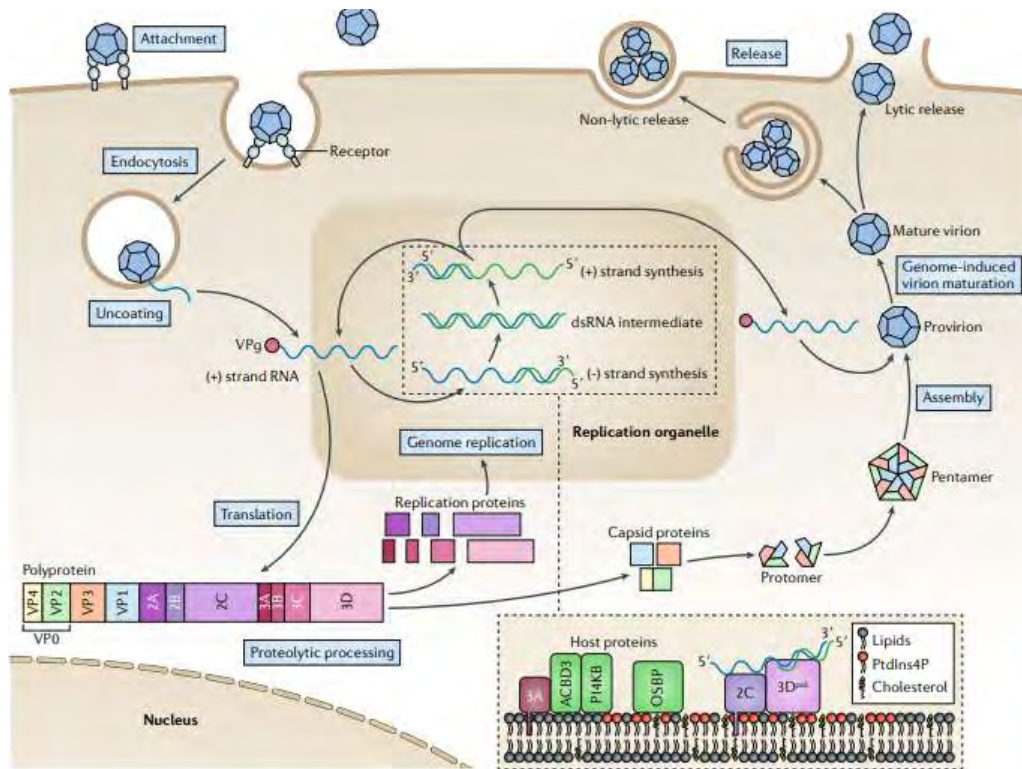
του (11).

- ❖ **Η 5' NTR περιοχή**, είναι υψηλά συντηρημένη μεταξύ των εντεροϊών και αποτελείται από περίπου 750 νουκλεοτίδια. Περιέχει αλληλουχίες που ρυθμίζουν την αντιγραφή και τη μετάφραση του γονιδιώματος. Ειδικότερα, η εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου IRES(Internal Ribosome Entry Site), είναι μια cis-δραστική περιοχή που κατευθύνει τη στρατολόγηση των ριβοσωμικών υπομονάδων με τέτοιο τρόπο, ώστε η μετάφραση να γίνεται ανεξάρτητα από την καλύπτρα (12).
- ❖ **Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF**, είναι ένα μοναδικό αναγνωστικό πλαίσιο που κωδικοποιεί τόσο για τις πρωτεΐνες του καψιδίου(δομικές), όσο και για τις μη δομικές πρωτεΐνες του ιού (11).
- ❖ **Η 3' NTR περιοχή**, έχει μικρότερο μήκος από την 5'NTR και φέρει και αυτή δευτεροταγής δομή που είναι σημαντική για τον έλεγχο της σύνθεσης του RNA (13). Τέλος, είναι παρούσα και μια πολυαδενυλιωμένη ουρά στο άκρο της 3'NTR.

1.5 Κύκλος ζωής των εντεροϊών

Αρχικά, ο ιός προσδένεται σε κυτταρικούς υποδοχείς του ξενιστή, και εισέρχεται στο εσωτερικό του κυτταρού μέσω ενδοκύτωσης. Έπειτα, ακολουθεί απέκδυση του ιού, όπου το καψίδιο υφίσταται δομικές αλλαγές και έτσι το ιϊκό RNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Το θετικής πολικότητας RNA, μεταφράζεται απευθείας μετά την είσοδο στο κύτταρο και προκύπτει μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια τεμαχίζεται και προκύπτουν τόσο δομικές, όσο και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Η ιϊκή RNA-εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση, παράγεται από αυτή την πολυπρωτεΐνη και είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του γονιδιώματος. Η αντιγραφή, λαμβάνει χώρα σε μεμβρανικά αντιγραφικά οργανίδια, προερχόμενα από το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα οποία περιέχουν τόσο ιϊκές, όσο και κυτταρικές πρωτεΐνες και το RNA. Έτσι το +ssRNA μετατρέπεται σε αρνητικής πολικότητας RNA, το οποίο θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση νέων +ssRNAs. Δηλαδή, ένα μέρος του θετικής πολικότητας RNA θα αποτελέσει το γονιδίωμα των

ώριμων πλέον ισωματίων και ένα άλλο μέρος θα μεταφραστεί όντας mRNA, στις πρωτεΐνες του ιού. Τέλος, οι πρωτεΐνες του καψιδίου οργανώνονται ώστε να σχηματιστεί το καψίδιο, ακολουθεί καψιδίωση και λύση του κυττάρου ξενιστή με



Εικόνα 1.4 2 Στάδια κύκλου ζωής των picorna ιών (15)

έξοδο του καψιδίου από αυτό (14).

1. Προσκόλληση σε κυτταρικούς υποδοχείς και είσοδος του ιού στο κύτταρο

Για να ξεκινήσει η μόλυνση του κυττάρου-ξενιστή, προερχόμενη από εντεροϊό, απαιτείται η σύνδεση του σε μεμβρανικό υποδοχέα του κυττάρου. Οι ιοί αυτοί, έχουν εξελιχθεί με τέτοιο τρόπο, που χρησιμοποιούν μια πληθώρα διαφορετικών μορίων ως υποδοχείς τους, όπως γλυκολιπίδια, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες (15). Η περιοχή του ιού, που συμμετέχει στη σύνδεση με τον υποδοχέα, περιλαμβάνει τα περισσότερο συντηρημένα αμινοξέα στην μεγάλη αύλακα (canyon) που σχηματίζεται από τις καψιδιακές πρωτεΐνες του ιού. Η υπόθεση της συμμετοχής της αύλακας αυτής που διατυπώθηκε από τον Rossman, υποστήριξε πως μια στρατηγική του ιού για να διαφύγει του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή είναι, να “κρύψει” την περιοχή σύνδεσης στον υποδοχέα σε μια επιφανειακή

αυλάκωση. Με αυτόν τον τρόπο, προστατεύεται η περιοχή σύνδεσης από τα αντισώματα του οργανισμού, χωρίς όμως να παρεμποδίζεται η αναγνώριση από τον κυτταρικό υποδοχέα (16). Η εξειδίκευση του ιού όσον αφορά τον ξενιστή και τους ιστούς τους οποίους προσβάλλει, φαίνεται να εξαρτάται εν μέρει, από την εξειδίκευση και έκφραση των υποδοχέων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο κυτταρικός υποδοχέας των πολιοϊών, PVR(CD155), ο οποίος μετά από κλωνοποίηση του cDNA που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα, ανακαλύφθηκε ότι ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών, ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Το εξωκυτταρικό τμήμα της πρωτεΐνης αυτής αποτελείται από 3 Ig-όμοιες επικράτειες, οι οποίες περιέχουν συντηρημένα αμινοξέα ανάμεσα σε αυτή την υπεροικογένεια υποδοχέων: η πρώτη επικράτεια είναι τύπου V-περιοχή και ακολουθείται από 2 C2-τύπου περιοχές (17). Η πρώτη επικράτεια μάλιστα φέρει τη θέση σύνδεσης (18).

Μερικά μέλη της ομάδας εντεροϊών C, όπως οι Coxsackie A(13,17,20,21,23), κάνουν χρήση του υποδοχέα ICAM-1, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών που φυσιολογικά βρίσκεται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων (18).

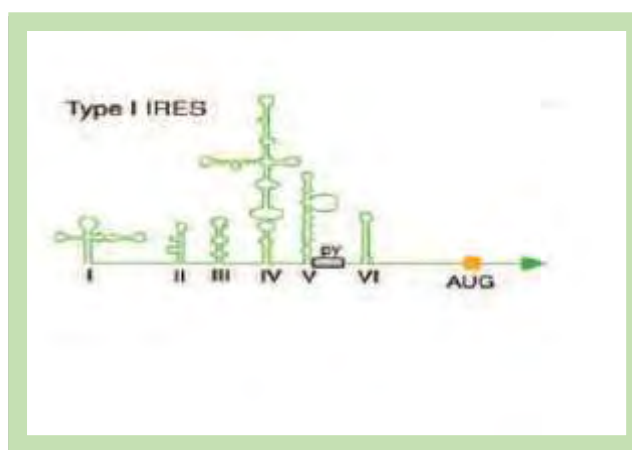
Μέλη της ομάδας των εντεροϊών B, όπως οι Coxsackie B(1,3,5), χρησιμοποιού υποδοχείς, μεταξύ των οποίων, τον υποδοχέα DAF(Complement-decay accelerating factor, CD55), ο οποίος είναι μια πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται στη μεμβράνη, μέσω άγκυρας της γλυκοφωσφατίδυλοινωσιτόλης και ελέγχει το σύστημα του συμπληρώματος της ανοσολογικής απόκρισης (19).

Καθώς επιτυγχάνεται, η προσκόλληση του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα, ο ιός υφίσταται δομικές αλλαγές, οι οποίες επιφέρουν σημαντικά αποτελέσματα. Οι αλλαγμένες αυτές δομές του ιού, ονομάζονται altered ή A σωματίδια, τα οποία ενώ περιέχουν το ιικό RNA, έχουν χάσει την πρωτεΐνη της εσωτερικής επιφάνειας του καψιδίου VP4. Ακόμα, η VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού, από το εσωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται στο εξωτερικό της επιφάνειας των σωματιδίων A (20). Η αλληλουχία της είναι υδρόφοβη, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγγένεια των A σωματιδίων για τη μεμβράνη, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά καψίδια. Το εκτεθειμένο λιπόφιλο άκρο της VP1, εισέρχεται στη μεμβράνη, οδηγώντας και το

σωματίδιο A σε αυτή. Στη συνέχεια, σχηματίζεται ένας μεμβρανικός πόρος, τόσο από τη VP1, όσο και από τη VP4, μέσω του οποίου το ιϊκό RNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα (21)

II. Μετάφραση του ιϊκού RNA και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης

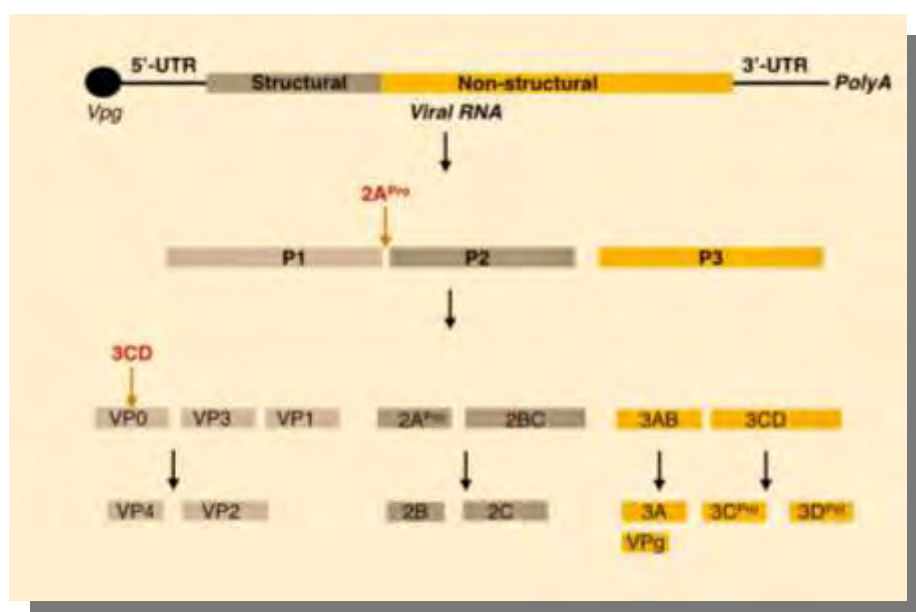
Από τη στιγμή, που το θετικής πολικότητας ssRNA, εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, θα πρέπει να μεταφραστεί, λόγω του γεγονότος ότι δε μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση, ενώ κανένα ιϊκό ένζυμο του καψιδίου δεν έχει εισέλθει στο κυτταρόπλασμα. Το θετικής πολικότητας RNA, στερείται των 5' καλύπτρας δομών, είναι ωστόσο συνδεδεμένο ομοιοπολικά στην ιϊκή πρωτεΐνη VPg. Αυτή η πρωτεΐνη, αφαιρείται από ένα κυτταρικό ένζυμο, κατά την είσοδο στο κύτταρο. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του +ssRNA κλώνου του πολιοϊού, αποκάλυψε μια περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' αμετάφραστο άκρο, η οποία περιείχε 7 AUG κωδικόνια έναρξης. Έτσι, προέκυψε το συμπέρασμα, ότι τα ριβοσώματα, δεν διατρέχουν την 5-NTR, αντιθέτως συνδέονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή προωθεί την εσωτερική δέσμευση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας και ονομάζεται θέση εισόδου του ριβοσώματος IRES(Internal Ribosome Entry Site) (21).



Εικόνα 1.4.3: Δομή IRES των εντεροϊών (22).

Οι πρωτεΐνες των εντεροϊών συντίθενται, από τη μετάφραση ενός μοναδικού και μεγάλου ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης ORF, το οποίο κωδικοποιείται από τον

θετικής πολικότητας κλώνο RNA. Ακολουθεί, τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης απο πρωτεΐνάσες που κωδικοποιούνται απο το ιικό γονιδίωμα. Αυτός ο μηχανισμός, επιτρέπει τη σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων, απο ένα μοναδικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη του ιού δεν παρατηρείται στα μολυσμένα κύτταρα, επειδή επεξεργάζεται κατά τη διάρκεια της σύνθεσής της. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη επεξεργάζεται συμμεταφραστικά, απο ενδομοριακές αντιδράσεις που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί και οι οποίοι ακολουθούνται απο δευτερογενείς cis ή trans επεξεργασίες. Το γονιδίωμα των εντεροϊών κωδικοποιεί για τις πρωτεάσες 2A_{pro} και 3C_{pro}/3CD_{pro} (21).



Εικόνα 1.4.4: Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης των

Τόσο η 3C_{pro}, όσο και η 2A_{pro}, είναι ενεργές στο πολυπεπίδιο κατά τη διάρκεια σύνθεσής του και εν συνεχεία απελευθερώνονται με αυτοκατάλυση. Αφού ελευθερωθούν, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη in trans. Σε μολυσμένα κύτταρα με εντεροϊό, το αρχικό γεγονός είναι η απελευθέρωση της πρόδρομης P1 απο την P2-P3 που συντίθεται απο την 2A_{pro}. Έπειτα, η 3CD_{pro} απελευθερώνεται απο την πρόδρομο P3, μέσω αυτοκαταλυτικού τεμαχισμού. Αυτή η πρωτεΐνωση, η οποία περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ιικής RNA πολυμεράσης, πραγματοποιεί δευτερογενείς τεμαχισμούς στα διπεπίδια γλουταμικού-γλυκίνης, στον πολιοϊό P1, πολύ πιο αποτελεσματικά απο την 3C_{pro}.

Τόσο η 3Cpro όσο και η 3CDpro, επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P1 και P2 περιοχών, με την ίδια αποτελεσματικότητα. Ένα πλεονέκτημα αυτού του μηχανισμού είναι ότι, η έκφραση μπορεί να ρυθμιστεί, μέσω του ρυθμού και του εύρους που λαμβάνει η πρωτεολυτική επεξεργασία. Σε μια αλληλουχία διάσπασης που συμβαίνει in-trans από την 3Cpro, οι μη δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3Cpro, 3Dpro αλλά και οι καψιδιακές πρωτεΐνες, VP0, VP1, VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες δομές τους. Το τελικό στάδιο της διαδικασίας λαμβάνει χώρα κατά την ωρίμανση, όταν η VP0 αποκόβεται για να σχηματίσει τις VP4 και VP2 (21).

III. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος.

Η αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, ξεκινάει μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο και λαμβάνει χώρα σε μεμβρανικές δομές που ο σχηματισμός τους επάγεται από τον ιό και ονομάζονται αντιγραφικά σύμπλοκα. Αυτά τα σύμπλοκα αντιγραφής, αποτελούνται τόσο από ιικές όσο και από κατάλληλα διαμορφωμένες κυτταρικές πρωτεΐνες, αλλά και από ιικό RNA. Οι ιικές αυτές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύμπλοκο κωδικοποιούνται από τις P1 και P2 περιοχές του ιικού γονιδιώματος, όπως δηλαδή η 3Dpro-RNA-εξαρτώμενη-RNA πολυμεράση, η 2Ccatpase, 3A, 3B, οι πρόδρομες πρωτεΐνες 2BC, 2AB, και όσο αφορά κυτταρικές πρωτεΐνες, παράδειγμα αποτελεί η PCBP2 και η κινάση PI4KB (22-23). Η 5' τελική cloverleaf δομή (5' CL), που βρίσκεται στην 5'NTR του ιού, είναι ένα cis-δραστικό στοιχείο που είναι απαραίτητο για την αντιγραφή του RNA. Η 5'CL, περιέχει υψηλά ποσοστά συντήρησης ανάμεσα στους εντεροϊούς και οργανώνεται σε δομές βρόγχου-θηλιάς. Η κυτταρική πρωτεΐνη PCBP μάλιστα, που συμμετέχει στο αντιγραφικό σύμπλοκο, συνδέεται σε μια από αυτές τις δομές του 5'CL (24). Η cre περιοχή, είναι επίσης cis δραστική δομή που συμμετέχει στο σύμπλοκο και προσδένει την 3Dpro και τη VPg

Τα αντιγραφικά σύμπλοκα, περικλείονται σε κυστίδια που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (25). Οι ιικές πρωτεΐνες 2C και 3AB, μεταφέρουν το αντιγραφικό σύμπλοκο στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB πρωτεΐνη, είναι υδρόφοβη

και επάγει την μεταφορά της εκκινητικής πρωτεΐνης VPg στη μεμβράνη για να αρχίσει η σύνθεση του RNA. Η πρωτεΐνη 3AB, προσδένει την 3Dpol και 3CDpro και έτσι αγκυροβολεί το σύμπλοκο της αντιγραφής στη μεμβράνη. Η 2C πρωτεΐνη, περιλαμβάνει μια δομή RNA σύνδεσης, η οποία εξίσου αγκυροβολεί το ιικό RNA στη μεμβράνη κατά την αντιγραφή (15).

Προκειμένου να αντιγραφεί ο ιός, το ιικό RNA αρχικά μετατρέπεται στον αρνητικό κλώνο, οποίος αποτελεί μήτρα για τη σύνθεση πολλαπλών αντιγράφων θετικής πολικότητας RNA, τα οποία είναι πανομοιότυπα με το ιικό RNA που εξ αρχής προκάλεσε τη μόλυνση (26). Συγκεκριμένα, αφού το (+) RNA χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου (-) RNA, αυτοί οι δυο κλώνοι παραμένουν συνδεδεμένοι σε ένα dsRNA που αποτελεί και το αντιγραφικό ενδιάμεσο. Στη συνέχεια, το (-) RNA του ενδιάμεσου χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση (+) RNA κλώνων. Ο νεοσυντιθέμενος θετικός κλώνος που προήλθε από το αντιγραφικό ενδιάμεσο, εκτοπίζει τον ήδη προυπάρχοντα θετικό κλώνο και απελευθερώνεται ως dsRNA προϊόν, το οποίο ανακυκλώνεται για να παράξει εκ νέου αντίγραφα θετικών κλώνων. Αυτή είναι μια ασύμμετρη διαδικασία καθώς τελικά, ο ιός ρυθμίζει τη σύνθεση του RNA με τέτοιο τρόπο ώστε οι θετικής πολικότητας κλώνοι να είναι 30 με 50 φορές περισσότεροι από τους αρνητικούς κλώνους RNA (27).

Η αντιγραφή του ιικού γενώματος πραγματοποιείται από την ιική RNA-εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση. Η πρωτεΐνη αυτή παράγεται από τον τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης, 3CDpro, η οποία έχει υψηλή δραστικότητα πρωτεϊνάσης, προσδένει το cre, αλλά δεν έχει δραστικότητα πολυμεράσης. Η 3Dpol είναι ένα εξαρτώμενο από εκκινητή ένζυμο, το οποίο δε μπορεί να ξεκινήσει την αντιγραφή του ιού χωρίς ένα ολιγο(U). Το ρόλο του εκκινητικού μορίου για την 3Dpol, διαδραματίζει η πρωτεΐνη VPg, η οποία είναι τόσο συνδεδεμένη στο ιικό γονιδίωμα, όσο και στο 5' άκρο των νεοσυντιθέμενων θετικών κλώνων. Η θεωρία αυτή ενισχύθηκε από το γεγονός, ότι εξίσου η VPg και η ουριδιλιωμένη της μορφή βρίσκονται στα μολυσμένα κύτταρα από τον ιό. Αρχικά, η VPg ουριδιλιώνεται με μια διαδικασία εξαρτώμενη από υπόστρωμα, όπου γίνεται χρήση μιας μικρής δομής stem-loop, γνωστή ως στοιχείο cre (29 -22).

Συμπερασματικά, το ιικό RNA έχει διπλό ρόλο, αφού εκτός από τη λειτουργία του ως mRNA και την έκφραση των ιικών πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται και ως μήτρα για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση πολλαπλών αντιγράφων θετικής πολικότητας RNA. Υπάρχει η πεποίθηση, πως είναι υπαρκτός ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων και την μετάφραση του θετικού κλώνου. Σημαντικό ρόλο σε αυτόν τον μηχανισμό προτίμησης υποστρώματος, πιστεύεται ότι παίζει η cloverleaf-like δομή στο 5'-NTR του ιικού γονιδιώματος. Έχει προταθεί ότι, η σύνδεση της κυτταρικής πρωτεΐνης PCBP σε αυτή την cloverleaf δομή, μπορεί να αποτρέπει τη μετάφραση και είναι σημαντική για τη μετάβαση από τη μετάφραση στην σύνθεση του αρνητικού κλώνου. Έτσι το 5' cloverleaf φαίνεται να είναι ένα πολυλειτουργικό cis-δραστικό στοιχείο που ρυθμίζει τη σταθερότητα του RNA, τη μετάφραση και την αντιγραφή του (29).

IV. Καψιδίωση του ιού και απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιοσωματίων

Κατά τη σύνθεση της P1 πρόδρομης καψιδιακής πρωτεΐνης, σχηματίζονται οι κεντρικές δομές β-βαρελίου και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των επιφανειών αυτών των δομών, οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών υπομονάδων. Από τη στιγμή που η P1 απελευθερώνεται από την 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί μεταξύ των VP0-VP3 και VP3-VP1, κόβονται από την 3CDpro πρωτεΐνάση. Αυτές οι θέσεις τεμαχισμού, βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β-βαρελίων. Στο ώριμο καψίδιο των ιών, το καρβοξυτελικό άκρο των VP1,VP2,VP3 βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια, ενώ το αμινοτελικό στη εσωτερική επιφάνεια του καψιδίου, όπου συμμετέχει σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Από την επεξεργασία προκύπτει το 5S πρωτομερές, δηλαδή μια ανώριμη δομική υπομονάδα που περιέχει ένα αντίγραφο από τις VP0,VP3,VP1. Έπειτα, 5 πρωτομερή συνδυάζονται και σχηματίζουν ένα πενταμερές. Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας αποτελεί ο τεμαχισμός της VP0 σε VP4+ VP2 από μια πρωτεάση που δεν έχει ταυτοποιηθεί. Ο δεσμός του VP0 βρίσκεται στο εσωτερικό

των άδειων καψιδίων των ώριμων ιοσωματίων και δεν είναι προσβάσιμος σε ιικές και κυτταρικές πρωτεάσες (21)

Η καψιδίωση των ρικογναίων είναι μια πολυ εξειδικευμένη διαδικασία, η οποία οδηγεί στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων του RNA και όχι των αρνητικών κλώνων ή οποιωνδήποτε άλλων κυτταρικών RNA. Η VPg, πιθανώς να μην αποτελεί σήμα καψιδίωσης, λόγω του ότι το αρνητικού κλώνου RNA που περιέχει αυτή τη δομή, δεν πακετάρεται στα καψίδια (21).

Τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής ενός εντεροϊού που έχει εγκαθιδρύσει τη μόλυνση του στο κύτταρο, είναι η απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιοσωματίων μέσω λύσης του κυττάρου.

1.6 Παθογένεια εντεροϊών

Οι εντεροϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο, μεταδίδονται μέσω της στοματικής οδού και των αναπνευστικών σταγονιδίων, οπότε ο ιός αναγκάζεται να περάσει διαμέσου του φαρυγγικού και γαστρεντερικού τοιχώματος, το οποίο αποτελείται κυρίως από επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία αποτελούν φραγμό στην εισβολή από ιούς, και στη συνέχεια εισέρχεται στα λεμφικά όργανα. Ο εντεροϊός έπειτα εισέρχεται στο αίμα (αιμιά) και μπορεί να αποκτήσει πρόσβαση σε όλους τους ιστούς. Για παράδειγμα ο πολιοϊός, μπορεί να περάσει μέσω της κυκλοφορίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα, διαπερνώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Οι εντεροϊοί μπορούν να απομονωθούν τόσο από το ανώτερο, όσο και από το κατώτερο πεπτικό σύστημα και έχουν απομονωθεί από τα κόπρανα και από φαρυγγικά επιχρίσματα, ενώ σε μερικές περιπτώσεις έχουν βρεθεί στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στον νωτιαίο μυελό, στην καρδιά, σε δερματικές πληγές, ακόμα στον επιπεφυκότα του ματιού. Η εκδήλωση της ασθένειας αρχίζει περίπου μια βδομάδα από την είσοδο του ιού στον ξενιστή. Οι κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών μπορεί να είναι ασυμπτωματικές, αλλά μπορεί και να εμφανίζουν σοβαρά συμπτώματα όπως αυτά της εγκεφαλοπάθειας, μυοκαρδίτιδας, παγκρεατίτιδας και ήπιας παράλυσης. Το πόσο έντονα θα εκφραστούν ή όχι τα συμπτώματα εξαρτάται

σε μεγάλο βαθμό απο την ηλικία και τον ανοσιακό επίπεδο του ασθενούς (30). Η κλινική εικόνα και έκβαση του ασθενούς εξαρτάται τόσο απο την ηλικία, όσο και απο το ανοσιακό επίπεδο του ασθενούς.

1.7 Μηχανισμοί εξέλιξης εντεροϊών

Η μεγάλη γενετική διαφοροποίηση που παρατηρείται ανάμεσα στα διάφορα μέλη των εντεροϊών, οφείλεται σε 2 μηχανισμούς που οδήγησαν στην εξέλιξη των ιών αυτών. Α) Μεταλλάξεις και Β) Ανασυνδυασμοί.

A. Μεταλλάξεις:

Όπως όλοι οι RNA ιοί, έτσι και οι εντεροϊοί εμφανίζουν πολύ υψηλούς ρυθμούς λαθών, κατά τη διαδικασία επιμήκυνσης της αλυσίδας λόγω της επιρρεπούς σε λάθη RNA πολυμεράσης. Έτσι η συχνότητα λαθών της ιικής πολυμεράσης ανέρχεται στο 1 λανθασμένο νουκλεοτίδιο ανά 10^3 με 10^4 νουκλεοτίδια. Επιπλέον η ιική RNA πολυμεράση διαθέτει δραστηριότητα 3'-5' εξωνουκλεάσης, που συνήθως βρίσκεται στις DNA-πολυμεράσες. Η δραστηριότητα εξωνουκλεάσης συμβάλλει στην αγνώριση και αποκοπή λανθασμένων εισερχόμενων νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο της επεκτεινόμενης αλυσίδας, ιδιότητα που δεν διαθέτει η ιική RNA πολυμεράση. Έτσι οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί απουσιάζουν κατά την ιική αντιγραφή (31). Οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι οι σημειακές μεταλλάξεις που συμβαίνουν, όπως μεταπτώσεις όπου έχουμε αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη (80% των παρατηρούμενων μεταλλάξεων), καθώς και οι μεταπτώσεις, δηλαδή αντικατάσταση πουρίνης από πυριμιδίνης και το αντίστροφο (το 20% των μεταλλάξεων) (32). Η υποκατάσταση αδενίνης Α σε G είναι η πιο συχνή υποκατάσταση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος των εντεροϊών εξελίσσονται με διαφορετικό ρυθμό. Οι δομικές περιοχές VP1, VP2, VP3 είναι οι πιο ευμετάβλητες περιοχές και συσσωρεύουν μεγάλο αριθμό νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων. Χάρη αυτού ο ιός μπορεί και διαφεύγει των ανοσιακών αποκρίσεων του ξενιστή. Ωστόσο, περιορισμοί στις μεταλλάξεις δομικών περιοχών, έγκεινται στο γεγονός ότι συγκεκριμένες δομικές περιοχές, π.χ του καψιδίου, πρέπει να διατηρούνται σταθερές αφού αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες περιοχές αναγνώρισης κυτταρικών υποδοχέων. Συμπερασματικά, το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελεί

μια συμβίωση γονιδίων, όπου οι δομικές και οι λειτουργικές περιοχές εξελίσσονται ανεξάρτητα (33).

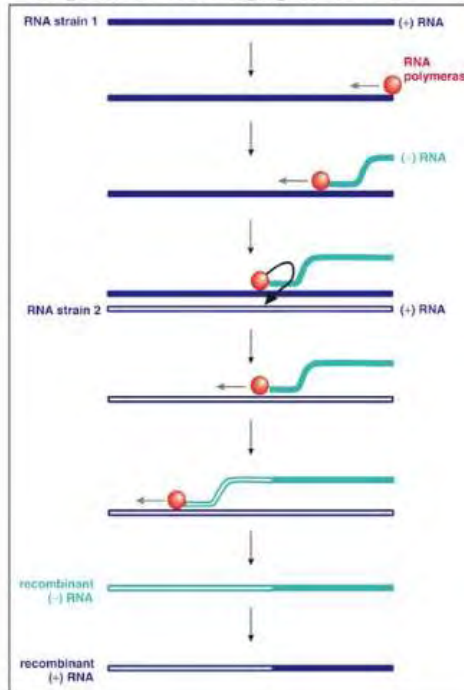
B. Ανασυνδυασμοί

Η δεύτερη δύναμη που κατευθύνει την εξέλιξη των εντεροϊών είναι ο ανασυνδυασμός. Ανασυνδυασμός είναι μια μοριακή διαδικασία κατά την οποία, γενωμικές αλληλουχίες που ανήκουν σε διαφορετικούς RNA κλώνους, συνδυάζονται σε ένα μοναδικό γονιδίωμα. Έτσι, μεταφέρεται ένας αριθμός ιδιοτήτων σε έναν ιό από ένα μοναδικό γεγονός (34)

Ο ανασυνδυασμός, είναι εξαιρετικά βοηθητικός στην εξέλιξη των εντεροϊών, καθώς ευνοεί την εγκαθίδρυση ωφέλιμων μεταλλάξεων στο γονιδίωμα, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων ιικών στελεχών που είναι καλύτερα προσαρμοσμένα και μπορούν να αντιστέκονται στην περιβαλλοντική εξελικτική πίεση. Επιπλέον, μπορεί να εξαλείφει δυσμενείς μεταλλάξεις που δημιουργούνται κατά την ιική αντιγραφή. Συμπερασματικά, ο ανασυνδυασμός του RNA αποτελεί πολύ πιο αποτελεσματικό μηχανισμό στην εξέλιξη των εντεροϊών απ' ό,τι οι σημειακές μεταλλάξεις. Διαφορετικοί τύποι ανασυνδυασμών αναγνωρίζονται και βασίζονται στη δομή της θέσης crossover (35). Ανασυνδυασμός συμβαίνει μόνο όταν τουλάχιστον 2 ιικά γονιδιώματα έχουν προσβάλλει το ίδιο κύτταρο-ξενιστή. Επιπλέον, ανασυνδυασμός μπορεί να επιτευχθεί τόσο ανάμεσα σε εντεροϊούς διαφορετικού οροτύπου (36), όσο και σε διαφορετικά στελέχη του ίδιου.

Τον κύριο μηχανισμό ανασυνδυασμού στους εντεροϊούς αποτελεί ο αντιγραφικός μηχανισμός ή μηχανισμός αλλαγής μήτρας, όπου η αλλαγή RNA κλώνου από την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση συμβαίνει, κατά την αντιγραφική διαδικασία σύνθεσης του αρνητικού κλώνου RNA. Καθώς το ένζυμο αυτό, έχει ξεκινήσει να αντιγράφει τον θετικό κλώνο-μήτρα του RNA, ξεκινώντας από το 3' άκρο, κάποια στιγμή σταματάει, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται σε 2 λόγους. i) συναντά κάποιο λάθος ενσωματωμένο νουκλεοτίδιο (37), ii) συναντά μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας ως εμπόδιο (38). Ύστερα, η RNA-εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση, μαζί με τον μέχρι τότε νεοσυντιθέμενο κλώνο, απομακρύνεται και μεταπηδά σε άλλο θετικό κλώνο, τον οποίο θα χρησιμοποιήσει ως εκμαγείο για τη

Template switching: polio virus]



Εικόνα 1.4.4:Μηχανισμός αλλαγής μήτρας.

σύνθεση νέου αρνητικού κλώνου RNA. Κατά αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται ένα χμαιρικό μόριο. Υπάρχουν 2 τύποι ανασυνδυασμών αλλαγής μήτρας: α) ο ομόλογος ανασυνδυασμός που γίνεται στην ίδια θέση στους 2 μητρικούς κλώνους και δεν παρατηρείται κάποιο έλλειμμα ή ένθεση στη θέση ανασυνδυασμού (38) και β) ο μη ομόλογος ανασυνδυασμός, όπου γίνεται μεταξύ διαφορετικών θέσεων και έχει ως αποτέλεσμα ελλείμματα ή διπλασιασμούς των ομόλογων μητρικών κλώνων σε κάθε πλευρά της θέσης ανασυνδυασμού (39). Τέλος, ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου, καθώς όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω η συγκέντρωση των θετικών κλώνων είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των αρνητικών και παράλληλα μέσα στο κύτταρο οι κλώνοι RNA βρίσκονται σε δίκλωνη μορφή (dsRNA) οπότε δε μπορούν να συμμετάσχουν στο μηχανισμό αυτό.

Ένα εναλλακτικό μοντέλο ανασυνδυασμού αποτελεί ο μη αντιγραφικός ανασυνδυασμός, ο οποίος όπως υποδηλώνει και το όνομά του είναι τελείως διαφορετικός από τον αντιγραφικό. Συνοπτικά, σε αυτό το μηχανισμό οι δύο μητρικοί κλώνοι RNA διασπώνται και στη συνέχεια το 5' άκρο του ενός συνδέεται με το 3' του άλλου (40).

1.8 Επιδημιολογία

Η επιδημιολογία των ασθενειών στοχεύει στην διερεύνηση της κατανομής και των αιτιολογικών παραγόντων ασθενειών, με σκοπό την πρόληψη και τον αποτελεσματικό έλεγχό τους. Εισάγοντας τη μοριακή επιδημιολογία στην προσπάθεια αυτή, με τη μελέτη των μοριακών παραλλαγών των ιικών πρωτεϊνών ή

νουκλειϊκών οξέων, μπορεί να συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση των ιογενών ασθενειών. Αναφορικά με τους εντεροϊούς, οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν βοηθήσει τόσο στην ανακάλυψη των πηγών από τις οποίες προέρχονται τα κρούσματα των ασθενειών που προκαλούνται από αυτούς, αλλά και τα μοτίβα μετάδοσης τους. Επιπλέον, παρέχονται πληροφορίες για την ταυτοποίηση στελεχών, αλλά και για την ταξινόμησή τους.

Βασικό εργαλείο για τις επιδημιολογικές μελέτες των εντεροϊών αποτελεί η αλληλούχιση του γονιδιώματος, η οποία όταν εφαρμόζεται σε απομονώσεις ασθενών από όλο τον κόσμο, διαδραματίζει βασικό ρόλο στην εύρεση του στελέχους που προκάλεσε την έξαρση της ασθένειας σε μια χώρα και άρα στις περαιτέρω προσπάθειες για την αντιμετώπιση της (41).

Σε μελέτες για τους πολϊοϊούς η αλληλούχιση έχει χρησιμοποιηθεί για να διακρίνει τις απομονώσεις εμβολιοπροερχόμενων ιών, από τα στελέχη αγρίου τύπου, για να ανακαλύψει το πρότυπο μετάδοσης διαφορετικών αγρίων τύπου στελεχών (42), για να ταυτοποιήσει εμβολιακά στελέχη και για να εκτιμήσει τον αριθμό και τη συμβολή των μεταλλάξεων σε εξασθενημένα και μη στελέχη. Επιπρόσθετα, παρέχει πληροφορίες για την ποσοτική εκτίμηση του βαθμού της διαφοροποίησης της αλληλουχίας (43).

Όσον αφορά επιδημιολογικές μελέτες στους non-polio ιούς, όπως οι Coxsackie A και B, αυτές επικεντρώθηκαν στην εξελικτική συμβολή που προήλθε από σύγκριση των ιικών απομονώσεων μέσα σε έναν ορότυπο ανα το χρόνο, αλλά και ανάμεσα σε διαφορετικά γένη των Picorna ιών. Οι παραπάνω εντεροϊοί αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες της άσηπτης μηνιγγίτιδας και εγκεφαλίτιδας, και είναι πιο συχνό φαινόμενο να προσβάλλουν νεαρά παιδιά ηλικίας 5-14. Οι περισσότερες μολύνσεις συμβαίνουν κατά την παιδική ηλικία και τα παιδιά αποτελούν τους φορείς μετάδοσης ανάμεσα στο κοντινό τους περιβάλλον. Επιπλέον, ένας άλλος παράγοντας της έξαρσης των ασθενειών αυτών, είναι η εποχή και η γεωγραφική περιοχή καθώς, απομονώσεις εντεροϊών βρίσκονται συνήθως σε εύκρατα κλίματα κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και γενικά έχουν ένα μοναδικό εποχικό μοτίβο μετάδοσης που ποικίλει ανάλογα την γεωγραφική περιοχή (15).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας, ήταν η ανάπτυξη μιας τεχνικής για τη γρήγορη και εύκολη ανίχνευση των εντεροϊών της ομάδας B και C με άμεση οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, μέσω μιας καινοτόμου ισοθερμικής μεθόδου Colorimetric Loop mediated amplification (LAMP).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πρότυπα και Κλινικά Δείγματα:

A. Προκειμένου, να βρεθούν τόσο οι βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής όσο και να ελεγχθεί η εξειδίκευση της συγκεκριμένης τεχνικής, χρησιμοποιήθηκαν 25 πρότυπα δείγματα απο τις ομάδες Β, C αλλά και 3 πρότυπα απο τις ομάδες Α και D των εντεροϊών που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Είδος	Δείγμα	Στέλεχος	Αριθμός Καταχώρησης GENBANK
EV-A	E71	Brcr	U22521
EV-B	E3	Morrisey	AY302553
	E4	Pesacek	AY302557
	E6	D'Amori	AY036558
	E7	Wallace	AY302579
	E11	Gregory/Ohio	X80059
	E12	Travis	X79047
	E14	Tow	AY302540
	E30	Bastianni	0AF081340
	CBV1	Japan	M16560
	CBV2	Ohio-1	AF081312
	CBV4	Benschoten	X05690
	CBV3	Nancy	M33854
	CBV5	Faulkner	AF114383

Είδος	Δείγμα	Στέλεχος	Αριθμός Καταχώρησης GENBANK
EV-C	PV1	Sabin	V01150
	CAV1	Tompkins	AF499635
	CAV11	Belgium 1	AF499636
	CAV13	Flores	AF499637
	CAV15	G-9	AF499638
	CAV17	G-12	AF499639
	CAV20	IH-35	AF499642
	CAV21	Kuykendall	AF546702
	CAV24		
	EV-D	EV68	Fermon
EV70		J70/71*Japan/71	D00820

Πίνακας 3.1.1: Πίνακας των προτύπων στελεχών με αναφορά στο είδος, τον ορότυπο, το στέλεχος και τον αριθμό καταχώρησης.

B. Για την επαλήθευση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν 9 κλινικά δείγματα της ομάδας Β των εντεροϊών.

Δείγμα	Στέλεχος	Αριθμός Καταχώρησης GENBANK
Boud	E6	AY754947, AY697449
Han	E30	AY500185, AY697438
Tsag	E13	AY500184, AY518355
Himon	E6	AY612084, AY697446
Kras	E6	AY534970, AY697456
Gior	E30	AY500187, AY514868
645/G	CBV5	(44)
Pap	E6	AY612083, AY697444
121/82	E9	AY500196, AY518352

Πίνακας 3.1.1: Πίνακας των κλινικών δειγμάτων και ο αριθμός καταχώρησης τους.

3.2 Εκχύλιση RNA

Προκειμένου να απομονωθεί το γενετικό υλικό (RNA), χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Casas (45) σύμφωνα με το οποίο γίνεται χρήση της θειοκυανιούχου γουανιδίνης, χωρίς την προσθήκη οργανικών διαλυτών.

Αρχικά, σε eppendorfs των 2 ml, προστέθηκαν 10 ml γλυκογόνου, ενός θετικά φορτισμένου πολυσακχαρίτη, με σκοπό τη δέσμευση των αρνητικά φορτισμένων μορίων (DNA, RNA και μερικές πρωτεΐνες), το οποίο ήταν αποθηκευμένο στους -20 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 300 ml Lysis Buffer, που περιείχε GuSN με σκοπό την λύση των κυττάρων και την προστασία του δείγματος από νουκλεάσες, και 100 ml δείγματος. Ακολούθησε καλό Vortex, ώστε να αναδευτεί το μείγμα και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την πρώτη επώαση, προστέθηκαν 400 ml παγωμένης ισοπροπυλικής αλκοόλης, η οποία είχε ψυχθεί στους -20 °C, έγινε Vortex και επώαση για 20 λεπτά στην κατάψυξη. Αφού πραγματοποιηθήκε η επώαση αυτή, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C στα 14.000 rpm και το υπερκείμενο που προέκυψε απορρίφθηκε προσεκτικά, ώστε να

μείνει μόνο το σχηματιζόμενο ίζημα. Σε αυτό προστέθηκαν 500 μl αιθανόλης, περιεκτικότητας 70%, έγινε Vortex και άλλη μια φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C στα 14.000 rpm. Τέλος το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκαν 100 μl dd H₂O και ακολούθησε Vortex με σκοπό την επαναδιαλυτοποίηση του. Τα εκχυλισμένα RNA αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -20 °C για μετέπειτα χρήση.

3.3 Σχεδιασμός εκκινητικών μορίων.

Για τη συγκεκριμένη εργασία, σχεδιάστηκαν 3 ζεύγη εκκινητών πάνω στην 5' UTR του γονιδιώματος των εντεροϊών με το πρόγραμμα Primer Explorer V5. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Θέση
F3	ACGGGACGCTAGTTGTGA	393-410
B3	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	580-599
FIP	ATTAGCCGCATTCAGGGGCC- ACAGGGTGTGAAGAGCCTAT	411-471
BIP	TGTCGTAACGCGCAAGTCCG- GAAACACGGACACCCAAAGT	512-565
LoopF	GGATTCTTATGTAGCCTC	429-44
LoopB	TGGCGGAACCGACT	529-542

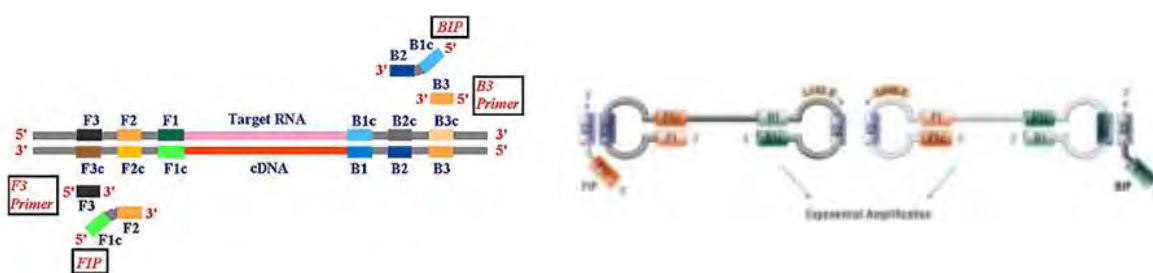
Πίνακας 3.3.1: Αλληλουχία και θέση εκκινητών LAMP.

3.4 LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)

Η LAMP είναι μια μέθοδος, που χρησιμοποιείται για τη γρήγορη, υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης ανίχνευση του DNA, κάτω από ισοθερμικές συνθήκες. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί 2 ή 3 ζεύγη εκκινητικών μορίων που αναγνωρίζουν 6 διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος. Ένας εσωτερικός εκκινητής, περιέχει αλληλουχίες του αντινοσηματικού κλώνου του DNA και ξεκινάει την αντίδραση. Η

ακόλουθη εκτόπιση κλώνου του DNA γίνεται με τη βοήθεια ενός εξωτερικού εκκινητή και έτσι απελευθερώνεται ένα μονόκλωνο DNA. Αυτό, χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τη σύνθεση που ξεκινάει από τον δεύτερο εσωτερικό και εξωτερικό εκκινητή που υβριδίζονται στο άλλο άκρο του στόχου. Τελικό αποτέλεσμα αποτελεί ο σχηματισμός δομής θηλιάς του DNA (46).

I. Εκκινητές



Εικόνα 3.4.1: Σχηματική απεικόνιση των δομών και θέσεων των F3,B3,FIP,BIP (αριστερά) και των LoopF,LoopB μετά το σχηματισμό δομής θηλιάς δεξιά.

http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/rt_index.html

<https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification>

Η συγκεκριμένη τεχνική πραγματοποιήθηκε με τη χρήση τριών ζευγών εκκινητικών μορίων. Αυτά ήταν οι:

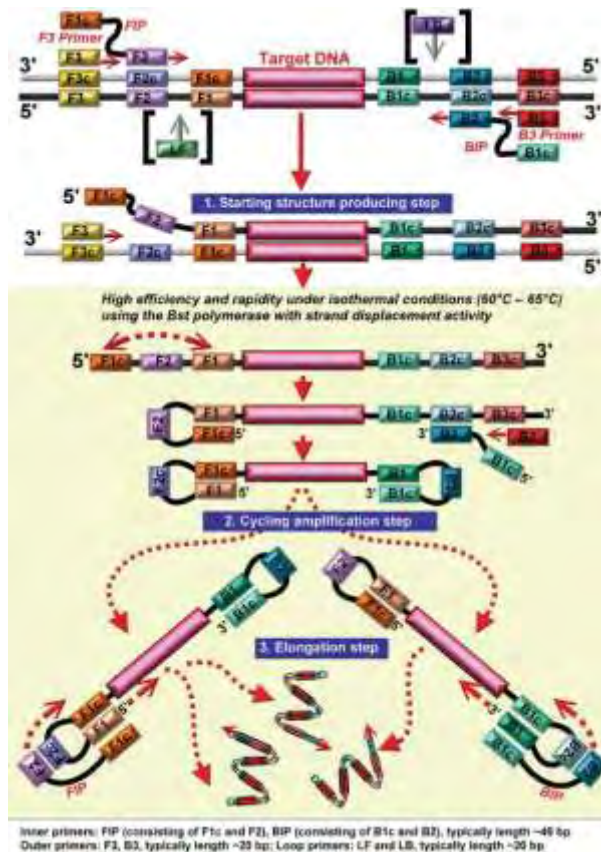
F3/B3: οι οποίοι είναι εξωτερικοί εκκινητές και συγκεκριμένα ο F3(forward) είναι συμπληρωματικός με την F3c περιοχή, ενώ ο B3(backward) με την B3c περιοχή.

FIP/BIP: οι οποίοι είναι εσωτερικοί σύνθετοι εκκινητές, με τον FIP(forward) να αποτελείται από την περιοχή F1c στο 5' άκρο του και από την F2 στο 3' άκρο του και τον BIP από την περιοχή B1c στο 5' άκρο και την B2 στο 3' άκρο του.

LoopF/LoopB: οι οποίοι διαθέτουν συμπληρωματικές αλληλουχίες ως προς τις δομές θηλιάς που δημιουργούνται μετά την ενίσχυση από τα δύο προηγούμενα εκκινητικά ζεύγη. Συγκεκριμένα ο LoopF είναι συμπληρωματικός μεταξύ των F1 και F2 περιοχών, ενώ ο LoopB μεταξύ των B1 και B2 περιοχών.

II. Μηχανισμός αντίδρασης

Όσον αφορά τη διαδικασία ενίσχυσης μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου, αρχικά ο εσωτερικός εκκνητής FIP προσδένεται στην F2c περιοχή στην αλληλουχία στόχο και αρχίζει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλληλουχίας. Στη συνέχεια προσδένεται ο εξωτερικός εκκνητής F3 στην F3c συμπληρωματική περιοχή και με τη βοήθεια της πολυμεράσης (Bst 2.0 στη συγκεκριμένη εργασία), η οποία παράλληλα έχει ενεργότητα εκτόπισης κλώνου, αρχίζει να συντίθεται ο νέος κλώνος. Ο προηγούμενος νεοσυντιθέμενος κλώνος εκτοπίζεται και σχηματίζει μια δομή στην οποία είναι εν μέρη μονόκλωνος, ενώ στο ένα του άκρο έχει σχηματίσει δομή θηλιάς, λόγω μιας ανάστροφης συμπληρωματικής αλληλουχίας (οι F1 και F1c είναι συμπληρωματικές). Σε αυτόν τον κλώνο πάλι, προσδένεται ο εσωτερικός εκκνητής BIP στην B2c συμπληρωματική περιοχή, αλλά στο άλλο άκρο όπου δεν έχει δημιουργηθεί ακόμη δομή-θηλιά. Έτσι λαμβάνει χώρα μια παρόμοια διαδικασία, με τον BIP να αρχίζει τη σύνθεση συμπληρωματικής αλληλουχίας και τον B3 να προσδένεται στη συνέχεια εξωτερικά και με τη βοήθεια της Bst 2.0 πολυμεράσης να εκτοπίζει τον προηγούμενο κλώνο και να δημιουργεί ένα δίκλωνο DNA. Με αυτόν τον τρόπο ο εκτοπισμένος κλώνος καταλήγει να διαθέτει 2 συμπληρωματικές αλληλουχίες με δομή θηλιά στα 2 του άκρα και αποτελεί βασική δομή ενίσχυσης στην LAMP. Στη συνέχεια οι δομές θηλιάς αποτελούν στόχο για περαιτέρω ενίσχυση από τους LoopF και LoopB εκκνητές, διαδικασία στην οποία συμμετέχουν και οι FIP και BIP εκκνητές. Έτσι, σχηματίζονται πολλά και διαφορετικά αλυσομερή με ποικίλες δομές και διαφορετικό μήκος.



Εικόνα 3.4.1: Τα στάδια ενίσχυσης της αντίδρασης LAMP, με τις θέσεις υβριδισμού των εκκινητών, τη δομή θηλιάς και τα διαφορετικά προϊόντα που προκύπτουν (55)

3.5 Real time Colorimetric LAMP

Αρχικά, για να διαπιστώσουμε σε ποίο ακριβώς λεπτό αρχίζει και θετικοποιείται ο αρνητικός μάρτυρα που χρησιμοποιείται στη Colorimetric LAMP έπρεπε να διεξαχθεί Real Time Colorimetric LAMP για να γίνει γνωστό το λεπτό θετικοποίησης της αντίδρασης και αυτή να σταματά πριν το χρόνο θετικοποίησης του αρνητικού μάρτυρα ώστε να παρατηρείται χρωματική αλλαγή μόνο στα θετικά δείγματα. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR-Green, η οποία παρεμβάλλεται στα δίκλινα μόρια και φθορίζει στα 510 nm, η οποία προστέθηκε στο μείγμα της αντίδρασης της Colorimetric LAMP που περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα σε αντίδραση τελικού όγκου 20 μl. Οι συγκεντρώσεις των εκκινητών, της χρωστικής, του WarmStart Color Mix, του απιονισμένου νερού και του RNA αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση
F3	0,2 ρmol/μl
B3	0,2 ρmol/μl
Loop Ent1LF	0,4 ρmol/μl
Loop Ent-LB	0,4 ρmol/μl
FIP	1,6 ρmol/μl
BIP	1,6 ρmol/μl
SYBR-Green	1X
WarmStart Color Mix	1 X
ddH₂O	Μέχρι τα 20 μl
RNA	3μl

Πίνακας 3.6.1: Αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις τους.

Τα δείγματα επώασθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή για 60 λεπτά στους 65 °C.

3.6 Colorimetric LAMP (Loop mediated isothermal amplification)

Η Colorimetric LAMP αποτελεί μια παραλλαγμένη μορφή της κλασσικής LAMP τεχνικής, επιτρέποντας την άμεση οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ενίσχυσης, σε σύντομο χρονικό διάστημα και χωρίς την περαιτέρω ηλεκτροφόρηση των προϊόντων. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται με την αλλαγή χρώματος των θετικών και μόνο δειγμάτων, λόγω ενός δείκτη pH που είναι ενσωματωμένος στο μείγμα της αντίδρασης (δείκτης →ερυθρό της φαινόλης). Συγκεκριμένα, κατά την σύνθεση του προϊόντος, απελευθερώνονται H⁺ από την εισαγωγή κάθε φορά ενός dNTP. Έτσι, το pH του διαλύματος αλλάζει και απο βασικό διάλυμα γίνεται πιο όξινο. Αυτή η μείωση στο pH, ανιχνεύεται από το ερυθρό της φαινόλης και έτσι προκύπτει αλλαγή χρώματος από έντονο ροζ σε κίτρινο (47-48).

Η συγκεκριμένη τεχνική της colorimetric LAMP που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη, θα μπορούσε να θεωρηθεί μια RT-LAMP Colorimetric μέθοδος,

καθώς τα δείγματα RNA ενισχύθηκαν με την τεχνική αυτή, κατευθείαν χωρίς τη διαμεσολάβηση RT, ένα χρονοβόρο βήμα που χρειάζεται για την μετατροπή του RNA σε cDNA πριν την πραγματοποίηση της κλασσικής LAMP (49). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Bst 2.0 πολυμεράση που έχει ενεργότητα εκτόπισης κλώνου, είναι ευέλικτη σε διάφορες συνθήκες αντίδρασης και πιο θερμοσταθερή από την αγρίου τύπου BSt πολυμεράση. Εκτός από το ένζυμο αυτό, στο μείγμα της αντίδρασης υπάρχει και μια τροποποιημένη αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία πραγματοποιεί την αντίστροφη μεταγραφή του RNA, παράλληλα με την ενίσχυση του στόχου σε βέλτιστη θερμοκρασία 65 °C

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε tubes της PCR των 200 μl, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl, όπου υπήρχαν 3 μl RNA από κάθε δείγμα σε 17 μl μείγμα αντίδρασης, το οποίο περιείχε τους εκκινητές, απιονισμένο νερό και το WarmStart Color Mix 1X που περιείχε το ένζυμο Bst 2.0, την τροποποιημένη αντίστροφη μεταγραφάση και τον δείκτη αλλαγής pH ερυθρό της φαινόλης, σε τελικές συγκεντρώσεις που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση
F3	0,2 pmol/μl
B3	0,2 pmol/μl
Loop Ent1LF	0,4 pmol/μl
Loop Ent-LB	0,4 pmol/μl
FIP	1,6 pmol/μl
BIP	1,6 pmol/μl
WarmStart Color Mix	1 X
RNA	3 μl
ddH₂O	μέχρι τα 20 μl

Πίνακας 3.5.1: Αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις τους.

Στη συνέχεια τα tubes τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή (Primus 25/96) και επώαστηκαν για 50 λεπτά στους 65 °C.

3.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Colorimetric LAMP.

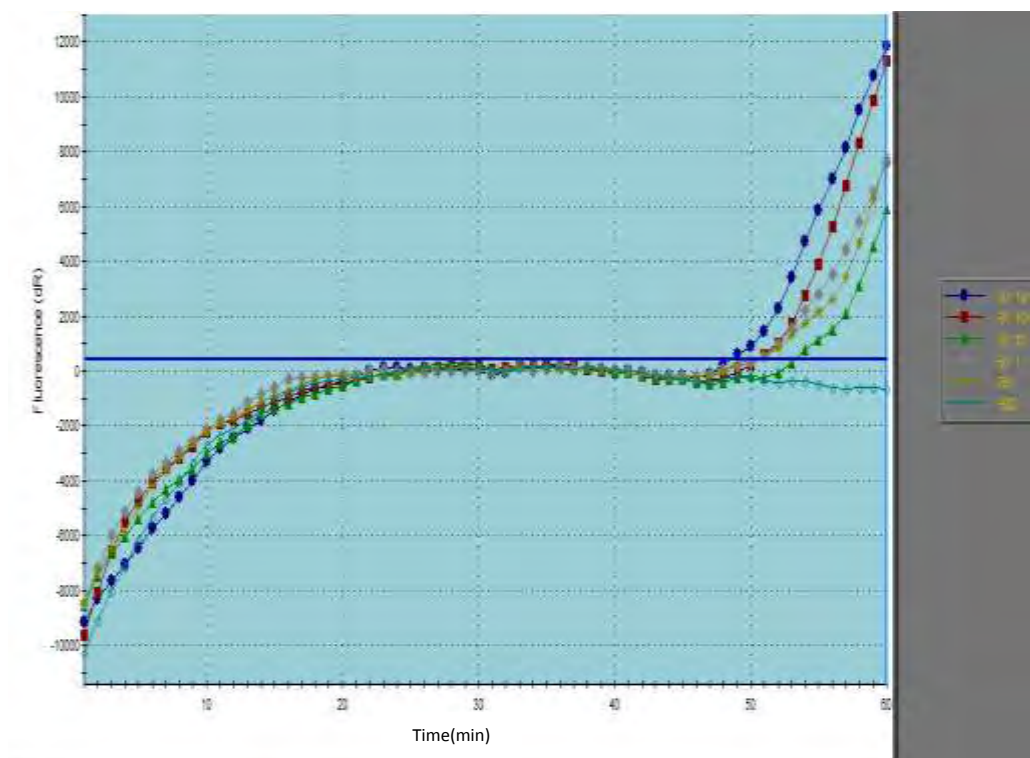
Προκειμένου, να γίνει επιβεβαίωση των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν απο την Colorimetric LAMP πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης. Συγκεκριμένα, κατά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα έχει περιεκτικότητα 2% και περιέχει 0,8 g αγαρόζης διαλυμένα σε 40 ml TBE (Tris- Boric acid-acid EDTA) που αναμειγνύονται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Έπειτα, η κωνική θερμάνθηκε στο φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτο, μέχρι να λιώσει η αγαρόζη. Το διάλυμα της κωνικής, αναδεύεται κυκλικά με γρήγορες κινήσεις για να πέσει η θερμοκρασία και να προστεθεί το βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλεται στο δίκλωνο DNA και βοηθά στην οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με υπεριώδη ακτινοβολία. Το μείγμα αυτό τοποθετήθηκε σε ειδικό tray, και έμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί. Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, 8 μl απο κάθε δείγμα, αναμείχθηκαν με 1-2 μl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και φορτώθηκε στα σχηματιζόμενα 'πηγαδάκια' στο πήκτωμα. Στην πρώτη θέση φορτώνεται μάρτυρας μοριακού βάρους ladder 100bp (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 120 V και το πήκτωμα φωτογραφήθηκε μέσω μιας συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία και παρατηρήθηκαν οι φωτεινές μπάντες (Foto/Phoresis I, Fotodyne).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα της Real Time Colorimetric LAMP σε Sabin1.

Όπως αναφέρθηκε και πριν, πραγματοποιήθηκε Real Time Colorimetric LAMP για τον προσδιορισμό του λεπτού θετικοποίησης των δειγμάτων, έτσι ώστε με βάση αυτά τα αποτελέσματα, να σταματήσουμε την αντίδραση σε τέτοιο χρόνο, που οι αρνητικοί μάρτυρες να μην θετικοποιούνται. Χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος Sabin 1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, καθώς και εκχύλισμα από κύτταρα Rd και H₂O ως αρνητικοί μάρτυρες.

Sabin 1 10 ³ TCID ₅₀	ΜΠΛΕ
Sabin 1 10 ² TCID ₅₀	ΚΟΚΚΙΝΟ
Sabin 1 10 TCID ₅₀	ΠΡΑΣΙΝΟ
Sabin 1 1 TCID ₅₀	ΓΚΡΙ
Rd	ΚΙΤΡΙΝΟ
H ₂ O	ΓΑΛΑΖΙΟ



Εικόνα 4.1: Αποτελέσματα Colorimetric Real-Time LAMP σε Sabin 1 διαφορετικών συγκεντρώσεων TCID₅₀. Συμπεριλήφθηκαν αρνητικοί μάρτυρες Rd και νερό.

Από την εικόνα που ανακτήθηκε από την παραπάνω Real Time, παρατηρούμε ότι τα κύτταρα Rd που είναι και ο αρνητικός μάρτυρας, αρχίζουν να θετικοποιούνται στο 50^ο λεπτό της αντίδρασης, ενώ το νερό φαίνεται να μην θετικοποιείται καθόλου. Συνεπώς, οι βέλτιστες συνθήκες για τη διεξαγωγή της Colorimetric LAMP, ώστε να ενισχύονται ειδικά μόνο τα θετικά δείγματα, είναι→

50 min επώαση στους 65 °C.

4.2 Colorimetric LAMP σε πρότυπα στελέχη.

Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης ώστε αυτή να μπορέσει να εφαρμοσθεί και σε κλινικά δείγματα, πραγματοποιήθηκε Colorimetric LAMP σε πρότυπα στελέχη εντεροϊών κυρίως της ομάδας B και C, αλλά και σε κάποια της A και D. Όπως αναφέρθηκε και πριν, έγινε χρήση απευθείας του εκχυλισμένου RNA των δειγμάτων και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 65 °C για 50 min. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες φωτογραφίες με την άμεση οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, μέσω αλλαγής χρώματος.

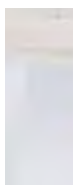


Εικόνα 4.2 1 Colorimetric LAMP σε πρότυπα στελέχη EVB. Τα δυο ροζ δείγματα δεξιά είναι οι αρνητικοί μάρτυρες

Δείγμα	RNA	Αποτέλεσμα
1	E3	Θετικό
2	E4	Θετικό
3	E6	Θετικό
4	E7	Θετικό
5	E9	Θετικό
6	E11	Θετικό
7	E12	Θετικό
8	Rd(- μάρτυρας)	Αρνητικό
9	H ₂ O(- μάρτυρας)	Αρνητικό

Πίνακας 4.2.1: Αποτελέσματα που φαίνονται στη φωτογραφία

Θέση	Δείγμα	Αποτέλεσμα
------	--------	------------



Εικόνα 4.2 2: Colorimetric LAMP σε πρότυπα στελέχη EVCs. Τα 2 δεξιά δείγματα με ροζ χρώμα είναι οι αρνητικοί μάρτυρες.

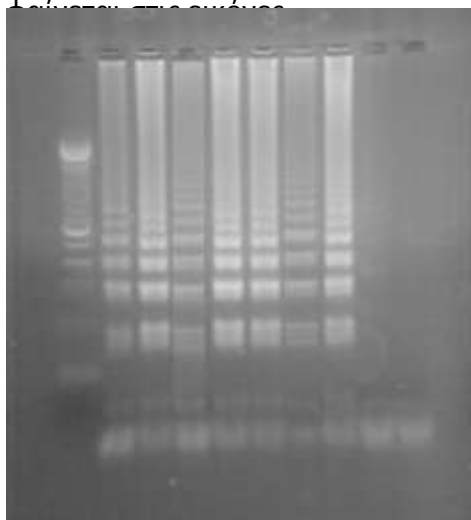
Δείγμα	RNA	Αποτέλεσμα
1	CAV1	Θετικό
2	CAV11	Θετικό
3	CAV15	Θετικό
4	CAV17	Θετικό
5	CAV20	Θετικό
6	CAV21	Θετικό
7	Rd(- μάρτυρας)	Αρνητικό
8	H ₂ O(- μάρτυρας)	Αρνητικό

Πίνακας 4.2.2: Αποτελέσματα που φαίνονται στη φωτογραφία

4.3 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προτύπων στελεχών

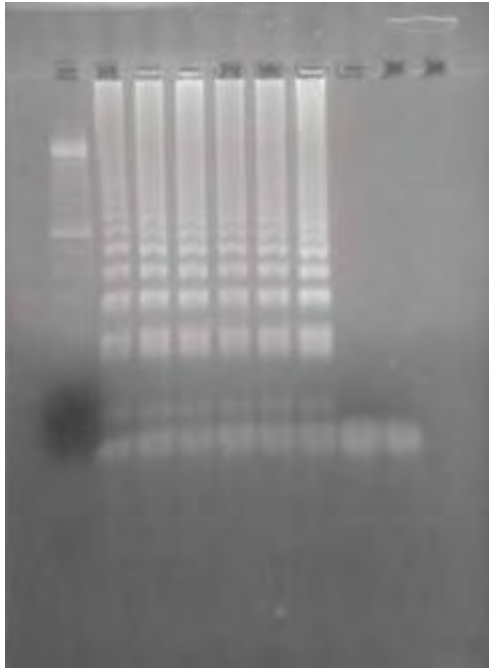
Για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων της Colorimetric LAMP, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πύκτωμα αγαρόζης, επαληθεύοντας τα οπτικά αποτελεσμάτα, όπως

δείγματα στα σφάλματα



Θέση	Δείγμα	Αποτέλεσμα
1	Ladder 100bp	
2	E3	+
3	E4	+
4	E6	+
5	E7	+
6	E9	+
7	E11	+
8	E12	+
9	Rd(- μάρτυρας)	-
10	H ₂ O(- μάρτυρας)	-

Εικόνα 4.3.1 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων Colorimetric LAMP.



1	Ladder 100bp	
2	CAV1	Θετικό
3	CAV11	Θετικό
4	CAV15	Θετικό
5	CAV17	Θετικό
6	CAV20	Θετικό
7	CAV21	Θετικό
8	Rd(- μάρτυρας)	Αρνητικό
9	H ₂ O(- μάρτυρας)	Αρνητικό

Εικόνα 4.3.2 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων Colorimetric LAMP

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της Colorimetric LAMP στα πρότυπα στελέχη.

<u>Είδος</u>	<u>Πρότυπα Στελέχη</u>	<u>Colorimetric LAMP</u>	<u>Είδος</u>	<u>Πρότυπα Στελέχη</u>	<u>Colorimetric LAMP</u>
E-A	EV71	Θετικό	EV-C	PV1	Θετικό
EV-B	E3	Θετικό		CAV1	Θετικό
	E4	Θετικό		CAV11	Θετικό
	E6	Θετικό		CAV13	Θετικό
	E7	Θετικό		CAV15	Θετικό
	E11	Θετικό		CAV17	Θετικό
	E12	Θετικό		CAV20	Θετικό
	E14	Θετικό		CAV21	Θετικό
	E30	Θετικό		CAV24	Θετικό
	CBV1	Θετικό		EV-D	EV68
	CBV2	Θετικό	EV70		Θετικό
CBV4	Θετικό				
CBV3	Θετικό				
CBV5	Θετικό				

Πίνακας 4.3.1 : Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της Colorimetric LAMP σε πρότυπα στελέχη

4.4 Colorimetric LAMP σε κλινικά δείγματα.

Προκειμένου να επαληθευτεί ο σχεδιασμός και η ικανότητα ανίχνευσης της Colorimetric LAMP, αυτή χρησιμοποιήθηκε σε κλινικά δείγματα. Ενδεικτικές φωτογραφίες παρατίθενται παρακάτω.



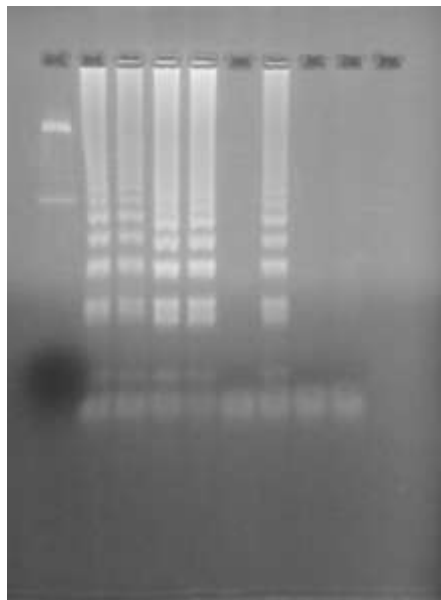
Εικόνα 4.4 .1 Colorimetric LAMP σε κλινικά δείγματα. Τα τρία ροζ δείγματα είναι οι αρνητικοί μάρτυρες

Δείγμα	RNA	Στέλεχος	Αποτέλεσμα
1	Boud	E6	Θετικό
2	Han	E30	Θετικό
3	Himon	E6	Θετικό
4	Kras	E6	Θετικό
5	H ₂ O(- μάρτυρας)		Αρνητικό
6	Gior	E30	Θετικό
7	Rd(- μάρτυρας)		Αρνητικό
8	H ₂ O(- μάρτυρας)		Αρνητικό

Πίνακας 4.4.1:Αποτελέσματα που φαίνονται στη φωτογραφία

4.5 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης κλινικών δειγμάτων

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.



Δείγμα	RNA	Στέλεχος	Αποτέλεσμα
1	Ladder 100 bp		
2	Boud	E6	+
3	Han	E30	+
4	Himon	E6	+
5	Kras	E6	+
6	H ₂ O(- μάρτυρας)		-
7	Gior	E30	+
8	Rd(- μάρτυρας)		-
9	H ₂ O(- μάρτυρας)		-

Εικόνα 4.5.1 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων Colorimetric LAMP

Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της Colorimetric LAMP στα κλινικά δείγματα

<u>Δείγμα</u>	<u>Στέλεχος</u>	<u>Colorimetric LAMP</u>	<u>Δείγμα</u>	<u>Στέλεχος</u>	<u>Colorimetric LAMP</u>
Boud	E6	Θετικό	121/82	E9	Θετικό
Han	E30	Θετικό			
Tsag	E13	Θετικό			
Himon	E6	Θετικό			
Kras	E6	Θετικό			
Gior	E30	Θετικό			
645/G	CBV5	Θετικό			
Pap	E6	Θετικό			

Πίνακας 4.3.1: Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της Colorimetric LAMP σε κλινικά δείγματα.

4.6 Έλεγχος ευαισθησίας Colorimetric LAMP

Ο έλεγχος της ευαισθησίας της Colorimetric LAMP, ελέγχθηκε με τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1, και τα στελέχη CBV5 το καθένα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις TCID₅₀. Η ευαισθησία βρέθηκε να είναι 10² σε μια αντίδραση που γίνεται για 50 λεπτά στους 65 °C. Ενδεικτικά παρουσιάζεται η εικόνα της Colorimetric LAMP στον Sabin1 σε συγκεντρώσεις 10², 10 και 1 TCID₅₀.

Δείγμα	RNA	Αποτέλεσμα
1	Sabin 1 [10 ²]	+
2	Sabin 1 [10]	-
3	Sabin 1 [1]	-
4	Rd(- μάρτυρας)	-
5	H ₂ O(- μάρτυρας)	-

Εικόνα 4.6.1: Colorimetric LAMP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις TCID₅₀ σε Sabin1 για τον έλεγχο της ευαισθησίας.



5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae και στο γένος των εντεροϊών. Είναι μικροί σε μέγεθος ιοί, χωρίς φάκελο με το γονιδίωμα τους να είναι ένα μονόκλωνο, θετικής πολικότητας +ssRNA, μήκους περίπου 7.500 βάσεων, το οποίο περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας.

Οι εντεροϊοί αποτελούν τους πιο κοινούς ιούς που προσβάλλουν εκατομύρια ανθρώπων παγκοσμίως. Σχετίζονται με ποικίλες ασθένειες, που εμφανίζουν ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, από ασυμπτωματικές μολύνσεις μέχρι και σοβαρές διαταραχές (50). Παραδείγματα αυτών είναι, η άσηπτη μηνιγγίτιδα, η μυοκαρδίτιδα, η ασθένεια των χεριών-ποδιών και στόματος (HFMD), χαλαρή παράλυση και εγκεφαλίτιδα (51). Οι εντεροϊοί μεταδίδονται κυρίως μέσω της στοματικής οδού, αλλά μπορεί και μέσω των κοπράνων. Πιο συγκεκριμένα, η μόλυνση που προέρχεται από τους ιούς αυτούς, επεκτείνεται ακόμα και στο νερό, το φαγητό και το έδαφος, μέσω επαφής με μολυσμένα κόπρανα. Αυτές οι εξωγενείς πηγές μόλυνσης μπορούν να προκαλέσουν την ταχύτερη μετάδοση του ιού από άνθρωπο σε άνθρωπο (52). Καθώς οι εντεροϊοί ως ασυμπτωματικοί, μπορούν και κυκλοφορούν στον πληθυσμό χωρίς να γίνονται αντιληπτοί, καθώς επίσης και ότι τα μικρά παιδιά αποτελούν τον κύριο φορέα μετάδοσης στο άμεσο περιβάλλον τους, όλα τα παραπάνω ενισχύουν την πιθανότητα έξαρσης των εντεροϊών. Συμπερασματικά, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη για την ανάπτυξη μεθόδων γρήγορης και άμεσης ανίχνευσης των εντεροϊών, που να προλαμβάνουν τέτοια περιστατικά.

Μία κλασική μέθοδος για την ανίχνευση των εντεροϊών σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα είναι οι κυτταροκαλλιέργειες που ακολουθούνται από οροξεουδετέρωση με αντισώματα. Ωστόσο, η τεχνική αυτή είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και ακριβή. Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως, όπως αντίστροφη μεταγραφή που ακολουθείται από ενίσχυση του στόχου μέσω κλασικής PCR και η Real Time RT-PCR, αν και αποτελεσματικές ως προς την ενίσχυση, αποτελούν εξίσου χρονοβόρες διαδικασίες οι οποίες προϋποθέτουν και τη χρήση ακριβού εξοπλισμού (53-54). Για αυτόν τον λόγο, είναι σημαντικό να

αναπτυχθούν νέοι μέθοδοι που θα επιτρέπουν τη γρήγορη, ευαίσθητη και με χαμηλό κόστος εξοπλισμού ανίχνευση των εντεροϊών.

Μια τέτοια προσέγγιση αποτελεί αυτή της μεθόδου LAMP (Loop mediated isothermal amplification). Η τεχνική αυτή, χρησιμοποιείται για τη γρήγορη, ύψηλης ευαισθησίας και εξειδίκευσης ανίχνευση του στόχου, κάτω από ισοθερμικές συνθήκες, με τη χρήση ενός μόνο θερμοκυκλοποιητή ή και απλού υδατόλουτρου. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται 2 ή 3 ζεύγη εκκινητικών μορίων που αναγνωρίζουν 6 ή 8 διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος αντίστοιχα, ενώ στην αντίδραση συμμετέχει μια θερμοσταθερή Bst πολυμεράση με ενεργότητα εκτόπισης κλώνου που λειτουργεί ιδανικά σε θερμοκρασίες 60 με 65 °C. Η μέθοδος LAMP ενισχύει το στόχο με υψηλή αποτελεσματικότητα, καθώς από λίγα μόνο αντίγραφα, αυτός ενισχύεται μέχρι και 10^9 φορές σε λιγότερο από το χρονικό διάστημα της μιας ώρας (46). Η τεχνική αυτή μπορεί επιπλέον να συνδυαστεί με άλλες τεχνικές οπτικοποίησης, πέραν της ηλεκτροφόρησης, όπως με φθορίζουσες χρωστικές ή ακόμα και με την αλλαγή χρώματος του δείγματος, το οποίο γίνεται αντιληπτό με γυμνό μάτι (48).

Η Colorimetric LAMP αποτελεί μια παραλλαγμένη μορφή της κλασσικής LAMP τεχνικής, επιτρέποντας την άμεση οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ενίσχυσης, σε σύντομο χρονικό διάστημα και χωρίς την περαιτέρω ηλεκτροφόρηση των προϊόντων. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται με την αλλαγή χρώματος των θετικών και μόνο δειγμάτων, λόγω ενός δείκτη pH που είναι ενσωματωμένος στο μείγμα της αντίδρασης, το ερυθρό της φαινόλης. Συγκεκριμένα, κατά την σύνθεση του προϊόντος, απελευθερώνεται πυροφοσφωρικό και H^+ από την εισαγωγή κάθε φορά ενός dNTP. Έτσι, το pH του διαλύματος αλλάζει και από βασικό διάλυμα γίνεται πιο όξινο. Αυτή η μείωση στο pH, ανιχνεύεται από το ερυθρό της φαινόλης και έτσι προκύπτει αλλαγή χρώματος από έντονο ροζ σε κίτρινο, των θετικών δειγμάτων (47,48).

Η τεχνική της colorimetric LAMP που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη, θα μπορούσε να θεωρηθεί μια παραλλαγμένη μορφή της Colorimetric LAMP, ως RT-LAMP Colorimetric, καθώς τα δείγματα RNA ενισχύθηκαν με την τεχνική αυτή,

κατευθείαν χωρίς τη διαμεσολάβηση αντίστροφης μεταγραφής RT, ένα χρονοβόρο βήμα που χρειάζεται για την μετατροπή του RNA σε cDNA πριν την πραγματοποίηση της κλασσικής LAMP (49). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Bst 2.0 πολυμεράση που έχει ενεργότητα εκτόπισης κλώνου, είναι ευέλικτη σε διάφορες συνθήκες αντίδρασης και πιο θερμοσταθερή από την αγρίου τύπου Bst πολυμεράση. Εκτός από το ένζυμο αυτό, στο μείγμα της αντίδρασης υπάρχει και μια τροποποιημένη αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία πραγματοποιεί την αντίστροφη μεταγραφή του RNA, παράλληλα με την ενίσχυση του στόχου σε βέλτιστη θερμοκρασία 65 °C. Για αυτό το λόγο το βήμα της χρονοβόρας αντίστροφης μεταγραφής RT παρακάμπτεται, και έτσι τα δείγματα ενισχύονται κατευθείαν από RNA.

Σκοπός της παρούσας εργασίας λοιπόν, ήταν η ανάπτυξη μιας τεχνικής για τη γρήγορη και εύκολη ανίχνευση των εντεροϊών της ομάδας B και C με άμεση οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, μέσω μιας καινοτόμου ισοθερμικής μεθόδου Colorimetric Loop mediated amplification (LAMP).

Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν 3 ζεύγη εκκινητών πάνω στην 5' UTR του γονιδιώματος των εντεροϊών με το πρόγραμμα Primer Explorer V5. Συγκεκριμένα οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι F3,B3 εξωτερικοί εκκινητές, οι FIP,BIP εσωτερικοί εκκινητές καθώς και οι LoopF,LoopB που υβριδίζονται στις δομές θηλιάς του ενισχυμένου προϊόντος.

Στη συνέχεια, προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστος χρόνος της αντίδρασης, έπρεπε να διεξαχθεί Real Time Colorimetric LAMP, σε πρότυπα στελέχη Sabin 1 διαφορετικών συγκεντρώσεων TCID₅₀, με 2 αρνητικούς μάρτυρες (Rd και ddH₂O) για να βρεθεί το λεπτό θετικοποίησης της αντίδρασης και αυτή να σταματά πριν το λεπτό αυτό, ώστε να παρατηρείται χρωματική αλλαγή μόνο στα θετικά δείγματα. Από τα αποτελέσματα αυτά προέκυψε ότι ο ακριβής χρόνος στον οποίον θα πρέπει να πραγματοποιείται η αντίδραση είναι τα **50 λεπτά**.

Έπειτα, προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης ώστε αυτή να μπορέσει να εφαρμοσθεί σε κλινικά δείγματα, πραγματοποιήθηκε Colorimetric LAMP σε 25 πρότυπα στελέχη εντεροϊών κυρίως της ομάδας B και C,

αλλά και σε κάποια της A και D. Όπως αναφέρθηκε και πριν, έγινε χρήση απευθείας του εκχυλισμένου RNA των δειγμάτων και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 65 °C για 50 λεπτά. Πράγματι, οι συνθήκες διεξαγωγής της Colorimetric LAMP λειτούργησαν με επιτυχία στα πρότυπα στελέχη, αφού παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος μόνο στα θετικά δείγματα, κάτι που επιβεβαιώθηκε και απο ηλεκτροφόρηση των προϊόντων αυτών σε πήκτωμα αγαρόζης.

Έτσι, προχωρήσαμε στην πραγματοποίηση της αντίδρασης σε 9 κλινικά δείγματα που περιείχαν εντεροϊούς της ομάδας B, προκειμένου να επαληθευτεί ο σχεδιασμός και η ικανότητα ανίχνευσης της Colorimetric LAMP, όπου όντως τα θετικά δείγματα εμφάνισαν αλλαγή χρώματος απο ροζ σε κίτρινο, και τα αντίστοιχα θετικά δείγματα, έδωσαν ζώνες ενίσχυσης και στην ηλεκτροφόρηση.

Τέλος, ο έλεγχος της ευαισθησίας έγινε με τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1, και στελέχη CBV5 το καθένα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις TCID₅₀. Η ευαισθησία βρέθηκε να είναι 10² σε μια αντίδραση που γίνεται για 50 λεπτά στους 65 °C.

Επομένως, η Colorimetric LAMP που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, αποτελεί μία μέθοδο εύχρηστη, ευαίσθητη με υψηλή εξειδίκευση, σχετικά χαμηλού κόστους που επιτρέπει την άμεση οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων για την ανίχνευση των εντεροϊών της ομάδας B και C. Αυτή γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα, λόγω της άμεσης οπτικοποίησης που διαμεσολαβείται απο την ταυτόχρονη αντίστροφη μεταγραφή και ενίσχυση του RNA στόχου μέσα στην ίδια αντίδραση. Έτσι, μελλοντικά μπορεί να αποτελέσει αποτελεσματική τεχνική για τον διαγνωστικό έλεγχο των ιών αυτών με μεγάλη ευαισθησία.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology, 5th Edition.*; 2007.
2. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *J Gen Virol.* 2017;98(10):2421-2422. doi:10.1099/jgv.0.000911
3. Jiang P, Liu Y, Ma H-C, Paul A V., Wimmer E. Picornavirus Morphogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78(3):418–437. doi:10.1128/membr.00012-14
4. CASPAR DL, KLUG A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1962;1962(27):1-24. doi:10.1101/SQB.1962.027.001.005
5. Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM. The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969;62(3):912-919. doi:10.1073/pnas.62.3.912
6. Stanway G. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol.* 1990;11(11):2483-2501. doi:10.1099/0022-1317-71-11-2483
7. Kristensen T, Belsham GJ. Identification of a short, highly conserved, motif required for picornavirus capsid precursor processing at distal sites. *PLoS Pathog.* 2019;15(1):e1007509. doi:10.1371/journal.ppat.1007509
8. Chow M, Newman JFE, Filman D, Hogle JM, Rowlands DJ, Brown F. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature.* 1987;327:482-486. doi:10.1038/327482a0
9. Rossmann MG, Plevka P, Perera R, Cardoso J, Kuhn RJ, Rossmann MG. Crystal Structure of Human Enterovirus 71. *Sel Pap Michael G Rossmann with Comment.* 2014;336(6086):1274. doi:10.1142/9789814513357_0053
10. Jiang J, Laliberté JF. The genome-linked protein VPg of plant viruses - A protein with many partners. *Curr Opin Virol.* 2011;1(5):347-354. doi:10.1016/j.coviro.2011.09.010
11. Steil BP, Barton DJ. Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. *Virus Res.* 2009;139(2):240-252. doi:10.1016/j.virusres.2008.07.027
12. Martínez-Salas E, Francisco-Velilla R, Fernandez-Chamorro J, Lozano G, Diaz-Toledano R. Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. *Virus Res.* 2015;206:62-73. doi:10.1016/j.virusres.2015.01.012
13. 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(6):2961-2971.
14. Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, Van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(6):368-381. doi:10.1038/s41579-018-0005-4
15. Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 2002;10(7):324-331. doi:10.1016/S0966-842X(02)02383-1
16. Rossmann MG. The canyon hypothesis. *Viral Immunol.* 1989;264(25):14587-14590. doi:10.1089/vim.1989.2.143

17. 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(5):855-865. doi:10.1016/0092-8674(89)90690-9
18. Bowers JR, Readler JM, Sharma P, Excoffon KJDA. Poliovirus Receptor: More than a simple viral receptor. *Virus Res*. 2017;242:1-6. doi:10.1016/j.virusres.2017.09.001
19. Martino TA, Petric M, Brown M, et al. Cardiovirulent coxsackieviruses and the decay-accelerating factor (CD55) receptor. *Virology*. 1998;244(2):302-314. doi:10.1006/viro.1998.9122
20. 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(5):1934-1945.
21. Racaniello VR. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology: Sixth Edition*. ; 2013:796-830.
22. Belov GA, Van Kuppeveld FJ. (+)RNA viruses rewire cellular pathways to build replication organelles. *Curr Opin Virol*. 2012;6(2):740-747. doi:10.1016/j.coviro.2012.09.006
23. Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, Bienz K. Formation of the Poliovirus Replication Complex Requires Coupled Viral Translation, Vesicle Production, and Viral RNA Synthesis. *J Virol*. 2000;74(14):6570-6580. doi:10.1128/jvi.74.14.6570-6580.2000
24. Sharma N, Ogram SA, Morasco BJ, Spear A, Chapman NM, Flanagan JB. Functional role of the 5' terminal cloverleaf in Coxsackievirus RNA replication. *Virology*. 2009;393(2):238-249. doi:10.1016/j.virol.2009.07.039
25. 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(1):220-226. doi:10.1016/0042-6822(87)90063-8
26. 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(8):4379-50. doi:10.1128/jvi.77.8.4739-4750.2003
27. 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.
28. Sun Y, Guo Y, Lou Z. Formation and working mechanism of the picornavirus VPg uridylylation complex. *Curr Opin Virol*. 2014;9:24-30. doi:10.1016/j.coviro.2014.09.003
29. Barton DJ, Morasco BJ, Flanagan JB. Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J Virol*. 1999;73(12):10104-10112.
30. Melnick JL. Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Channock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. *Fields virology*. In: *Fields Virology*. ; 1996:549-605.
31. Wimmer E. Genetics of Poliovirus. *Annu Rev Genet*. 1993;27:353-436. doi:10.1146/annurev.genet.27.1.353
32. Savolainen-Kopra C, Blomqvist S. Mechanisms of genetic variation in polioviruses. *Rev Med Virol*. 2010;20(6):358-371. doi:10.1002/rmv.663

33. Lukashv AN, Lashkevich VA, Ivanova OE, Koroleva GA, Hinkkanen AE, Ilonen J. Recombination in Circulating Enteroviruses. *J Virol.* 2003;77(19):10423-10431. doi:10.1128/jvi.77.19.10423-10431.2003
34. Guillot S, Caro V, Cuervo N, et al. Natural Genetic Exchanges between Vaccine and Wild Poliovirus Strains in Humans. *J Virol.* 2000;74(18):8434-8443. doi:10.1128/jvi.74.18.8434-8443.2000
35. Austermann-Busch S, Becher P. RNA Structural Elements Determine Frequency and Sites of Nonhomologous Recombination in an Animal Plus-Strand RNA Virus. *J Virol.* 2012;86(13):7393-7402. doi:10.1128/jvi.00864-12
36. Kottaridi C, Bolanaki E, Kyriakopoulou Z, Dedepsidis E, Pratti A, Markoulatos P. Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;58(4):407-412. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.03.007
37. Pilipenko E V., Gmyl AP, Agol VI. A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(11):1870-1875. doi:10.1093/nar/23.11.1870
38. Kirkegaard K, Baltimore D. The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell.* 1986;47(3):433-443. doi:10.1016/0092-8674(86)90600-8
39. Gmyl AP, Belousov E V., Maslova S V., Khitrina E V., Agol VI, Chetverin AB. Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J Virol.* 1999;73(11):8958-8965.
40. Büning MK, Meyer D, Austermann-Busch S, Roman-Sosa G, Rümenapf T, Becher P. Nonreplicative RNA recombination of an animal plus-strand RNA virus in the absence of efficient translation of viral proteins. *Genome Biol Evol.* 2017;9(4):817-829. doi:10.1093/gbe/evx046
41. Duong V, Mey C, Eloit M, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 at the origin of an epidemic of fatal hand, foot and mouth disease cases in Cambodia. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5(9):e104. doi:10.1038/emi.2016.101
42. Nottay BK, Kew OM, Hatch MH, Heyward JT, Obijeski JF. Molecular variation of type 1 vaccine-related and wild polioviruses during replication in humans. *Virology.* 1981;108(2):405-423. doi:10.1016/0042-6822(81)90448-7
43. Kew OM, Mulders MN, Lipskaya GY, da Silva EE, Patlansch MA. Molecular epidemiology of polioviruses. *Semin Virol.* 1995;6(Suppl 2):S499-504. doi:10.1016/S1044-5773(05)80017-4
44. Bolanaki E, Kottaridi C, Markoulatos P, Margaritis L, Katsorchis T. A comparative amplification of five different genomic regions on Coxsackie A and B viruses. Implications in clinical diagnostics. *Mol Cell Probes.* 2005;19(2):127-135. doi:10.1016/j.mcp.2004.10.006
45. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods.* 1995;53(1):25-36. doi:10.1016/0166-0934(94)00173-E
46. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63. doi:10.1093/nar/28.12.e63
47. Daskou M, Tsakogiannis D, Dimitriou TG, et al. WarmStart colorimetric LAMP for the specific and rapid detection of HPV16 and HPV18 DNA. *J Virol Methods.* 2019;270:87-94. doi:10.1016/j.jviromet.2019.04.023

48. Zhang X, Lowe SB, Gooding JJ. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens Bioelectron.* 2014;61:491-499. doi:10.1016/j.bios.2014.05.039
49. Calvert AE, Biggerstaff BJ, Tanner NA, Lauterbach M, Lanciotti RS. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS One.* 2017;12(9):e0185340. doi:10.1371/journal.pone.0185340
50. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ Morb Mortal Wkly report Surveill Summ / CDC.* 2006;55(8):1-20.
51. Tang JW, Holmes CW. Acute and chronic disease caused by enteroviruses. *Virulence.* 2017;8(7):1062-1065. doi:10.1080/21505594.2017.1308620
52. Rajtar B, Majek M, Polański Ł, Polz-Dacewicz M. Enteroviruses in water environment - A potential threat to public health. *Ann Agric Environ Med.* 2008;15(2):199-203.
53. Manzara S, Muscillo M, La Rosa G, Marianelli C, Cattani P, Fadda G. Molecular identification and typing of enteroviruses isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2002;40(12):4554-4560. doi:10.1128/JCM.40.12.4554-4560.2002
54. Verstreppe WA, Bruynseels P, Mertens AH. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Virol.* 2002;25(S):39-43.
55. Gallas-Lindemann C, Sureshkumar P, Noack MJ, Sotiriadou I. Loop-Mediated Isothermal Amplification: An Advanced Method for the Detection of Giardia. In: *Current Topics in Giardiasis.* ; 2017. doi:10.5772/intechopen.70804