



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΑΣΗΠΤΗΣ  
ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ

ΑΣΗΜΑΚΟΥΛΑ ΣΤΑΜΑΤΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (επιβλέπων):

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Ζ. ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ:

ΕΙΔΙΚΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ (ΕΕΔΠ)

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας από το Νοέμβριο του 2012 έως το Νοέμβριο του 2013.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη αρχικά για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου κατά την ανάθεση αυτής της πτυχιακής εργασίας και στη συνέχεια για την ενθάρρυνση, τη βοήθεια και την καθοδήγηση κατά τη διεξαγωγή της. Κυρίως όμως, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω που με έφερε σε επαφή με τον κόσμο της μοριακής ιολογίας.

Επιπλέον, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη διδάκτορα κα. Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα για τις χρήσιμες συμβουλές της, την καθοδήγηση και τη βοήθειά της. Ακόμη ένα θερμό ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόρη για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην ευχαριστήσω τα άτομα που στελέχωσαν το εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας όλο αυτό το χρονικό διάστημα: Ρούτερ Ειρήνη, Τσακογιάννη Δημήτρη, Μπλέτσα Μάγδα και πολλούς άλλους για τη συμπαράσταση που έδειξαν και το φιλικό περιβάλλον που δημιούργησαν. Κυρίως θέλω να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Δημητρίου Τηλέμαχο που μοιράστηκε τον ενθουσιασμό του για τον τομέα της μοριακής ιολογίας μαζί μου, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και βοήθειά του καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένεια και τους φίλους μου, που είναι πάντα δίπλα μου και στηρίζουν τις επιλογές μου. Ευχαριστώ τους θείους και τους φίλους μου που με άκουγαν προσεκτικά να αναλύω το πείραμά μου τόσες φορές που πλέον ξέρουν να περιγράψουν όλα τα στάδια της PCR. Τη μητέρα και τον αδερφό μου, τους ευχαριστώ για όλα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια των Picornaviridae ιών και είναι μικρού μεγέθους RNA ιοί. Το γένωμα των εντεροϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας, το μήκος του οποίου είναι περίπου 7.500 νουκλεοτίδια. Λόγω της ανθεκτικότητας του καψιδίου τους μπορούν να μολύνουν επιτυχώς τον άνθρωπο ξεκινώντας από το πεπτικό σύστημα, ενώ ο πολλαπλασιασμός τους λαμβάνει χώρα στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και του εντέρου. Οι εντεροϊοί μολύνουν συχνά το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), προκαλώντας νευρολογικές ασθένειες, όπως η άσηπτη μηνιγγίτιδα.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 55 κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) για την επιβεβαίωση της παρουσίας εντεροϊών. Με την τεχνική της RT-PCR διαπιστώθηκε η παρουσία εντεροϊών σε 6 από τα 55 δείγματα ενισχύοντας μία περιοχή της 5'UTR η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ των εντεροϊών. Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκε ο ορότυπος του κάθε δείγματος με την ενίσχυση τμήματος της VP1 περιοχής. Ακολούθησε κλωνοποίηση και αλληλούχιση με στόχο τη φυλογενετική μελέτη του γονιδιώματος των εντεροϊών με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των κλωνοποιημένων PCR δειγμάτων υπέδειξαν 4 οροτύπους για τα 6 δείγματα. Echovirus 30 για τα ENY4, AK1439, BM1025, Echovirus 13 για το W2457, Echovirus 9 για το W3370 και Coxsackie B3 για το STEF3. Για την επιδημιολογική μελέτη του κάθε στελέχους κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με τμήματα της VP1 περιοχής κοινά με διάφορες κατατεθειμένες αλληλουχίες στελεχών του αντίστοιχου οροτύπου στη GeneBank.

Τα ENY4, BM1025 και AK1439 εντοπίζονται κοντά στο δέντρο, αλλά δε φαίνεται να σχετίζονται με άλλα στελέχη Echo 30 από την Ελλάδα. Από το φυλογενετικό δέντρο υποδεικνύονται δύο είσοδοι διαφορετικών στελεχών στην Ελλάδα το 2001 και το 2008-2010. Το στέλεχος W2457 φαίνεται να είναι κοντά με στελέχη της Ινδίας του 2007-2009 και της Γαλλίας του 2006. Το στέλεχος W3370 εντοπίζεται πιο κοντά με στελέχη της Αυστραλίας του 2007, της Ισπανίας 2000-2004 και της Γαλλίας του 2006. Το στέλεχος STEF3 εντοπίζεται πιο κοντά με στελέχη που απομονώθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο το 2008 και στη Γαλλία το 2005-2006.

## ABSTRACT

Enteroviruses belong to the Picornaviridae family and are small RNA viruses. The enterovirus genome consists of a single-stranded RNA molecule of positive polarity, the length of which is approximately 7,500 nucleotides. Due to their capsid resilience, enteroviruses can successfully infect humans starting from the digestive tract, and their proliferation occurs in the lymphatic tissue of the pharynx and the intestine. Enteroviruses often infect the central nervous system (CNS), causing neurological diseases such as aseptic meningitis.

In the present study 55 clinical samples of cerebrospinal fluid (CSF) were initially investigated for the presence of enteroviruses. Using the technique RT-PCR, the presence of enteroviruses was confirmed in 6 out of the 55 samples by amplification of a part of 5'UTR which is conserved among enteroviruses. Then, the serotype of each sample was identified by amplifying a part of VP1 genomic region followed by cloning, sequencing and phylogenetic analysis of each positive for enteroviruses sample using bioinformatics programs.

The results of sequencing of the cloned PCR samples revealed four serotypes for the six specimens. Echovirus 30 for the samples ENY4, AK1439 and BM1025, Echovirus 13 for the sample W2457, Echovirus 9 for the sample W3370 and Coxsackie B3 for the sample STEF3. For the epidemiological study of each positive sample phylogenetic trees were constructed with sequences on VP1 genomic region, common to several deposited strains' sequences of the respective serotypes in GeneBank.

ENY4, BM1025 and AK1439 appear to correlate, however they do not seem to be related with other Echovirus 30 strains from Greece. From the analysis of the phylogenetic tree two entrances of different strains in Greece were revealed, one in 2001 and the other in 2008-2010. W2457 appears to correlate with Echovirus 13 strains from India in 2007-2009 and from France in 2006. W3370 appears to correlate with Echovirus 9 strains from Australia in 2007, from Spain in 2000-2004 and from France in 2006. STEF3 appears to correlate with Coxsackie B3 virus strains from United Kingdom in 2008 and from France in 2005-2006.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

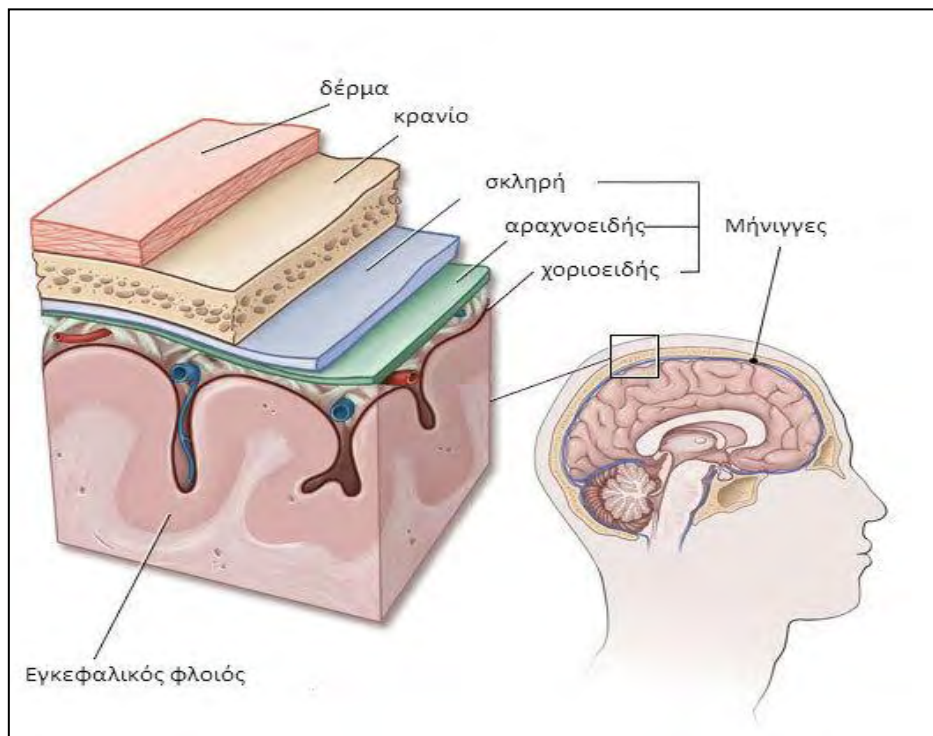
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ</b> .....	<b>1</b>
<b>2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ</b> .....	<b>2</b>
<b>3 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ</b> .....	<b>5</b>
3.1 Δομή καψιδίου .....	5
3.2 Οργάνωση ιικού γονιδιώματος .....	7
3.2.1 5' μη κωδική περιοχή (5' untranslated region – 5'UTR) .....	8
3.2.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) .....	10
3.2.2.1 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) – δομική περιοχή (P1) .....	10
3.2.2.2 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) – λειτουργικές πρωτεΐνες.....	10
3.2.3 3' μη κωδική περιοχή (3' untranslated region – 3'UTR) .....	12
<b>4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ</b> .....	<b>12</b>
<b>5 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ</b> .....	<b>13</b>
5.1 Πρόσδεση-Διείσδυση-Απέκδυση .....	14
5.2 Μετάφραση .....	15
5.3 Πρωτεολυτική επεξεργασία ιικής πολυπρωτεΐνης.....	16
5.4 Αντιγραφή ιικού γονιδιώματος .....	17
5.5 Καψιδίωση – Απελευθέρωση ώριμων ιικών σωματιδίων .....	18
<b>6 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ-ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ</b> .....	<b>19</b>
<b>7 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ</b> .....	<b>20</b>
<b>8 ΠΡΟΛΗΨΗ-ΕΛΕΓΧΟΣ</b> .....	<b>21</b>
<b>9 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ</b> .....	<b>22</b>
<b>10 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ</b> .....	<b>23</b>
10.1 Παραδοσιακές μέθοδοι.....	23
10.2 Μοριακές μέθοδοι.....	24
<b>11 ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ</b> .....	<b>26</b>
11.1 Μεταλλάξεις .....	26
11.2 Γενετικός Ανασυνδυασμός .....	27
<b>12 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....	<b>29</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>30</b>
<b>1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ</b> .....	<b>30</b>
<b>2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA</b> .....	<b>32</b>
<b>3 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ</b> .....	<b>33</b>
<b>4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ</b> .....	<b>34</b>
<b>5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ</b> .....	<b>35</b>
<b>6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR</b> .....	<b>36</b>
<b>7 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR</b> .....	<b>36</b>

8	ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR.....	37
9	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ .....	40
10	ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ.....	40
	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>42</b>
1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ.....	42
2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ PCR ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	42
3	ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΔΕΝΤΡΑ ΤΗΣ VP1 ΠΕΡΙΟΧΗΣ .....	43
	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>48</b>
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>51</b>

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1 Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ

Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) για να προστατεύεται περιβάλλεται από τρία αλληλοδιάδοχα μεμβρανώδη περιβλήματα που λέγονται μήνιγγες του εγκεφάλου. Αυτές από μέσα προς τα έξω είναι η χοριοειδής, η αραχνοειδής και η σκληρή. Η χοριοειδής μήνιγγα είναι μία λεπτή, αδιαπέραστη μεμβράνη, η οποία βρίσκεται σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του εγκεφάλου και παρακολουθεί όλες τις αναγλυφές και τις αυλακές του και περιέχει τις αρτηρίες που τρέφουν τον εγκέφαλο. Η αραχνοειδής μήνιγγα είναι ένας χαλαρός θύλακας που περιβάλλει τον εγκέφαλο, αμέσως προς τα έξω από τη χοριοειδή μήνιγγα, χωρίς να παρακολουθεί τις αναγλυφές (έλικες και αύλακες) του εγκεφάλου. Έτσι ανάμεσα στη χοριοειδή και την αραχνοειδή μήνιγγα σχηματίζεται σχισμοειδής χώρος, που λέγεται υπαραχνοειδής χώρος και περιέχει το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η εξωτερική μεμβράνη, η σκληρή μήνιγγα, είναι μία παχιά, ανθεκτική μεμβράνη, που βρίσκεται προς το έξω μέρος της αραχνοειδούς και σε απόλυτη επαφή με την εσωτερική επιφάνεια του κρανίου.



Εικόνα 1-1: οι μήνιγγες του εγκεφάλου

Η προσβολή των μηνίγγων από μικροοργανισμούς προκαλεί την μηνιγγίτιδα. Αυτή η φλεγμονή προκαλεί αλλαγές στο υγρό (εγκεφαλονωτιαίο υγρό) που περιβάλλει τα όργανα αυτά. Η ασθένεια της μηνιγγίτιδας οφείλει τα αίτιά της σε ιούς,



βακτήρια, μύκητες και παράσιτα, με τους ιούς να ευθύνονται για τις περισσότερες των περιπτώσεων. Γενικά, εμφανίζονται δύο μεγάλες κατηγορίες μηνιγγίτιδας, οι άσηπτες και οι μικροβιακές. Ο όρος άσηπτη μηνιγγίτιδα αναφέρεται άτυπα σε όλες τις περιπτώσεις μηνιγγίτιδας που δεν οφείλονται σε μικροβιακή λοίμωξη και συνήθως οφείλεται σε ιούς. Στους ιούς που μπορούν να προκαλέσουν άσηπτη μηνιγγίτιδα περιλαμβάνονται οι εντεροϊοί, οι ιοί του απλού έρπητα τύπου 2 (και λιγότερο συχνά τύπου 1), ο ιός της ανεμοβλογιάς - έρπητα ζωστήρα, ο ιός της παρωτίτιδας, ο HIV και ο ιός της λεμφοκυτταρικής χοριομηνιγγίτιδας κ.α. Ωστόσο οι εντεροϊοί αποτελούν τη πιο κοινή αναγνωρίσιμη αιτία πρόκλησης άσηπτης μηνιγγίτιδας καθώς ευθύνονται για το 75-90% των περιπτώσεων.

## 2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

*Ένα συνεκτικό και λειτουργικό σύστημα κατηγοριοποίησης, μια ταξινόμηση, αποτελεί ένα καθοριστικό συντελεστή του τομέα/της επιστήμης της ιολογίας (Knipe and Howley, 2007)*

Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών, 25 οικογένειες ιών κατατάσσονται σε 7 τάξεις: *Caudovirales*, *Herpesvirales*, *Ligamenvirales*, *Mononegavirales*, *Nidovirales*, *Picornavirales* και *Tymovirales* ενώ υπάρχουν 71 οικογένειες που δεν έχουν ακόμη καταταχθεί σε κάποια τάξη.

Η τάξη των *Picornavirales* περιλαμβάνει τις οικογένειες *Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Marnaviridae*, *Picornaviridae*, *Secoviridae* καθώς και μια οικογένεια με τα δύο μη προσδιορισμένα γένη *Bacillarnavirus* και *Labyrnavirus*. Η οικογένεια των *Picornaviridae* σήμερα αποτελείται από 37 είδη τα οποία ομαδοποιούνται σε 17 γένη (*Knowles et al., 2012*) (*Adams et al., 2013*) (πίνακας 1).

Τα μέλη της οικογένειας *Picornaviridae* είναι ιοί με χαρακτηριστικά τους το μικρό μέγεθος (pico:μικρός + RNA + virus:ιός), την έλλειψη ελύτρου (εξωτερικό περίβλημα) και το θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA.

Κάθε γένος διακρίνεται από τα υπόλοιπα με βάση ομοιότητες στις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιοσωματίου, την αλληλουχία του γονιδιώματος καθώς και στην οργάνωση αυτού. Σε κάθε γένος τα είδη διαχωρίζονται σύμφωνα με την αντιγονικότητα των στελεχών τους σε ορότυπους. Το γένος των εντεροϊών περιλαμβάνει 12 είδη και 306 ορότυπους (*Nishimura and Shimizu, 2012*), (*Brown et*

*al.*, 2003), (Savolainen *et al.*, 2002), (Blomqvist *et al.*, 2002), (Ishiko *et al.*, 2002 Ryan *et al.*, 1990), (Nollens *et al.*, 2009), (Smyth *et al.*, 1995), (Liu *et al.*, 2000), (Oberste *et al.*, 2002), (Pöyry *et al.*, 1999), (McIntyre *et al.*, 2013), (Arden *et al.*, 2006), (Kistler *et al.*, 2007), (Lamson *et al.*, 2006), (Lau *et al.*, 2007), (Lee *et al.*, 2007), (McErlean *et al.*, 2007), (McErlean *et al.*, 2008), (Simmonds *et al.*, 2010) (πίνακας 2).

<b>Οικογένεια</b>	<b>Γένος</b>
<i>Picornaviridae</i>	<i>Apthovirus</i> (4 είδη)
	<i>Aquamavirus</i> (1 είδος)
	<i>Avihepatovirus</i> (1 είδος)
	<i>Cardiovirus</i> (2 είδη)
	<i>Cosavirus</i> (1 είδος)
	<i>Dicipivirus</i> (1 είδος)
	<i>Enterovirus</i> (12 είδη)
	<i>Erbovirus</i> (1 είδος)
	<i>Hepatovirus</i> (1 είδος)
	<i>Kobuvirus</i> (3 είδη)
	<i>Megrivirus</i> (1 είδος)
	<i>Parechovirus</i> (2 είδη)
	<i>Salivirus</i> (1 είδος)
	<i>Sapelovirus</i> (3 είδη)
	<i>Senecavirus</i> (1 είδος)
<i>Teschovirus</i> (1 είδος)	

**Πίνακας 2-1: Ταξινόμηση των μελών της οικογένειας Picornaviridae**

Γένος	Είδος (αριθμός οροτύπων)	ορότυποι
Enterovirus	<i>Enterovirus A</i> (24)	<i>coxsackievirus A2 (CV-A2), CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, enterovirus A71 (EV-A71), EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A92, EV-A114, EV-A119, EV-A120, simian enteroviruses SV19, SV43, SV46, baboon enterovirus A13 (BA13)</i>
	<i>Enterovirus B</i> (61)	<i>coxsackievirus B1 (CV-B1), CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, incl. SVDV), CV-B6, CV-A9, echovirus 1 (E-1; incl. E-8), E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9 (incl. CV-A23), E-11, E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, E-17, E-18, E-19, E-20, E-21, E-24, E-25, E-26, E-27, E-29, E-30, E-31, E-32, E-33, enterovirus B69 (EV-B69), EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81, EV-B82, EV-B83, EV-B84, EV-B85, EV-B86, EV-B87, EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110 (from a chimpanzee), EV-B111, simian enterovirus SA5</i>
	<i>Enterovirus C</i> (23)	<i>poliovirus (PV) 1, PV-2, PV-3, coxsackievirus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117, EV-C118</i>
	<i>Enterovirus D</i> (5)	<i>EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111 (from both humans &amp; chimpanzees) and EV-D120 (from gorillas). Human rhinovirus (HRV) 87 has been reclassified as a strain of EV-D68</i>
	<i>Enterovirus E</i> (4)	<i>EV-E1 to EV-E4</i>
	<i>Enterovirus F</i> (6)	<i>EV-F1 to EV-F6</i>
	<i>Enterovirus G</i> (11)	<i>EV-G1 to EV-G11</i>
	<i>Enterovirus H</i> (1)	<i>EV-H1</i>
	<i>Enterovirus J</i> (6)	<i>SV6, EV-J103, EV-J108, EV-J112, EV-J115, EV-J121</i>
	<i>Rhinovirus A</i> (80)	<i>rhinovirus (RV) A1, A2, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A15, A16, A18, A19, A20, A21, A22, A23, A24, A25, A28, A29, A30, A31, A32, A33, A34, A36, A38, A39, A40, A41, A43, A45, A46, A47, A49, A50, A51, A53, A54, A55, A56, A57, A58, A59, A60, A61, A62, A63, A64, A65, A66, A67, A68, A71, A73, A74, A75, A76, A77, A78, A80, A81, A82, A85, A88, A89, A90, A94, A96, A100, A101, A102, A103, A104, A105, A106, A107, A108, A109</i>
<i>Rhinovirus B</i>	<i>rhinovirus (RV) B3, B4, B5, B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69,</i>	

	(32)	B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91, B92, B93, B97, B99, B100, B101, B102, B103, B104, B105 & B106
	Rhinovirus C (53)	rhinovirus (RV) C1-C53

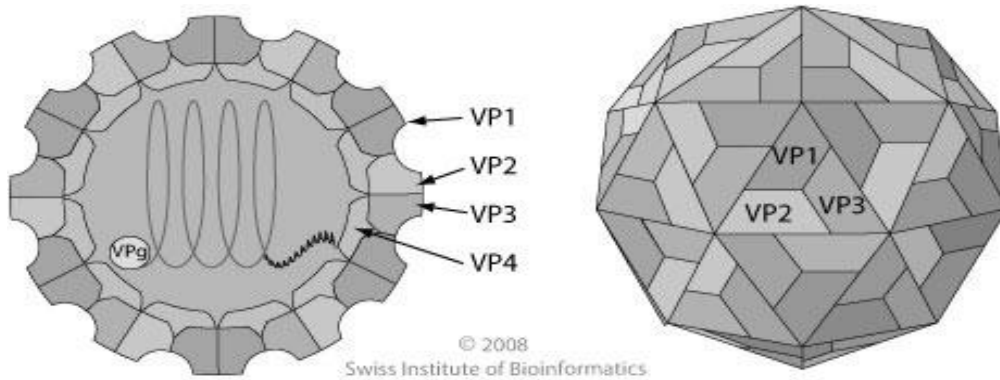
Πίνακας 2-2: Ταξινόμηση όλων των οροτύπων του γένους των εντεροϊών

### 3 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

#### 3.1 Δομή καψιδίου

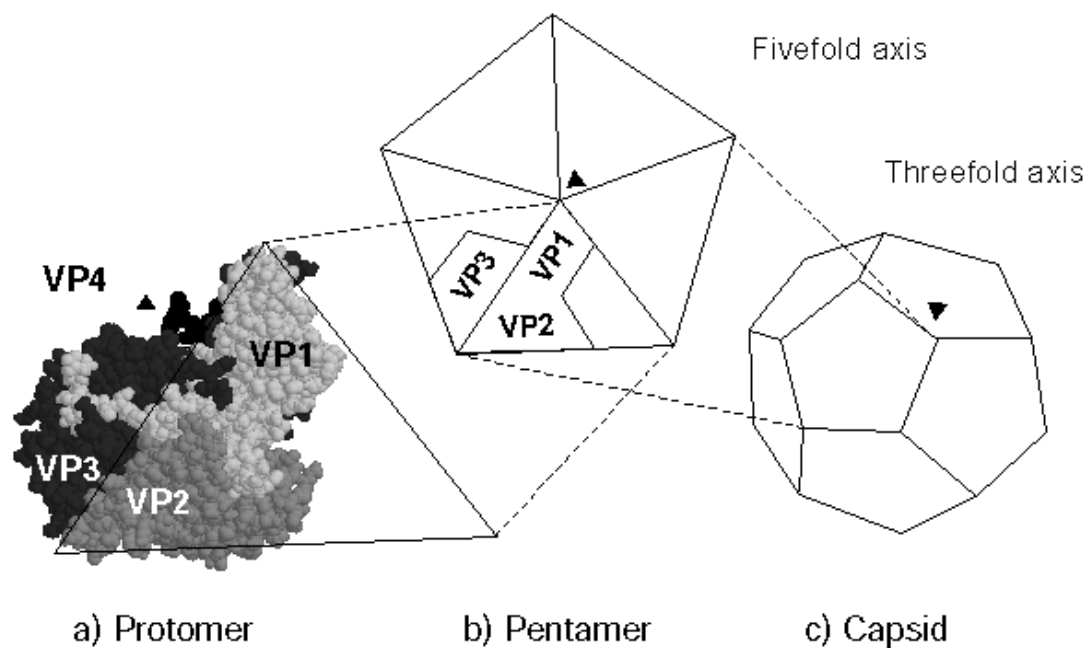
Τα ιικά σωματίδια των εντεροϊών είναι σφαιρικά και έχουν διάμετρο περίπου 30nm. Τα σωματίδια αποτελούνται από πρωτεϊνικό περίβλημα που προστατεύει το γονιδίωμα του ιού και δεν περιλαμβάνουν λιπιδικό έλυτρο. Το καψίδιο των εντεροϊών παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον ( $\text{pH} \leq 3$ ) επιτυγχάνοντας έτσι την πρόσβαση στο έντερο, όπου και πολλαπλασιάζονται, μέσω του στομάχου.

Το ικό καψίδιο είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας και αποτελείται από 60 αντίγραφα των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες είναι προϊόντα της πρωτεόλυσης της ιικής πολυπρωτεΐνης (Rueckert R.R., 1985). Κατά την πρωτεόλυση η P1 πρόδρομη πρωτεΐνη του καψιδίου τεμαχίζεται στα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3 και VP1 τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν το πρωτομερές (VP0, VP3 και VP1). Στη συνέχεια τα πρωτομερή συσσωματώνονται ώστε να σχηματιστεί ένα πενταμερές [(VP0, VP1, VP3)<sub>5</sub>]. Κατόπιν δώδεκα πενταμερή επιστρατεύονται για το σχηματισμό του προκαψιδίου [(VP0,VP3,VP1)<sub>5</sub>]<sub>12</sub>. Κατά το στάδιο της καψιδίωσης, όταν δηλαδή το RNA «πακετάρεται» στα ιικά σωματίδια και πραγματοποιείται το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του γενετικού υλικού, η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 διασπάται στις VP2 και VP4. Η VP4 είναι η μικρότερη καψιδιακή πρωτεΐνη, εντοπίζεται στο εσωτερικό του καψιδίου και δεν εκτίθεται στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου. Πέντε VP4 μονομερή σχηματίζουν στο εσωτερικό του σωματιδίου ένα υδρόφοβο περιβάλλον, που καθοδηγεί τη συναρμολόγηση ενός πενταμερούς. Την εξωτερική πλευρά του καψιδίου απαρτίζουν οι VP1, VP2 και VP3 (Stanway G., 1990).



Εικόνα 3-1: δομή ιοσώματος, δομή καψιδίου

Χαρακτηριστικό του καψιδίου είναι η 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 άξονας (2x) συμμετρίας. Πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω απ τον τριμερή άξονα συμμετρίας.



Εικόνα 3-2: πενταμερής άξονας συμμετρίας (fivefold axis), τριμερής άξονας συμμετρίας (threefold axis), α) πρωτομερές, β) πενταμερές, γ) καψίδιο

Τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα πολύπλοκο δίκτυο με τη VP4, η οποία είναι συνδεδεμένη με το μυριστικό οξύ στο αμινοτελικό της άκρο.

Η ποικιλία στους ορότυπους των ιών καθορίζεται από τις θηλιές των καψιδιακών πρωτεϊνών, οι οποίες προεξέχουν στην επιφάνεια του καψιδίου. Τα καρβοξυτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις

θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Χαρακτηριστικό αυτών των περιοχών είναι ο υψηλός ρυθμός μεταλλάξεων, παρέχοντας έτσι αντιγονική ποικιλία στους εντεροϊούς (*Minor et al., 1986*).

Μια βαθιά επιφανειακή κοιλότητα που είναι γνωστή ως αύλακα (canyon) περιβάλλει μια προεξοχή (plateau) σχήματος αστεριού στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας και αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό του υποδοχέα. Η αύλακα φέρει στο εσωτερικό της, κατάλληλες περιοχές που μπορούν να συνδεθούν με υποδοχείς του κυττάρου-ξενιστή και έτσι μπορεί ο ιός να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου (*Blondel et al., 1998*). Επιπρόσθετα, η αύλακα είναι μικρή σε μέγεθος και δεν επιτρέπει την αναγνώριση των εσωτερικών περιοχών της από ογκώδη αντισώματα, προσφέροντας στον ιό μια στρατηγική για την αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης από τον ξενιστή (*Stanway, 1990*). Οι περιοχές στο εσωτερικό της αύλακας λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασής τους με τους κυτταρικούς υποδοχείς, διατηρούνται φυλογενετικά μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Αντίθετα, περιοχές του ιικού καψιδίου με μικρή λειτουργική σημασία για τον ιό, παραμένουν στερεοδομικά απροστάτευτες στην περιφέρεια της αύλακας και λειτουργούν ως επίτοποι. Αν και οι επίτοποι αυτοί βρίσκονται σε σημεία προσιτά στα αντισώματα, η ανοσολογική αντίδραση μπορεί να αποφευχθεί χάρη στη μεταβλητότητα των περιοχών αυτών, με αποτέλεσμα την εξέλιξη νέων οροτύπων.

### **3.2 Οργάνωση ιικού γονιδιώματος**

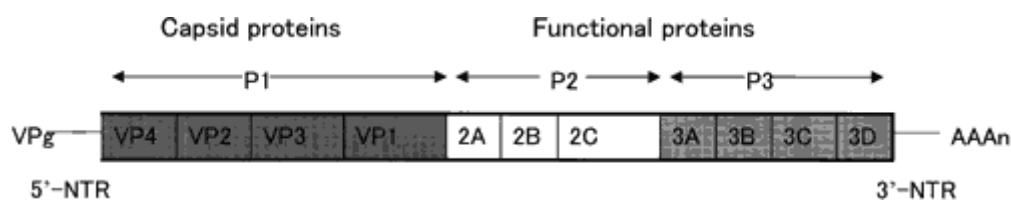
Το γένωμα των εντεροϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας, το μήκος του οποίου είναι περίπου 7.500 νουκλεοτίδια (*Melnick J.L., 1990*).

Το γένωμα του ιού αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές: την 5' μη κωδική περιοχή (5' untranslated region – 5'UTR), το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame – ORF) και την 3' μη κωδική περιοχή (3' untranslated region – 3'UTR).

Το γένωμα των picorna ιών είναι μοναδικό, γιατί στο άκρο της 5' μη κωδικής περιοχής αντί της συνηθισμένης μεθυλιωμένης καλύπτρας είναι προσδεμένη μια μικρή ιική πρωτεΐνη, η VPg, η οποία πιστεύεται ότι συμβάλλει στον εγκλεισμό του

γονιδιώματος στο καψίδιο (*Nomoto et al., 1977*). Η VPg είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη, με δεσμό O<sub>4</sub>-(5'-ουριδύλιο)-τυροσίνης, με το 5'-ουριδυλιωμένο τμήμα του ιικού RNA. Η τυροσίνη που είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA είναι πάντα το τρίτο αμινοξύ πριν το N-άκρο. Αναλυτικότερα, η σύνδεση αυτή επιτυγχάνεται με το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της μονοφωσφορικής ομάδας στο 5' άκρο του ιικού γονιδιώματος με το τελικό νουκλεοτίδιο ουρακίλης του RNA και με ένα κατάλοιπο τυροσίνης της ιικής πρωτεΐνης VPg (*Wimmer et al. 1993*).

Το τμήμα του γενετικού υλικού προς το 5' άκρο χαρακτηρίζεται από την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' untranslated region – 5'UTR ή 5' non-coding region – 5'NCR). Ακολουθεί το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που περιέχει τις πληροφορίες για τις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Στο 3' άκρο του γονιδιώματος υπάρχει μια 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' untranslated region – 3'UTR ή 3' non-coding region – 3'NCR) που ακολουθείται από μία πολυαδενυλιωμένη περιοχή (poly(A)-tract).



Εικόνα 3-3: οργάνωση του γονιδιώματος των εντεροϊών

### 3.2.1 5' μη κωδική περιοχή (5' untranslated region – 5'UTR)

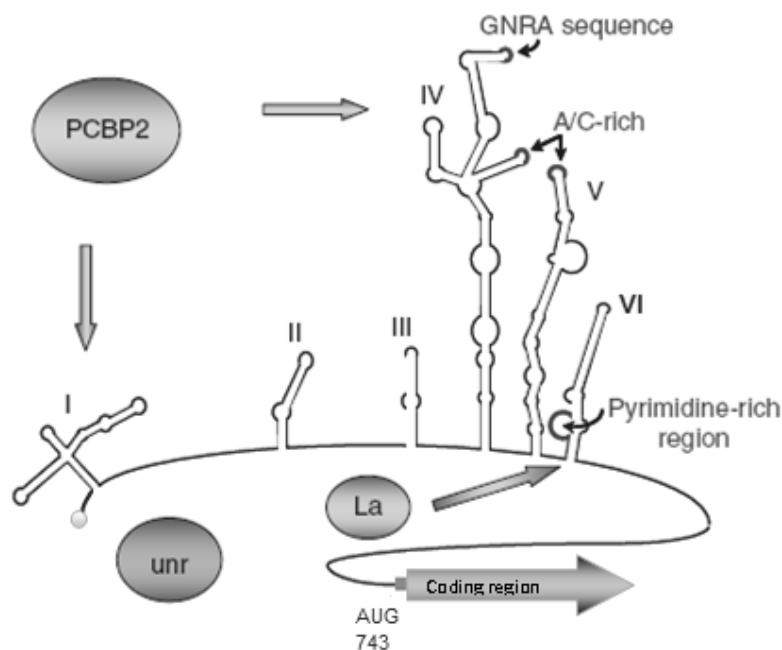
Η 5' μη κωδική περιοχή των εντεροϊών, και γενικά των Picorna ιών, είναι μεγαλύτερη σε μήκος σε σύγκριση με αντίστοιχες 5'UTR άλλων κυττάρων ή ιών και αποτελεί το 8-12% του γενετικού υλικού των Picorna ιών. Μεταξύ κοντινών φυλογενετικά ιών η 5'UTR παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία των βάσεων, καθώς περιέχει μεγάλα τμήματα νουκλεοτιδίων που διατηρούνται πλήρως ή μερικώς από είδος σε είδος (*Stanway et al., 1984*). Αυτό υποδηλώνει ότι η 5'UTR επηρεάζει την παθογένεια του ιού, η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων αυτής της περιοχής. Οι συντηρημένες αυτές αλληλουχίες της 5'UTR εμπλέκονται στον εγκλεισμό του RNA στο ιικό καψίδιο και στον πολλαπλασιασμό του ιού. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό της 5'UTR των εντεροϊών είναι ότι έχει διαφορετική σύσταση νουκλεοτιδίων από το υπόλοιπο γένωμα. Περιέχει χαμηλότερο ποσοστό νουκλεοτιδίων με αζωτούχες βάσεις την αδερίνη και την θυμίνη (A+T) και σημαντικά υψηλότερο ποσοστό νουκλεοτιδίων

με αζωτούχες βάσεις τη γουανίνη και την κυτοσίνη (G+C) (Stanway *et al.*, 1984), γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη δευτεροταγούς δομής (Palmenberg A.C., 1987).

Η 5'UTR έχει μέγεθος περίπου 750 νουκλεοτιδίων και αποτελείται από επτά δομικά στοιχεία (domain I – VII) και διαιρείται σε τρία επιμέρους τμήματα (φουρκέτες): την περιοχή cloverleaf (domain I), η οποία αποτελείται από τα πρώτα 88 νουκλεοτίδια, την περιοχή IRES (Internal Ribosomal Entry Site-Εσωτερική Θέση Πρόσδεσης του Ριβοσώματος) (domain II-VI), η οποία αποτελείται από τα νουκλεοτίδια 127 έως 608, και την περιοχή (domain VII) που περιέχει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης.

Το cloverleaf αποτελεί μια δομή με σχήμα τριφυλλιού και cis-δραστικότητα, η οποία είναι σημαντική τόσο για τη σταθερότητα του RNA όσο και για την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας (Melchers *et al.*, 2006).

Το IRES είναι ένα στοιχείο με cis-δραστικότητα και είναι υπεύθυνο για τη μετάφραση και τη μολυσματικότητα του ιού (Kauder and Racaniello, 2004). Πιο συγκεκριμένα, τα ριβοσώματα και οι κυτταρικοί παράγοντες της μετάφρασης, αρχικά προσδένονται στο εσωτερικό του IRES και στη συνέχεια μετακινούνται μέχρι το κωδικόνιο έναρξης ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης.



Εικόνα 3-4: Διαγραμματική απεικόνιση των cloverleaf (domain I) και IRES (domains II-VI).



### **3.2.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)**

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη περίπου 2100 κωδικονίων, η οποία χωρίζεται στις P1 (δομικές πρωτεΐνες), P2 και P3 (λειτουργικές πρωτεΐνες) περιοχές. Για το διαχωρισμό της σε αυτές τις τρεις περιοχές η πολυπρωτεΐνη διασπάται αυτοκαταλυτικά από δύο ικές πρωτεάσες: την 2A (*Toyoda et al., 1986*), που επιτελεί τον αρχικό διαχωρισμό μεταξύ δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών, και την 3C, που εκτελεί την υπόλοιπη επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης (*Marcotte et al., 2007*). Η πολυπρωτεΐνη περιέχει πληροφορίες για τις τέσσερις δομικές (VP1-VP4), και για τις επτά λειτουργικές (2A-2C και 3A-3D) πρωτεΐνες του ιού, καθώς και για τις ενδιάμεσες ικές πρωτεΐνες όπως οι VP0, 2BC, 3AB και 3CD (*Knipe and Howley, 2007*).

#### **3.2.2.1 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) - δομική περιοχή (P1)**

Στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης η δομική περιοχή (P1) κωδικοποιεί για τις ικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες αποτελούν τα δομικά στοιχεία του ιικού καψιδίου. Η γενωμική περιοχή P1 παρέχει αξιόπιστη συσχέτιση της αλληλουχίας με τον ορότυπο. Μοριακές μελέτες υποδεικνύουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής ως κατάλληλο μέσο για την ταυτοποίηση των διαφόρων οροτύπων εντεροϊών (*Oberste et al., 1999*).

#### **3.2.2.2 ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) - λειτουργικές πρωτεΐνες**

Στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης οι μη δομικές περιοχές P2 και P3 κωδικοποιούν για τις λειτουργικές πρωτεΐνες, οι βασικές επτά των οποίων είναι οι: 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D, ενώ σε μερικές περιπτώσεις απαιτούνται και τα λειτουργικά ενδιάμεσα των πρωτεϊνών αυτών (2BC, 3AB, 3CD) (*Stanway G., 1990*).

Η 2A πρωτεάση (2A<sup>Pro</sup>) πραγματοποιεί το πρωταρχικό ρήγμα στην πολυπρωτεΐνη, διαχωρίζοντας τις περιοχές P1-P2 και κατά συνέπεια τις πρόδρομες δομικές πρωτεΐνες από τις λειτουργικές (*Toyoda et al., 1986*). Επιπλέον, εμπλέκεται στην αντιγραφή του ιικού RNA, διεγείροντας την έναρξη σύνθεσης της αρνητικής του αλυσίδας (*Jurgens et al., 2006*) και ευθύνεται για την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου ξενιστή (*Park et al., 2008*).

Η 2B πρωτεΐνη εμπλέκεται σε αρχικό στάδιο της σύνθεσης του ιικού RNA (*Cuconati et al., 1998*) και έχει την ικανότητα να αυξήσει τη διαπερατότητα των μεμβρανών (*Madan et al., 2008*).

Η 2C πρωτεΐνη είναι μια ελικάση που συμμετέχει στη δημιουργία του συμπλόκου αντιγραφής και στη σταθεροποίησή του στις μεμβράνες του κυττάρου-ξενιστή (Bienz *et al.*, 1990, Teterina *et al.*, 2006). Συμβάλλει ακόμη, στον πολλαπλασιασμό του ιού (Pfister and Wimmer, 1999) και στον προσδιορισμό της δομής του καψιδίου του (Li and Baltimore, 1990).

Η 2BC πρωτεΐνη είναι το πρόδρομο μόριο των 2B και 2C πρωτεϊνών και προκαλεί την αναδιάταξη των μεμβρανών του ενδοπλασματικού δικτύου καθώς και τη δημιουργία κυστιδίων, όπου λαμβάνει χώρα η ιική αντιγραφή (Paul *et al.*, 1998).

Η 3A πρωτεΐνη επάγει αλλαγές στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου καθώς και στο σχηματισμό των κυστιδίων για την ιική αντιγραφή (Belon *et al.*, 2007). Επιπλέον, εμπλέκεται στη σύνθεση της θετικής αλυσίδας του ιικού RNA και στη σωστή επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης (Towner *et al.*, 2003). Τέλος, επιδρά στο εκκριτικό σύστημα του κυττάρου-ξενιστή εμποδίζοντας τη μεταφορά των πρωτεϊνών του από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi, σε συνεργασία με τις 2B και 2BC (Doedens *et al.*, 1997).

Η VPg πρωτεΐνη κωδικοποιείται από την περιοχή 3B και είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του ιικού RNA. Λαμβάνει μέρος στη διαμόρφωση του ιικού καψιδίου και χρησιμεύει ως μόριο-εκκινητής στην αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος (Paul *et al.*, 1998).

Η 3AB πρωτεΐνη φαίνεται να συμβάλλει στην έναρξη της σύνθεσης του RNA με τη σταθεροποίηση της VPg στις μεμβράνες. Διεγείρει τη δράση της ιικής πολυμεράσης (Richards and Ehrenfeld, 1998) και την πρωτεολυτική ενεργότητα της 3CD πρωτεάσης (Molla *et al.*, 1994).

Η 3C πρωτεΐνη (3C<sup>pro</sup>) πραγματοποιεί την πληθώρα των πρωτεολυτικών διασπάσεων της ιικής πολυπρωτεΐνης (Marcotte *et al.*, 2007). Διεγείρει την ιική μετάφραση αλλά μπορεί και να την μπλοκάρει με την πρόσδεσή της στο IRES και να αναστείλει την κυτταρική μεταγραφή και μετάφραση (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2004).

Η 3D πολυμεράση (3D<sup>pol</sup>) είναι μια RNA εξαρτώμενη πολυμεράση και είναι το κύριο ένζυμο για την αντιγραφή του ιού χρησιμοποιώντας τη VPg πρωτεΐνη ως εκκινητικό μόριο. Επιπλέον, έχει δραστηριότητα ελικάσης (Pfister *et al.*, 1999).

Η 3CD πρωτεΐνη (3CD<sup>pro</sup>) έχει δράση πρωτεάσης (Marcotte et al., 2007). Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ιική αντιγραφή (Belon et al., 2007) και έχει την ικανότητα να αυτοκαταλύεται στον πυρήνα του κυττάρου σε 3C και 3D, με την 3C να πρωτεολύει μεταγραφικούς παράγοντες, εμποδίζοντας τελικά τη μεταγραφή στο κύτταρο (Weidmann et al., 2003).

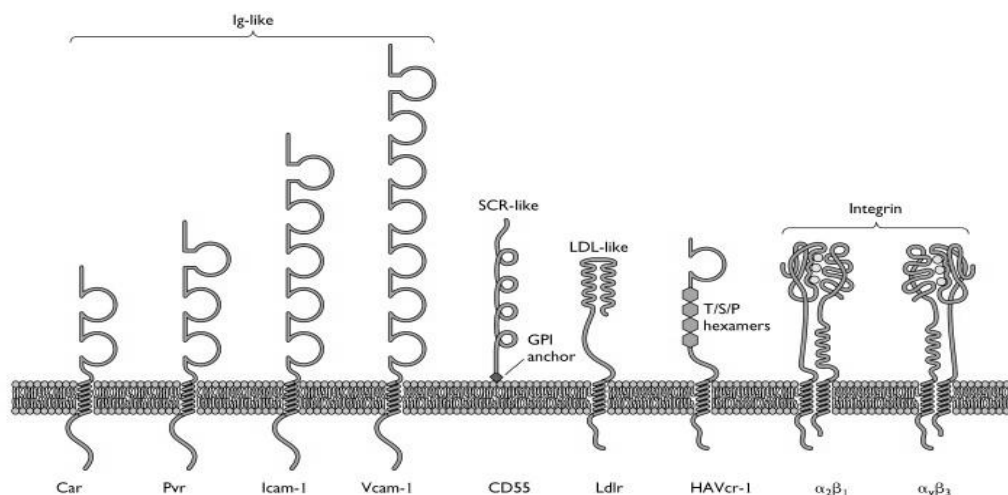
### 3.2.3 3' μη κωδική περιοχή (3' untranslated region - 3'UTR)

Η 3' μη κωδική περιοχή στο γένωμα των εντεροϊών, και γενικά των Picorna ιών, εντοπίζεται μετά το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Σε αυτήν την περιοχή περιλαμβάνεται μία χαρακτηριστική RNA δευτεροταγή δομή θηλιάς. Στο 3' άκρο της φέρει μια poly-(A)-ουρά (Melnick, 1996). Το τμήμα αυτό φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού και στη μολυσματικότητά του (Rohll et al., 1995). Η 3'UTR αποτελεί βασικό κομμάτι στη ρύθμιση της ικής μετάφρασης, αλληλεπιδρώντας με το στοιχείο IRES (Todd et al. 1995).

## 4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι εντεροϊοί εισβάλλουν στο κύτταρο-ξενιστή μέσω μιας μεγάλης ποικιλίας υποδοχέων και μηχανισμών εισόδου, σημαίνοντας έτσι την έναρξη του παθογόνου τους κύκλου. Οι υποδοχείς εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή, ενώ συμμετέχουν και στις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Τα μόρια στόχοι-υποδοχείς στις επιφάνειες των κυττάρων-ξενιστών είναι κατά κανόνα γλυκοπρωτεΐνες ή και γλυκολιπίδια. Η πλειονότητα των υποδοχέων των εντεροϊών συνδέεται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3 στην αύλακα που σχηματίζεται (Rossmann, 1994). Η δομή των υποδοχέων είναι παρόμοια και περιέχουν μια σειρά από περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών. Τέτοιοι υποδοχείς είναι οι ICAM-I (intracellular adhesion molecule-1), ο οποίος έχει βρεθεί ότι συνδέεται με τον Coxsackie A21, CAR (Coxsackie-Adenovirus Receptor), ο οποίος συμμετέχει στην είσοδο των Coxsackie B ιών στο κύτταρο-ξενιστή (Selinka Hans-Christoph, 1998) και στην έναρξη του κύκλου ζωής του ιού (Yongning et al., 2001) και ο PVR (Poliovirus Receptor), ο οποίος συνδέεται με τους πολιοϊούς. Με τη σύνδεσή τους στο καψίδιο του ιού προκαλούν αναδιάταξη του καψιδίου και απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κύτταρο ξενιστή (Rossmann, 1994). Υπάρχουν βέβαια και ιοί που δεν συνδέονται στην αύλακα, αλλά εξωτερικά αυτής και δεν αποσταθεροποιούν το ικό καψίδιο. Ένας τέτοιος υποδοχέας είναι ο DAF

(Decay-Acceleration Factor ή CD55), στον οποίο προσδένονται ορισμένοι Echo και Coxsackie B ιοί (*Bergelson et al., 1994*). Η αλληλεπίδραση ενός εντεροϊού με τον υποδοχέα δεν είναι πάντα επαρκής για τη είσοδό του στο κύτταρο και απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου μορίου ή υποδοχέα (συνυποδοχέα).

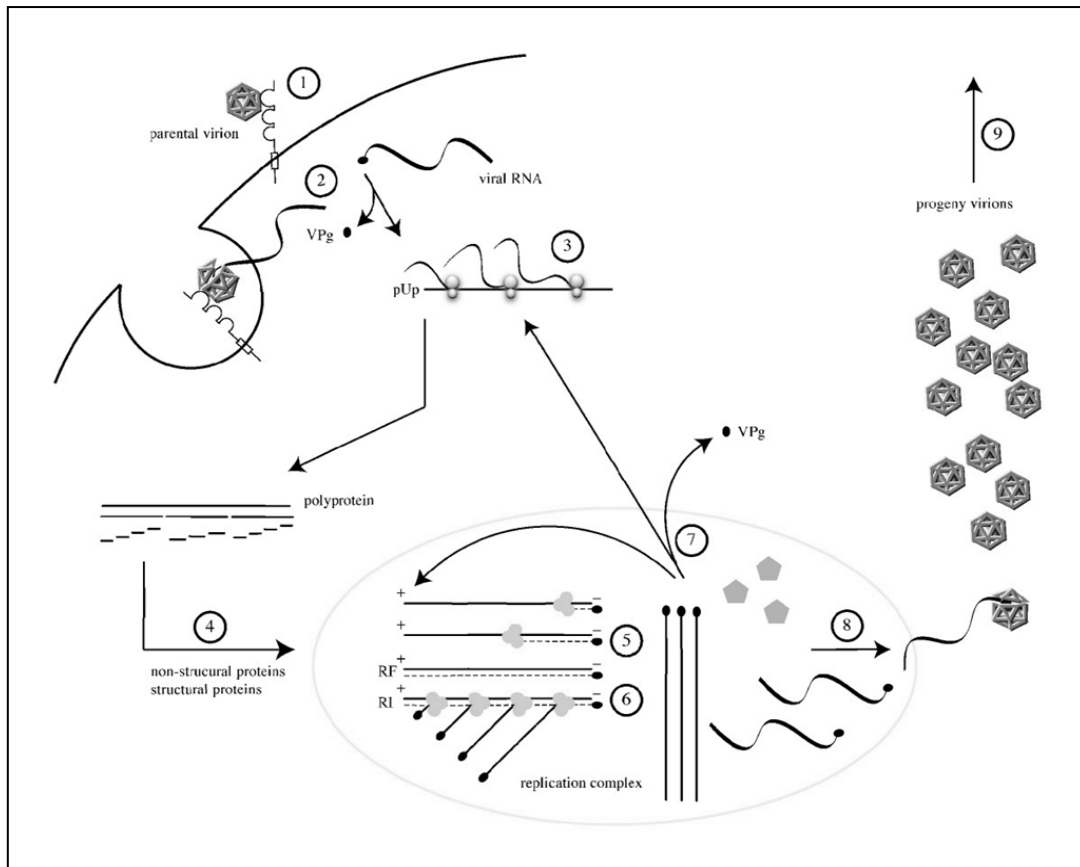


Εικόνα 4-1: οι υποδοχείς των *picorna* ιών

## 5 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Τα κύρια στάδια του κύκλου ζωής των εντεροϊών είναι κοινά με αυτά των υπολοίπων θετικής πολικότητας RNA ιών. Όπως φαίνεται και στην εικόνα διακρίνονται τα εξής βασικά στάδια:

1. Πρόσδεση του εντεροϊού στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος στο κύτταρο-ξενιστή (διείσδυση) με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης.
2. Απέκδυση του ιικού γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή.
3. Μετάφραση του ιικού RNA θετικής πολικότητας, που δρα ως mRNA.
4. Πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης.
5. Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος.
6. Μετάφραση των νεοσυντιθέμενων-θετικής πολικότητας-μορίων RNA.
7. Συναρμολόγηση των ιικών καψιδίων και εγκαψιδίωση νεοσυντιθέμενων-θετικής πολικότητας-μορίων RNA.
8. Ωρίμανση των ιικών σωματίων.
9. Ο ιός γίνεται μεταδοτικός.



Εικόνα 5-1: κύκλος ζωής εντεροϊών

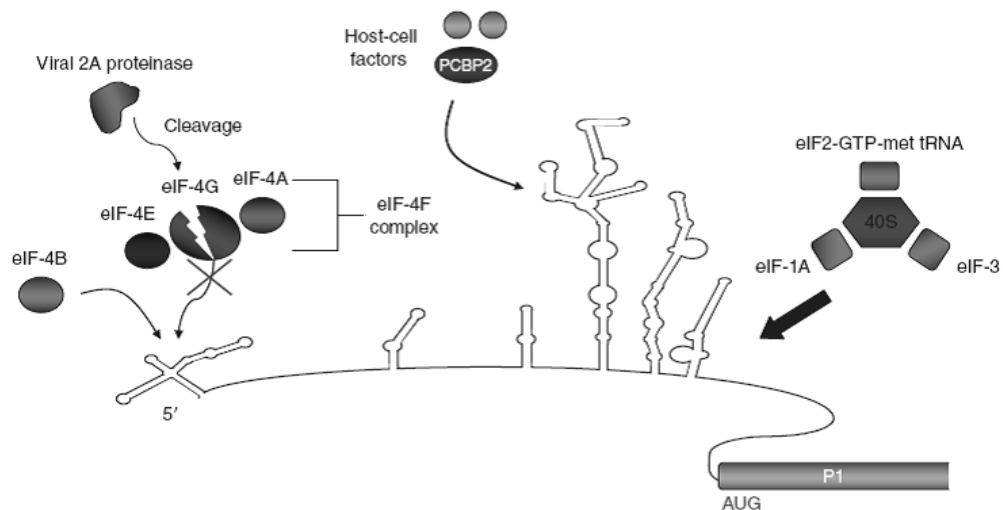
### 5.1 Πρόσδεση-Διείσδυση-Απέκδυση

Προκειμένου ο ιός να εισέλθει στο κύτταρο ξενιστή πρέπει να συνδεθεί με τον υποδοχέα (ή και τον συνυποδοχέα) του. Οι περισσότεροι κυτταρικοί υποδοχείς συνδέονται με θέσεις αλληλεπίδρασης οι οποίες εντοπίζονται στις αύλακες των εντεροϊών. Συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP4 στη σχηματιζόμενη αύλακα συνδέονται με υποδοχείς που έχουν μια σειρά από περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών (Rossmann, 1994). Μετά την πρόσδεση ακολουθούν αλλαγές στη δομή του καψιδίου προκειμένου να απελευθερωθεί το ιικό RNA στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Σημειώνεται πως σε μερικές περιπτώσεις οι αλλαγές αυτές επάγονται από τον ίδιο τον υποδοχέα. Η είσοδος του ιού στο κύτταρο φυσιολογικά συμβαίνει λίγη ώρα μετά την πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα του στην κυτταρική μεμβράνη. Για τους εντεροϊούς έχουν προταθεί τα ακόλουθα δύο μοντέλα εισόδου στο κύτταρο-ξενιστή: α) μέσω ενδοκύττωσης και αλλαγής της στερεοδιαμόρφωσης των καψιδιακών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του θετικής πολικότητας RNA στο κυτταρόπλασμα και β) μέσω ενδοκύττωσης, εγκλεισμού του νουκλεοκαψιδίου σε κυστίδιο (ενδόσωμα), αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης των

καψιδιακών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του θετικής πολικότητας RNA στο κυτταρόπλασμα μέσω του ενδοσώματος. Η απελευθέρωση του γονιδιώματος του ιού είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συνυποδοχέα.

## 5.2 Μετάφραση

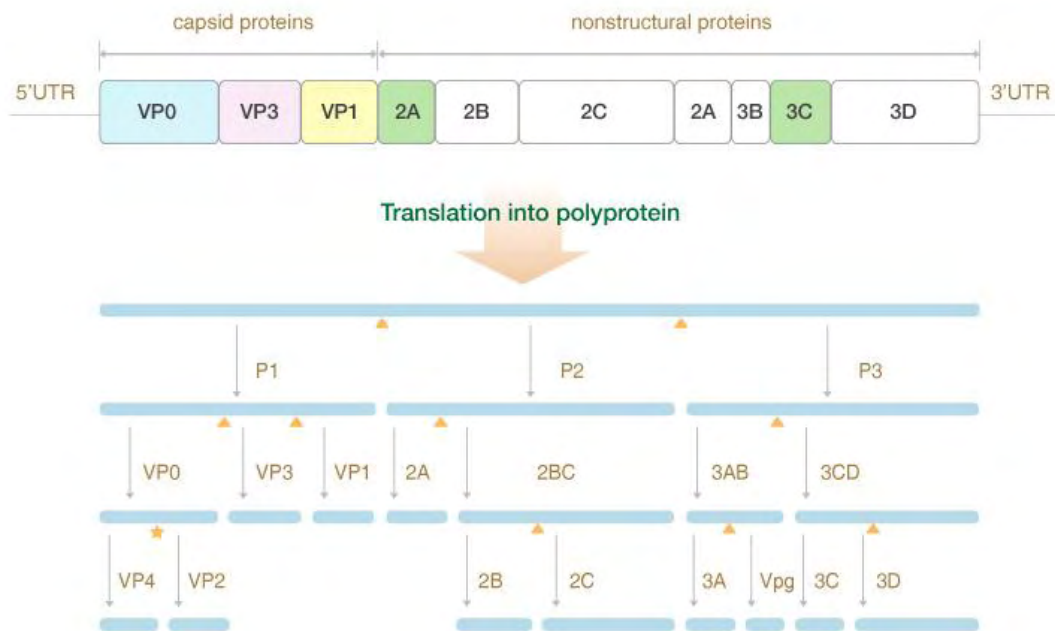
Από τη στιγμή που το θετικής πολικότητας RNA γένωμα του ιού απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα, πρέπει να μεταφραστεί επειδή δεν μπορεί να αντιγραφεί από καμία κυτταρική RNA πολυμεράση και ο ιός δε μεταφέρει στο κύτταρο κανένα ιικό ένζυμο μέσω του καψιδίου. Το 5' άκρο των εντεροϊών δε φέρει καλύπτρα και επομένως δεν αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα κατά τον ίδιο τρόπο. Στο 5' άκρο είναι χαρακτηριστική η ύπαρξη της VPg πρωτεΐνης. Τα ριβοσώματα χρησιμοποιούν μια εσωτερική θέση δέσμησης στο 5' άκρο (Internal Ribosome Entry Site – IRES), όπου προσδένεται η 40S υπομονάδα του ριβοσώματος και ξεκινάει η μετάφραση. Η έναρξη της μετάφρασης ελέγχεται από το IRES. Στην έναρξη της μετάφρασης των εντεροϊών εμπλέκονται οι ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης (eIFs) (*Ochs et al., 2002*), με εξαίρεση τον eIF4E ο οποίος αναγνωρίζει και προσδένεται στην καλύπτρα (cap). Έχει προταθεί ότι κατά την μετάφραση του ιικού RNA, ο παράγοντας eIF4G1 αλληλεπιδρά απευθείας με το mRNA στην περιοχή IRES και κατόπιν συνδέεται με τον παράγοντα eIF4A προάγοντας την συναρμολόγηση του 48S συμπλόκου. Τελικά, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα αφού προσδεθεί στο mRNA κινείται με κατεύθυνση 5'-3' κατά μήκος του ώσπου να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης (*Prevot et al., 2003*). Εκτός από τους παράγοντες eIFs, στο IRES στοιχείο των εντεροϊών προσδένονται και κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες ενισχύουν την μετάφραση ή ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιικού RNA. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια τεμαχίζεται παράγοντας τις δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού.



Εικόνα 5-2: Ιικοί και κυτταρικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην cap-ανεξάρτητη RNA μετάφραση των Εντεροϊών

### 5.3 Πρωτεολυτική επεξεργασία ικής πολυπρωτεΐνης

Η πολυπρωτεΐνη που παράγεται είναι ασταθής και θα υποστεί πρωτεολυτική επεξεργασία για τη δημιουργία των δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών του ιού. Για τον τεμαχισμό της πολυπρωτεΐνης, είναι υπεύθυνες οι ικές πρωτεάσες 2A<sup>pro</sup>, 3C<sup>pro</sup> και 3CD<sup>pro</sup>, οι οποίες κωδικοποιούνται από τον ιό. Η πρωτεόλυση από την 2A<sup>pro</sup> συμβαίνει σε δεσμούς Tyr-Gly από τις 3C<sup>pro</sup> και 3CD<sup>pro</sup> συμβαίνει σε δεσμούς Gln-Gly. Η επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης πραγματοποιείται σε τρία στάδια μόλις ολοκληρωθεί η μετάφραση. Η πρώτη τομή δημιουργεί την P1 περιοχή, που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του καψιδίου και καταλύεται από την πρωτεάση 2A<sup>pro</sup>. Το δεύτερο στάδιο της πρωτεολυτικής επεξεργασίας περιλαμβάνει τη δράση των πρωτεασών 3C<sup>pro</sup> και 3CD<sup>pro</sup> και είναι απαραίτητο για τη δημιουργία των δομικών πρωτεϊνών από την P1 περιοχή και των λειτουργικών πρωτεϊνών από τις P2 και P3 περιοχές. Τέλος, η VP0 διασπάται αυτοκαταλυτικά στις VP2 και VP4 δομικές πρωτεΐνες (Pfister *et al.*, 1999). Αυτό το τελευταίο στάδιο είναι απαραίτητο για την παραγωγή μολυσματικών ικών σωματιδίων και γι' αυτό αναφέρεται ως διαδικασία ωρίμανσης.



Εικόνα 5-3: πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης. Τα τρίγωνα δείχνουν τα σημεία της πρωτεόλυσης.

#### 5.4 Αντιγραφή ιικού γονιδιώματος

Μετά την ολοκλήρωση της μετάφρασης του ιικού γονιδιώματος και την έκφραση των ιικών γονιδίων, το θετικής πολικότητας RNA των εντεροϊών χρησιμοποιείται για τη δημιουργία νέων μορίων RNA με την ίδια πολικότητα, με την παρεμβολή ενός ενδιάμεσου μορίου αρνητικής πολικότητας RNA να είναι απαραίτητη. Το αρνητικής πολικότητας RNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για τη σύνθεση πολλών κλώνων θετικής πολικότητας (Murray K. E and Barton D.J., 2003).

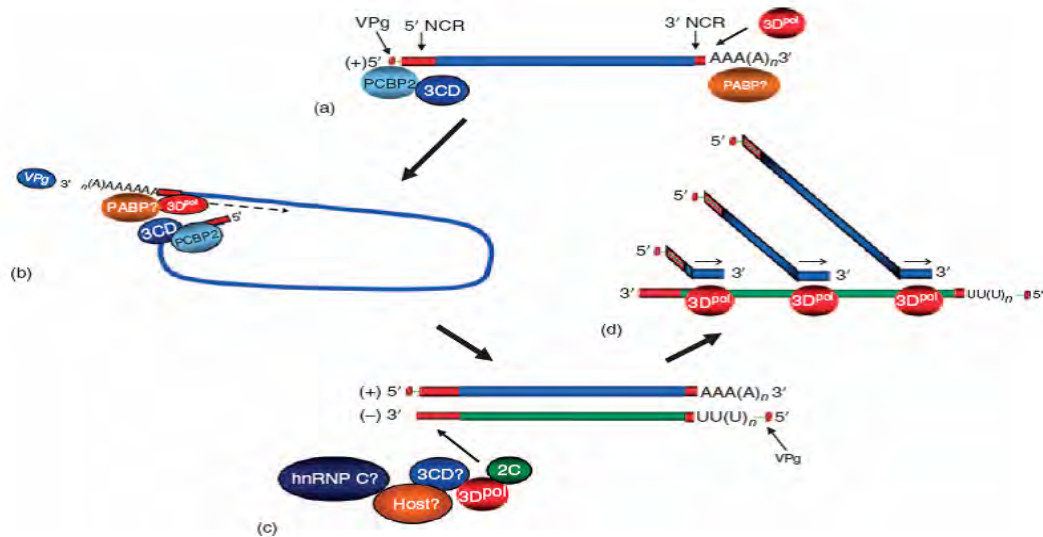
Η αντιγραφή πραγματοποιείται στα αντιγραφικά κυστίδια που αποτελούνται από τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου, του συμπλέγματος Golgi και των λυσοσωμάτων του κυττάρου.

Για την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας RNA απαιτείται η δημιουργία ενός συμπλόκου αντιγραφής, στο οποίο συμμετέχουν ιικές πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση  $3D^{pol}$ , η  $2C^{ATPase}$ , η 3A, η 3B, οι πρόδρομες αυτών 2BC και 3AB, κυτταρικές πρωτεΐνες PCBP2 και PABP, καθώς και ικό RNA με cis-δραστικά στοιχεία (Egger et al., 2000).

Η σύνθεση του αρνητικού κλώνου απαιτεί την κυκλοποίηση του γονιδιώματος, κατά την οποία η ιική πολυμεράση που περιέχεται στο πολυπεπτιδίο 3CD προσδένεται μαζί με τον κυτταρικό παράγοντα PCBP στη δομή cloverleaf του 5' άκρου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της 3CD, της PCBP και της PABP2 κρατούν το 3'



άκρο κοντά στο 5' άκρο προκαλώντας την κυκλοποίηση του ιικού RNA. Πλησιάζει έτσι η 3D πολυμεράση στην poly-(A)-ουρά του 3' άκρου σημαίνοντας έτσι την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας RNA (Herold and Andino, 2001).



Εικόνα 5-4: Μοντέλο του μηχανισμού αντιγραφής του RNA γενώματος των Εντεροϊών.

## 5.5 Καψιδίωση – Απελευθέρωση ώριμων ικών σωματιδίων

Η καψιδίωση, δηλαδή η διαδικασία της συναρμολόγησης νέων ικών σωματιδίων που περιλαμβάνει και τον εγκλεισμό του θετικής πολικότητας RNA στο καψίδιο, είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αντιγραφή και στους εντεροϊούς πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα (Ansardi *et al.*, 1996). Το στοιχείο IRES φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην είσοδο του RNA στο καψίδιο (Gromeier *et al.*, 1996) και η διαδικασία φαίνεται να εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως η VPg. Το πρώτο στάδιο της συναρμολόγησης του ιικού καψιδίου αποτελεί η διάσπαση της P1 πρόδρομου πρωτεΐνης από την 3CDpro και η δημιουργία ενός πρωτομερούς αποτελούμενο από τις VP0, VP1 και VP3 δομικές πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, τα πρωτομερή συναρμολογούνται σε πενταμερή (VP0,VP3,VP1)<sub>5</sub>, που είναι απαραίτητα για την καψιδίωση του RNA των εντεροϊών. Δώδεκα πενταμερή [(VP0,VP3,VP1)<sub>5</sub>]<sub>12</sub> απαιτούνται για την κατασκευή ενός εικοσαεδρικού «προκαψιδίου» (Pfister *et al.*, 1999). Η διάσπαση της VP0 στις πρωτεΐνες VP2 και VP4 ολοκληρώνει την συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων σταθεροποιώντας το καψίδιο και μετατρέποντας το προκαψίδιο σε ένα ώριμο, μολυσματικό ισοσμάτιο (Curry *et al.*, 1997). Τα ώριμα ικά σωματίδια απελευθερώνονται για να μολύνουν νέα κύτταρα-ξενιστές (Pfister *et al.*, 1999, De Jesus NH, 2007). Στα μολυσμένα κύτταρα-ξενιστές η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης εμποδίζεται από την πρωτεάση 2A, η οποία

προκαλεί ρήγμα σε έναν από τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης του γενετικού υλικού (*Hellen et al., 1991*). Συνεπώς οι μόνες πρωτεΐνες που παράγονται στο κύτταρο είναι οι ικές λόγω της ικανότητας των Picorna ιών να πραγματοποιούν την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσής τους ανεξάρτητα από την ύπαρξη της καλύπτρας στο 5' άκρο. Με δεδομένα λοιπόν, την αναστολή της παραγωγής των πρωτεϊνών του κυττάρου-ξενιστή και την πληθώρα των ικών σωματίων που παράγονται ανά κύτταρο, συνεπάγονται η καταστροφή του κυττάρου ξενιστή και η απελευθέρωση των ικών σωματίων.

## **6 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ-ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ**

Οι εντεροϊοί μεταδίδονται μέσω της εντεροστοματικής οδού. Εισέρχονται από τη στοματική κοιλότητα ή το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται στο λεμφικό ιστό του αναπνευστικού και του πεπτικού συστήματος. Ο ιός Coxsackie A21 (CAV21) μεταδίδεται κυρίως από εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος και ο εντεροϊός 70 (EV70) εκκρίνεται στα δάκρυα και μεταδίδεται μέσω των δακτύλων και των κοπράνων (*Knipe and Howley, 2007*). Λοιμώξεις από Coxsackievirus μπορούν να μεταδοθούν απευθείας από άτομο σε άτομο μέσω των κοπράνων, του στόματος ή την επαφή με εκκρίσεις του φάρυγγα (*Hunter, 1998*).

Μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό των εντεροϊών στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και στο λεπτό έντερο, προκαλείται ιαιμία, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε περαιτέρω πολλαπλασιασμό του ιού σε κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και τελικά στο όργανο – στόχο (νωτιαίος μυελός, εγκέφαλος, μήνιγγες, μυοκάρδιο και δέρμα).

Ο χρόνος επώασης του ιού, δηλαδή ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας, είναι για τους εντεροϊούς 3 - 10 ημέρες (συνήθως 3-6 ημέρες), αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2 – 35 ημέρες, σε ακραίες περιπτώσεις. Μετά τη μόλυνση με εντεροϊό, σε άτομα που έχουν είτε κλινικές είτε υποκλινικές ενδείξεις, ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για 8 εβδομάδες και εντοπίζεται στο φάρυγγα για 1 – 2 εβδομάδες. Μπορεί να παραμείνει βιώσιμος για πολλά χρόνια σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες (μεταξύ  $-20^{\circ}\text{C}$  και  $-70^{\circ}\text{C}$ ), καθώς και για εβδομάδες στους  $4^{\circ}\text{C}$ , αλλά χάνει τη μολυσματικότητά του καθώς η θερμοκρασία ανεβαίνει.

Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί από κόπρανα και φαρυγγικά επιχρίσματα, από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, από το νωτιαίο μυελό, από τον εγκέφαλο, την καρδιά, τον επιπεφυκότα, από πληγές του δέρματος ή από τις βλεννώδεις μεμβράνες των ασθενών (*Melnick J.L., 1990*).

Οι εντεροϊοί προκαλούν μια ευρεία ποικιλία οξέων συμπτωμάτων, ως αποτέλεσμα της προσβολής του κεντρικού νευρικού συστήματος, του μυοκαρδίου, των σκελετικών μυών, του παγκρέατος, του δέρματος και των βλεννώδων μεμβρανών (*Muir et al., 1998*).

Όταν οι εντεροϊοί προσβάλλουν το νευρικό σύστημα μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες όπως παράλυση (πολιοϊός-πολιομυελίτιδα, εντεροϊός-Coxsackie ή Echo) (*Brown et al., 1972, Grimwood et al., 2003*), άσηπτη μηνιγγίτιδα, μηνιγγίτιδα. Περίπου το 70% όλων των περιπτώσεων μηνιγγίτιδας οφείλονται σε εντεροϊούς, και συγκεκριμένα στους τύπους coxsackievirus A7, A9 και B2-5 (*Mena et al.1999*). Άλλη ασθένεια που οφείλεται σε εντεροϊό είναι η HFMD (Hand Foot Mouth Disease) (*Chan et al., 2003*), η οποία είναι μια ήπια παιδική ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από πληγές στο στόμα και βλάβες, αγγειακές κυρίως, στα χέρια και στα πόδια. Ασθένειες του αναπνευστικού έχουν επίσης συσχετιστεί με διάφορα στελέχη εντεροϊών, όπως το EV68 (*Oberste et al.,2004*). Οι Cocksackie B ιοί σχετίζονται με την ανθρώπινη καρδιομυοπάθεια σε ποσοστό 30% των περιπτώσεων (*Baboonian et al., 1997*). Cocksackie B και Echo ιοί έχουν συσχετιστεί με το διαβήτη τύπου I (*Dotta et al., 2007, Williams et al., 2006*).

Τα συνηθέστερα συμπτώματα σε περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας είναι: κεφαλαλγία, πυρετός >38°C, έμετοι, αυχενική δυσκαμψία, μυαλγίες, κακουχία, ρίγος, πονόλαιμος, κοιλιακά άλγη, ναυτία, φωτοφοβία και υπνηλία. Ασθενείς με μηνιγγίτιδα οφειλόμενη σε εντεροϊό συχνά παρουσιάζουν συμπτώματα παρόμοια με αυτά της γρίπης. Η πορεία της νόσου είναι μέσης βαρύτητας και καλοήθης. Γενικά η άσηπτη μηνιγγίτιδα θεωρείται αυτοπεριοριζόμενη νόσος με χαμηλή θνησιμότητα. Η πλήρης αποθεραπεία υπολογίζεται σε 5-14 ημέρες, αν και οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν για μήνες μετά την αποθεραπεία κακουχία, ναυτία και αδυναμία.

## **7 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ**

Σημαντικό ρόλο στη διάδοση των εντεροϊών παίζουν παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση (*Knipe and Howley, 2007*).

Όσον αφορά την ηλικία των προσβαλλόμενων ατόμων, πιο επιρρεπείς στις μολύνσεις από εντεροϊούς είναι τα άτομα μικρής ηλικίας, τα οποία είναι λιγότερο πιθανό να έχουν αντισώματα από προηγούμενες μολύνσεις.

Έχει παρατηρηθεί ότι και το φύλο παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού. Φαινομενικά, οι λοιμώξεις από εντεροϊούς κυριαρχούν μεταξύ των ανδρών. Μετά από μετρήσεις των λοιμώξεων που έγιναν με βάση τον πληθυσμό (π.χ. ορολογικές έρευνες), οι οποίες ήταν ανεξάρτητες από το φύλο των προσβαλλόμενων ατόμων, έδειξαν μια αυξημένη τάση των ανδρών να μολύνονται από εντεροϊούς.

Οι εντεροϊοί μεταδίδονται σε συνθήκες φτωχής υγιεινής. Σε αναπτυσσόμενες περιοχές, όπου το κοινωνικο-οικονομικό υπόβαθρο είναι χαμηλό, οι μολύνσεις από εντεροϊούς είναι εξαιρετικά διαδεδομένες.

Επιπλέον, μπορούν να επιζήσουν ακόμα και σε συνθήκες εξαιρετικά χαμηλών εξωτερικών θερμοκρασιών το χειμώνα. Σε τροπικά κλίματα προσβάλλουν ανθρώπους ενεργά όλες τις εποχές του χρόνου, αλλά σε ψυχρότερα κλίματα οι εξάρσεις των ασθενειών συμβαίνουν συχνότερα το καλοκαίρι και το φθινόπωρο.

## **8 ΠΡΟΛΗΨΗ-ΕΛΕΓΧΟΣ**

Τα μόνα διαθέσιμα εμβόλια για εντεροϊούς αυτή τη στιγμή είναι ενάντια στους τρεις ορότυπους των πολιοϊών. Η εφαρμογή τους για σχεδόν 40 χρόνια έχει οδηγήσει στην επίτευξη του στόχου της παγκόσμιας εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας. Μια καλύτερη κατανόηση της οργάνωσης του γονιδιώματος και της λειτουργίας του, καθώς επίσης και των μηχανισμών της ταχείας εξέλιξης και της μεταβλητότητάς τους, θα βοηθούσε πολύ στο σχεδιασμό αντι-ϊκών παραγόντων, όπου οι ζωτικές λειτουργίες του ιού αποτελούν στόχο. Οι μελέτες των κυτταρικών υποδοχέων είναι μεγάλης σπουδαιότητας για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων ενός ιού με το κύτταρο ξενιστή του, καθώς και η πιθανή παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης ιού - κυττάρων. Η καλύτερη κατανόηση του εντοπισμού της δομικής διαμόρφωσης των επιτόπων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ανασυνδυασμένων εμβολίων. Η εφαρμογή γρήγορων, ευαίσθητων και εξειδικευμένων διαγνωστικών εργαλείων μοριακής βιολογίας για την ανίχνευση των Cocksackie B ιών σε κλινικά δείγματα είναι σημαντική για τον επιδημιολογικό έλεγχο.

Η εξάλειψη της πολιομυελίτιδας μέσω του εμβολιασμού ήταν ένας στόχος του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας WHO που έχει σχεδόν επιτευχθεί. Πάραυτα, διάφορες περιπτώσεις παραλυτικής μηνιγγο-εγκεφαλίτιδας οφειλόμενες σε άλλους εντεροϊούς, εκτός των πολιοϊών, συνεχίζουν να υπάρχουν. Η ακριβής διάγνωση τέτοιων μολύνσεων είναι επιτακτική προκειμένου να ληφθούν τα σωστά επιδημιολογικά στοιχεία για να καταδείξουν το ρόλο των Εντεροϊών εκτός των πολιοϊών σε αυτές τις κλινικές εκδηλώσεις (*Kopecka Helena, 1999*).

## 9 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Αν και οι άνθρωποι εντεροϊοί έχουν κατά καιρούς απομονωθεί από διάφορες περιβαλλοντικές πηγές, οι άνθρωποι θεωρείται ότι αποτελούν τη σημαντικότερη φυσική δεξαμενή αυτών των ιών (*Feachem et al., 1981*). Οι εντεροϊοί μπορούν να επιβιώσουν στο περιβάλλον για εβδομάδες σε συνθήκες με ουδέτερο pH, υγρασία και χαμηλή θερμοκρασία, κυρίως με την παρουσία οργανικής ύλης, η οποία τους προστατεύει από την αδρανοποίηση (*Knipe and Howley, 2007*).

Η πιο ισχυρή ένδειξη λοίμωξης παρέχεται από την απομόνωση εντεροϊών από προσβεβλημένα όργανα και τα συσχετιζόμενα υγρά. Η απομόνωση των εντεροϊών μπορεί να γίνει από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) (*Minor et al., 2000*), από τα κόπρανα και από άλλα βιολογικά υλικά όπως π.χ. το δάκρυ (*Shulman et al., 1997*), ή εκκρίματα του επιπεφυκότος χιτώνα (*Yin-Murphy et al., 1984*) σε περιπτώσεις οξείας αιμορραγικής επιπεφυκίτιδας. Η απομόνωση των εντεροϊών από συστατικά του αίματος είναι επίσης χρήσιμη και παρέχει ένδειξη συστημικής μόλυνσης (*Shulman et al., 1997*). Σε περιπτώσεις θανάτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δείγματα αυτοψίας εγκεφάλου ή νωτιαίου μυελού.

Η πιο αξιόπιστη εξέταση για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό μηνιγγίτιδας είναι η ανάλυση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY). Βέβαια πρέπει να σημειωθεί πως το δείγμα ENY πρέπει να ληφθεί από τον ασθενή στα αρχικά στάδια της νόσου και συγκεκριμένα δύο ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Η εξέταση σε δείγματα κοπράνων παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία και μπορεί να γίνει με λήψη δείγματος από τον ασθενή ακόμα και μέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Αν και η εξέταση δειγμάτων κοπράνων έχει μεγαλύτερη ευαισθησία η εξέταση δειγμάτων ENY παρουσιάζει μεγαλύτερη ειδικότητα.

Η οσφρονωτιαία παρακέντηση αποτελεί τη διαδικασία λήψης του ENY και πραγματοποιείται τοποθετώντας τον ασθενή συνήθως ξαπλωμένο στο πλάι, εφαρμόζοντας τοπική αναισθησία και εισάγοντας μία βελόνα στον υποσκληρίδιο χώρο για τη συλλογή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

## **10 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

Η διάγνωση της μόλυνσης με εντεροϊούς και ο χαρακτηρισμός τους μπορεί να είναι πολύπλοκη διαδικασία, είτε λόγω περιορισμών των διαγνωστικών μεθόδων είτε λόγω των βιολογικών και επιδημιολογικών χαρακτηριστικών των εντεροϊών. Η δυσκολία οφείλεται στο γεγονός ότι οι εντεροϊοί μπορούν να βρίσκονται στο αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα τόσο υγιών όσο και ασθενών ατόμων με μεγάλη ποικιλία στην κλινική εικόνα καθώς οι μολύνσεις είναι συνήθως ασυμπτωματικές ή παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα. Λόγω της ομοιότητας των συμπτωμάτων που προκαλούνται από διαφορετικούς τύπους εντεροϊών, υπάρχει ανάγκη όχι μόνο διάγνωσης αλλά και ταυτοποίησής τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τόσο παραδοσιακές τεχνικές, όπως η απομόνωση του ιού, η οροεξουδετέρωση και η ανίχνευση αντισωμάτων, όσο και μοριακές τεχνικές (*Muir et al., 1998, Siafakas et al., 2001, Pallansch and Roos, 2007*).

### **10.1 Παραδοσιακές μέθοδοι**

Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των εντεροϊών, βασίζονται στην απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες και την εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης με ειδικούς αντι-ορούς.

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την απομόνωση εντεροϊών, είναι η χρήση κυτταρικών σειρών. Η ανάπτυξη όλων των γνωστών οροτύπων των εντεροϊών όμως, δεν μπορεί να γίνει στον ίδιο τύπο κυττάρων. Κατά συνέπεια, η χρήση πολλαπλών κυτταρικών σειρών αυξάνει την παραγωγή και ενισχύει την πιθανότητα και ταχύτητα της ιικής απομόνωσης (*Chonmaitree et al., 1988, Kopecka 1999*). Κάτω από ιδανικές συνθήκες η απομόνωση μπορεί να είναι εμφανής μέσω της παρατήρησης κυτταροπαθογόνου δράσεως (CPE) μέσα σε λίγες μέρες. Τα κύτταρα στρογγυλοποιούνται και συρρικνώνονται πριν αποκολληθούν από την επιφάνεια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Παρόλα αυτά οι εντεροϊοί δεν μπορούν να διακριθούν με την ανάπτυξη σε κυτταροκαλλιέργειες καθώς προκαλούν όμοια κυτταροπαθογόνο δράση (*Minor et al., 2000*).

Μετά την απομόνωση του εντεροϊού ακολουθεί η ταυτοποίηση του οροτύπου μέσω εξουδετέρωσης με ειδικό αντιορό για κάθε ορότυπο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται συνδυασμοί εξειδικευμένων πολυκλωνικών αντισωμάτων που επιτρέπουν την ταυτοποίηση των οροτύπων των εντεροϊών. Συγκεκριμένα, το προς ανάλυση δείγμα επωάζεται με διαφορετικό δείγμα αντιορού και ενοφθαλμίζεται σε κατάλληλα κύτταρα. Μετά από επώαση αρκετών ημερών διαβάζεται το πρότυπο εξουδετέρωσης και αξιολογούνται τα αποτελέσματα (*Melnik et al., 1973*).

Για την ταυτοποίηση ορισμένων τύπων εντεροϊών χρησιμοποιούνται και άλλες λιγότερο χρονοβόρες μέθοδοι όπως ανοσοενζυμικές μέθοδοι με αντιορό ειδικό για κάθε ορότυπο, ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία με πολυδύναμο και ειδικό για κάθε ορότυπο αντιορό και ανίχνευση αντιγόνων των εντεροϊών στην κυτταροκαλλιέργεια είτε με έμμεσο ανοσοφθορισμό είτε με ανοσοενζυμική μέθοδο.

Μέσω της ορολογικής διάγνωσης, μπορούμε να έχουμε ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης από εντεροϊό, αφού τα IgM αντισώματα παράγονται κατά την πρώτη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Ο έλεγχος αυτός γίνεται με την μέθοδο ELISA, η οποία όμως είναι πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης αναμνηστικών ετεροτυπικών αντιδράσεων των αντισωμάτων, της έλλειψης ενός ομοιόμορφα αντιδρώντος αντιγόνου των εντεροϊών και του μεγάλου αριθμού οροτύπων. Το ανθρώπινο ανοσολογικό σύστημα αντιδρά στη λοίμωξη από εντεροϊό με την δημιουργία αντισωμάτων τα οποία ενεργούν έναντι ειδικών και κοινών επιτόπων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε επιδημιολογικές μελέτες και έχει μεγάλη ευαισθησία στη διάγνωση λοίμωξης από εντεροϊούς, όμως δεν μπορεί να διακρίνει τους διάφορους οροτύπους (*Bell et al., 1986, Magnius et al., 1988*).

## **10.2. Μοριακές μέθοδοι**

Η εφαρμογή της μοριακής βιολογίας στην κλινική βιολογία, έχει αλλάξει σημαντικά και τις μεθόδους διάγνωσης. Λόγω του πλεονεκτήματος της ταχύτητας, πολλές μοριακές μέθοδοι έχουν αντικαταστήσει τις παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης και ταυτοποίησης των εντεροϊών (*Pallansch and Roos, 2007*).

Η πρώτη μοριακή μέθοδος ανίχνευσης εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *in situ* υβριδοποίηση με την χρήση cDNA ανιχνευτών. Η μέθοδος αυτή παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την κατανομή της λοίμωξης από εντεροϊούς στα διάφορα κύτταρα, όμως δεν είναι αρκετά ευαίσθητη για την διάγνωση εντεροϊών από κλινικά

δείγματα κοπράνων, εγκεφαλονωτιαίου και περικαρδικού υγρού, ούτε για την ταυτοποίηση διαφορετικών οροτύπων καθώς οι cDNA ανιχνευτές μπορούν να ανιχνεύουν το γενετικό υλικό μιας ευρείας ομάδας εντεροϊών.

Η ανάπτυξη της τεχνικής RT – PCR (Αντίστροφης Μεταγραφής – Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης) παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την ανίχνευση ιικού RNA από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (*Kessler et al., 1997, Olive et al., 1990, Rotbart et al. 1994*). Με τη χρήση κατάλληλων εκκινητικών μορίων που στοχεύουν στις διατηρημένες περιοχές του ιικού γονιδιώματος (*Romero J.R., 1999*), όπως η 5'UTR, είναι δυνατή η ανίχνευση των περισσότερων ή όλων των εντεροϊών περιλαμβανομένων και αυτών των οποίων δεν είναι εφικτή η ανάπτυξη τους σε κυτταροκαλλιέργεια (*Rotbart H.A., 1990, Halonen et al., 1995, Read and Kurtz, 1999, Romero J.R., 1999, Siafakas et al., 2003, Thoelen et al., 2003, Zoll et al., 1992*). Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και ταχύτητα στην έκδοση των αποτελεσμάτων και γι' αυτό το λόγο αποτελεί σημαντική εφαρμογή στην κλινική διάγνωση. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η αδυναμία ταυτοποίησης του οροτύπου του εντεροϊού. Συνεπώς, για την ταυτοποίηση του ιού απαιτείται κάποια μέθοδος συμπληρωματική της RT-PCR. Αυτή μπορεί να είναι π.χ. η ανάλυση πολυμορφισμού τμημάτων των προϊόντων της RT-PCR από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (RFLP) (*Siafakas et al., 2002, Siafakas et al., 2003*).

Εκτός από την διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, η RT-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των διαφορετικών στελεχών με την χρήση ειδικών ζευγών εκκινητικών μορίων που το καθένα ενισχύει ένα συγκεκριμένο στέλεχος. Έχουν βρεθεί οι αλληλουχίες που προσδιορίζουν τις αντιγονικές ιδιότητες των ιών και έτσι σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια που στοχεύουν σε αυτές.

Η RT-PCR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μοριακή τυποποίηση των εντεροϊών, ακολουθούμενη από τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ιικού γονιδιώματος. Συγκεκριμένα, ενισχύεται το γονιδίου της VP1 καψιδιακής πρωτεΐνης, η οποία είναι η πλέον εκτεθειμένη στην επιφάνεια του ώριμου ιοσώματος και φαίνεται να αντιστοιχεί στον ορότυπο του κάθε στελέχους. Με σκοπό την ενίσχυση όλων των διαφορετικών οροτύπων των εντεροϊών, χρησιμοποιούνται ειδικά σχεδιασμένοι εκφυλισμένοι εκκινητές. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδίου και η σύγκριση με γνωστές αλληλουχίες προτύπων και αγρίων στελεχών με σκοπό την ταυτοποίηση του ιικού στελέχους που μας ενδιαφέρει. Η ανάλυση της



αλληλουχίας της VP1 αποτελεί έναν σύγχρονο, ακριβή τρόπο μοριακής ταυτοποίησης των εντεροϊών (*Oberste et al., 1999, Oberste et al., 2000, Oberste et al., 2003, Caro et al., 2001, Bolanaki et al., 2006, Kottaridi et al., 2006*). Για να καταταχθεί ένας εντεροϊός σε κάποιο συγκεκριμένο ορότυπο θα πρέπει να εμφανίζει νουκλεοτιδική ομοιότητα >75% (>85% αμινοξική ομοιότητα) της VP1 περιοχής ή τμήματος αυτής με το πρότυπο στέλεχος, με την προϋπόθεση ότι η ομολογία με άλλο πρότυπο στέλεχος δεν ξεπερνά το 70%. Νουκλεοτιδική ομοιότητα κάτω του 70% υποδεικνύει ένα νέο ορότυπο (*Oberste et al., 2004*).

## **11 ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ**

Οι ρυθμοί εξέλιξης των RNA ιών, και συνεπώς των εντεροϊών, είναι πολύ υψηλοί. Η γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των εντεροϊών βασίζεται σε δύο βασικά φαινόμενα: τις μεταλλάξεις και το γενετικό ανασυνδυασμό (*Stanway G., 1990*).

### **11.1 Μεταλλάξεις**

Μετάλλαξη (mutation) καλείται οποιαδήποτε μεταβολή που συμβαίνει στο γενετικό υλικό. Οι μεταλλάξεις εμφανίζονται πιο συχνά στους RNA ιούς απ' ό,τι στους DNA. Η αυξημένη τάση συσσώρευσης μεταλλάξεων στους RNA ιούς οφείλεται σε δύο πολύ βασικούς λόγους: στη χαμηλή πιστότητα αντιγραφής της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης και στην απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών. Η χαμηλή πιστότητα αντιγραφής της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης οδηγεί σε συχνή ενσωμάτωση λάθους νουκλεοτιδίων κατά την επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου κλώνου. Μάλιστα η συχνότητα λάθους υπολογίστηκε περίπου  $10^{-4}$  έως  $10^{-5}$  ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής (*Stanway G., 1990*). Αυτά τα λάθη που δημιουργούνται κατά την αντιγραφή του ιού δεν μπορούν να διορθωθούν λόγω απουσίας των κατάλληλων επιδιορθωτικών μηχανισμών (μηχανισμός proof-reading). Η μεγάλη συχνότητα λαθών της RNA πολυμεράσης οδηγεί στη δημιουργία ετερογενών πληθυσμών. Ο όρος quasi-species (σχεδόν είδος) έχει εισαχθεί για να περιγράψει το φαινόμενο της ύπαρξης μιας μεγάλης ομάδας συσχετιζόμενων γονιδιωμάτων, που έχουν γενικά μια κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους σε μία ή περισσότερες περιοχές (*Domingo et al., 1985*). Στο γονιδίωμα των εντεροϊών παρατηρούνται πολύ συχνά σημειακές μεταλλάξεις. Οι σημειακές μεταλλάξεις διακρίνονται σε δύο τύπους ανάλογα με τη φύση της αλλαγής που συμβαίνει από την αντικατάσταση μιας βάσης από μια άλλη. Ο πρώτος τύπος, είναι η μετάπτωση

(transition) κατά την οποία μια πυριμιδίνη αντικαθίσταται από μια άλλη πυριμιδίνη, ή μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια άλλη πουρίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός ζεύγους G-C με ένα ζεύγος A-T και αντίστροφα. Ο δεύτερος τύπος είναι η μεταστροφή (transversion) κατά την οποία μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια πυριμιδίνη και αντίστροφα, έτσι ώστε ένα ζεύγος A-T να μετατρέπεται σε T-A ή C-G. Οι μεταπτώσεις αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ οι μεταστροφές το υπόλοιπο 20%. Υπάρχουν δύο μηχανισμοί για την επικράτηση της μετάλλαξης: η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή. Συνήθως οι μεταλλάξεις που φέρουν κάποιο εξελικτικό πλεονέκτημα επικρατούν στα πλαίσια της φυσικής επιλογής. Οι κανόνες που ελέγχουν την εγκαθίδρυση των μεταλλάξεων σε έναν ιικό πληθυσμό είναι λιγότερο κατανοητοί. Γενικά, μία μετάλλαξη μπορεί να μειώνει ή να αυξάνει την αρμοστικότητα του ιού για μία συγκεκριμένη θέση ή να την αφήνει ανεπηρέαστη. Χαρακτηριστικό αυτού του τύπου εξέλιξης αποτελεί ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του ιικού RNA (*Lukashev et al., 2003*). Υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά τις αντικαταστάσεις αμινοξέων σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα στις περιοχές αυτές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ή στην αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ιικών ενζύμων. Αντίθετα, οι περιοχές των δομικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον σχηματισμό των αντιγονικών θέσεων χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της ισχυρής εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (*Muir et al., 1998*). Οι δευτεροταγείς δομές του ιικού RNA που εμπλέκονται στην ιϊκή αντιγραφή όπως οι δομές cloverleaf και CRE ή στην ιϊκή μετάφραση δομή IRES συσσωρεύουν πιο λίγες μεταλλάξεις. Γι' αυτό το λόγο, οι καψιδικές πρωτεΐνες θεωρούνται οι σημαντικότεροι παράγοντες της εξέλιξης των εντεροϊών, σε σύγκριση με την 5'UTR, η οποία παρουσιάζει τους χαμηλότερους ρυθμούς εξέλιξης.

## 11.2 Γενετικός Ανασυνδυασμός

Γενετικός ανασυνδυασμός καλείται η ανταλλαγή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών μορίων RNA. Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από τον βαθμό ομολογίας των πατρικών κλώνων RNA (*Knipe and Howley, 2007*). Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στον γενετικό ανασυνδυασμό: ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας ή αντιγραφικός μηχανισμός

(*Kirkegaard and Baltimore, 1986*) και ο μηχανισμός ρήξης και επανένωσης ή ο μη-αντιγραφικός μηχανισμός (*Gmyl et al., 1999*).

- μηχανισμός αλλαγής μήτρας ή αντιγραφικός μηχανισμός: η 3D πολυμεράση ξεκινά τη σύνθεση ενός ιικού RNA και ξαφνικά σταματά, αλλάζει υπόστρωμα και συνεχίζει την αντιγραφή χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ένα άλλο ιικό RNA. Ο τερματισμός της επιμήκυνσης του αρχικού ιικού RNA οφείλεται στο ότι η 3D πολυμεράση συναντά κάποιο εμπόδιο και αποδεσμεύεται. Το συγκεκριμένο εμπόδιο μπορεί να είναι είτε μια δευτεροταγής δομή RNA (*Romanova et al., 1986*) είτε η προσθήκη λάθος νουκλεοτιδίου στο νεοσυντιθέμενο ιικό RNA (*Pilipenko et al., 1995*).
- μηχανισμός ρήξης και επανένωσης ή ο μη-αντιγραφικός μηχανισμός: Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, τα μόρια του RNA κόβονται σε κάποια σημεία και τα εκτεθειμένα τους άκρα ενώνονται, δηλαδή ένα ανασυνδυασμένο γονιδίωμα προκύπτει από τη σύνδεση τμημάτων RNA που προέρχονται από τη διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων (*Gmyl et al., 1999*).

Ο γενετικός ανασυνδυασμός παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών καθώς: i) βοηθάει στην εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση ενός γενοτύπου αγρίου τύπου, ii) συμβάλλει στη δημιουργία ικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση και iii) επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου γένους ή και ακόμα μεταξύ στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη (*Wimmer et al., 1993*).

## **12 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η αλληλούχιση και ο μοριακός χαρακτηρισμός του γονιδιώματος εντεροϊών από περιστατικά άσηπτης μηνιγγίτιδας.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του RNA των εντεροϊών από τα δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) των ασθενών, στη συνέχεια ανίχνευση του γονιδιώματος στα κλινικά δείγματα με μοριακές τεχνικές που στοχεύουν στην 5' UTR και στη συνέχεια, χαρακτηρισμός των εντεροϊών με ενίσχυση του γονιδιώματός τους με το κατάλληλο κάθε φορά ζεύγος εκκινητικών μορίων και αλληλούχισή του με στόχο τη φυλογενετική μελέτη του γονιδιώματος των εντεροϊών με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στο πειραματικό μέρος της εργασίας εξετάστηκαν 55 κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ) για την επιβεβαίωση της παρουσίας εντεροϊών. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα δείγματα με την κωδική ονομασία, το έτος λήψης τους και την προέλευσή τους (όπου Π.Ν.Ιωαννίνων είναι το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων και ΕΚΑΜ είναι το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων).

<b>αα</b>	<b>Δείγμα</b>	<b>Έτος δειγματοληψίας</b>	<b>Προέλευση</b>
1.	LEV22	2010	Π. Ν. Ιωαννίνων
2.	LEV23	2010	Π. Ν. Ιωαννίνων
3.	LEV25	2010	Π. Ν. Ιωαννίνων
4.	LEV26	2010	Π. Ν. Ιωαννίνων
5.	LEV32	2010	Π. Ν. Ιωαννίνων
6.	LEV35	2010	Π. Ν. Ιωαννίνων
7.	LEV45	2010	Π. Ν. Ιωαννίνων
8.	LEV51	2010	Π. Ν. Ιωαννίνων
9.	AK 1273	2007	ΕΚΑΜ
10.	AK 1439	2010	ΕΚΑΜ
11.	BM 1025	2009	ΕΚΑΜ
12.	W 2387	-	ΕΚΑΜ
13.	W 2457	2009	ΕΚΑΜ
14.	W3329	2010	ΕΚΑΜ
15.	W3370	2010	ΕΚΑΜ
16.	BM 977	-	ΕΚΑΜ

17.	BM 979	-	EKAM
18.	BM1069	-	EKAM
19.	BM1080	-	EKAM
20.	BM1085	-	EKAM
21.	W 2322	-	EKAM
22.	W 2403	-	EKAM
23.	W 2553	-	EKAM
24.	W 2620	-	EKAM
25.	W 2686	-	EKAM
26.	W 2763	-	EKAM
27.	W 2784	-	EKAM
28.	W 2808	-	EKAM
29.	W 2909	-	EKAM
30.	W 3125	-	EKAM
31.	W 3143	-	EKAM
32.	W 3263	-	EKAM
33.	W 3292	-	EKAM
34.	W 3363	-	EKAM
35.	W 3387	-	EKAM
36.	W 3484	-	EKAM
37.	W 3498	-	EKAM
38.	W 3540	-	EKAM
39.	W 3611	-	EKAM
40.	W 3619	-	EKAM
41.	W 3797	2012	EKAM

42.	W 3808	2012	EKAM
43.	W 3900	2012	EKAM
44.	W 4091	2012	EKAM
45.	ENY1	2008	Π. Ν. Ιωαννίνων
46.	ENY3	2008	Π. Ν. Ιωαννίνων
47.	ENY4	2008	Π. Ν. Ιωαννίνων
48.	ENY5	2009	Π. Ν. Ιωαννίνων
49.	ENY6	2009	Π. Ν. Ιωαννίνων
50.	ENY7	2008	Π. Ν. Ιωαννίνων
51.	ENY8	2008	Π. Ν. Ιωαννίνων
52.	STEF1	2013	Π. Ν. Ιωαννίνων
53.	STEF2	2013	Π. Ν. Ιωαννίνων
54.	STEF3	2013	Π. Ν. Ιωαννίνων
55.	STEF4	2013	Π. Ν. Ιωαννίνων

## 2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Για την εκχύλιση του RNA χρησιμοποιήθηκε το «QIAamp kit RNA EXTRACTION» της Qiagen και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του πρωτοκόλλου που αυτό περιείχε:

- Σε eppendorf των 2 ml προστέθηκαν 560μl προετοιμασμένου Buffer AVL το οποίο περιείχε carrier RNA.
- Προστέθηκαν 140μl κλινικού δείγματος ENY στο Buffer AVL- carrier RNA, ακολούθησε vortex για 15 δευτερόλεπτα.
- Επάση σε θερμοκρασία δωματίου (15-25° C) για 10 λεπτά.
- Προστέθηκαν 560μl αιθανόλης (96-100%) και ακολούθησε ξανά vortex του δείγματος για 15 δευτερόλεπτα.

- Προστέθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή 630μl από το διάλυμα του προηγούμενου βήματος σε μια ειδική στήλη με ένα erpendorf συλλογής 2ml (QIAamp Mini spin column). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 8.000rpm και έπειτα τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο erpendorf και απομάκρυνση του erpendorf με το φιλτραρισμένο διάλυμα.
- Προσεκτικά ανοίχθηκε το erpendorf με τη στήλη και επαναλήφθηκε το προηγούμενο βήμα.
- Προστέθηκαν 500μl Buffer AW1 στη στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8.000rpm για ένα λεπτό. Στη συνέχεια, η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα καθαρό erpendorf των 2ml και απομακρύνθηκε το erpendorf, με το φιλτραρισμένο διάλυμα.
- Προστέθηκαν 500μl Buffer AW2 και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 3 λεπτά.
- Η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα καθαρό erpendorf των 2ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 1 λεπτό.
- Η στήλη μεταφέρθηκε σε ένα νέο erpendorf και στη συνέχεια προστέθηκαν 60μl Buffer AVE. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 8.000rpm για 1 λεπτό.
- Στη συνέχεια η στήλη απομακρύνθηκε και τα erpendorf αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

### 3 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Όνομα	Αλληλουχία 5' - 3'	Πολικότητα	Θέση	Βιβλιογραφία
UG <sub>52</sub>	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	Sense	168-188	Georgopoulou et al. (2000)
UC <sub>53</sub>	TTGTCACCATAACCAGCCA	Antisense	588-606	Georgopoulou et al. (2000)



AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	Sense	2602- 2627	Nix et al., 2006
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	Antisense	2977- 2951	Nix et al., 2006

**Πίνακας 3-1: Εκκινητικά μόρια.**

Τα δύο ζεύγη εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση τμημάτων του γονιδιώματος των εντεροϊών με τη μέθοδο της PCR. Το ζεύγος UG52/UC53 χρησιμοποιήθηκε για ενίσχυση τμήματος 458bp στη συντηρημένη 5'UTR περιοχή και το ζεύγος AN89/AN88 για την ενίσχυση τμήματος 375bp στη VP1 περιοχή.

#### **4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ**

Μετά την εκχύλιση ανακτήθηκε το RNA των εντεροϊών, το οποίο είναι μονόκλωνο και πρέπει να μετατραπεί σε cDNA ώστε να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια PCR. Ακολούθησε έτσι η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής.

Αρχικά προετοιμάστηκε μίγμα το οποίο περιείχε:

- random primers HEPTAN (N7) (Metabion) (50nmol/μl) (2μl/tube)
- 40mM dNTPs (1μl/tube)
- ddH<sub>2</sub>O (4μl/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 ειδικό μχάνημα. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετήθηκαν στον πάγο και προετοιμάστηκε το δεύτερο μίγμα το οποίο περιείχε:

- 5X first strand Buffer (4μl/tube)
- 0,1M DTT (2μl/tube)
- RNase out (20units/μl) (0,5μl/tube)
- RT (Invitrogen) (100units/μl) (0,5μl/tube)
- ddH<sub>2</sub>O (1μl/tube)

Στη συνέχεια προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf, ξανά φυγοκέντρηση και ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 λεπτά στους 25° C, 50 λεπτά στους 37° C και 15 λεπτά στους 70° C.

## 5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η PCR είναι μια *in vitro* μέθοδος κατά την οποία το ένζυμο της DNA πολυμεράσης αναλαμβάνει την ενίσχυση τμημάτων του γονιδιώματος των εντεροϊών, τα οποία καθορίζονται από τα ζεύγη των εκκινητών.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε eppendorf των 200  $\mu$ l. Σε όλες τις αντιδράσεις η σύσταση του μείγματος για κάθε δείγμα είναι:

Συστατικά μείγματος αρχικής συγκέντρωσης	Αντίδραση στα 50 $\mu$ l
50pmol Sense primer	1 $\mu$ l
50pmol Antisense primer	1 $\mu$ l
10X KAPA Taq Buffer	5 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu$ l
10 mM dNTP Mix	5 $\mu$ l
5 U/ $\mu$ l KAPA Taq DNA Polymerase(KAPABIOSYSTEMS)	0.1 $\mu$ l
Template DNA	3 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O(nuclease free)	Μέχρι 50 $\mu$ l

Πίνακας 5-1: Συστατικά για την αντίδραση της PCR στα 50 $\mu$ l.

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει 3 διαφορετικές θερμοκρασίες για τα στάδια της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και πολυμερισμού-επιμήκυνσης, οι οποίες είναι ξεχωριστές για κάθε ζεύγος εκκινητών. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας επιτυγχάνονται με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, των θερμοκυκλοποιητών.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95° C	2 min	1
Αποδιάταξη	95° C	30 sec	50
Υβριδοποίηση	Για UG52/UC53:	30 sec	50

	63° C		
	Για AN89/AN88: 60° C		
Επιμύκηση	72° C	30 sec	50
Τελική επιμύκηση	72° C	5 min	1
Διατήρηση	4° C	∞	1

Πίνακας 5-2: Συνθήκες PCR.

## 6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης. Το πήκτωμα αγαρόζης ήταν συγκέντρωσης 2%, αποτελούμενο από 1,2gr αγαρόζης σε 60ml TBE (Tris Boric EDTA). Επιπλέον, προστέθηκαν 60μl βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/ml) το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και το καθιστά έτσι εμφανές σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στα «πηγαδάκια» του πηκτώματος φορτώθηκαν 10μl από κάθε PCR προϊόν αναμεμιγμένα με κατάλληλο διάλυμα χρωστικής ώστε να καταστεί δυνατή η παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Στο πρώτο πηγαδάκι του πηκτώματος φορτώθηκαν 4μl μάρτυρα μοριακού βάρους της εταιρίας INVITROGEN (100 bp DNA Ladder). Το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα TBE και τέλος εφαρμόστηκε τάση 120V. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφήθηκε σε κατάλληλη συσκευή υπεριωδών ακτίνων UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) με τη χρήση κάμερας (Olympus digital camera).

## 7 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Για την ανάκτηση των επιθυμητών προϊόντων της PCR, 40 μl από το κάθε προϊόν της ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Οι αντίστοιχες ζώνες των προϊόντων της PCR κόβονται από το πήκτωμα και μεταφέρονται σε αποστειρωμένους σωλήνες eppendorf των 2ml. Ακολουθεί καθαρισμός των PCR προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης, με το Gel and PCR-Clean Up Kit (NucleoSpin, Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα

με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά με τη χρήση του συγκεκριμένου kit επιτυγχάνεται η διάλυση της αγαρόζης και η δέσμευση του επιθυμητού PCR προϊόντος σε ειδική στήλη, από την οποία λαμβάνεται μέσω έκλυσης το προϊόν μετά την προσθήκη διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος.

## 8 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Ακολούθησε η μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR έτσι ώστε να απομονωθούν τα ικά στελέχη και να μην υπάρχουν μείγματα, που δυσκολεύουν τη διαδικασία της αλληλούχισης καθώς και την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

Η μοριακή κλωνοποίηση περιλαμβάνει τα εξής στάδια: i) προετοιμασία των προϊόντων της PCR, ii) αντίδραση λιγάσης, iii) μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων και iv) πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI.

- i. προετοιμασία των προϊόντων της PCR: προετοιμάστηκε το ένθεμα με τη χρήση Taq DNA πολυμεράσης (Maximo Taq DNA polymerase GENEON), η οποία είναι απαραίτητη για την προσθήκη καταλοίπων αδερίνης στο 3' άκρο του προϊόντος της PCR. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε eppendorf των 200 μl. Σε όλες τις αντιδράσεις η σύσταση του μείγματος για κάθε δείγμα είναι:

Συστατικά μείγματος	Αντίδραση στα 10 μl
PCR product	7 μl
10x Buffer (MgCl <sub>2</sub> 1.5mM)	1 μl
dATP (0,2mM)	1 μl
Maximo Pol (5u)	1 μl

**Πίνακας 8-1**

Ακολούθησε επώαση στους 72° C για 30 λεπτά.

- ii. αντίδραση λιγάσης: προετοιμάστηκε το μείγμα για την αντίδραση της λιγάσης που περιείχε τα εξής συστατικά για κάθε δείγμα σε eppendorf των 200 μl:

Συστατικά μείγματος	Αντίδραση στα 6 μl
StrataClone Cloning Buffer	3 μl
PCR product	2 μl

StrataClone Vector Mix	1 μl
------------------------	------

Πίνακας 8-2

Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνέχεια η αντίδραση μεταφέρθηκε στον πάγο.

iii. μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων:

- Για κάθε δείγμα που προετοιμάστηκε από την αντίδραση λιγάσης τοποθετήθηκε στον πάγο ένα erpendorf δεκτικών κυττάρων.
- Προστέθηκαν 2μl από το κάθε μείγμα της αντίδρασης λιγάσης σε αντίστοιχο erpendorf με δεκτικά κύτταρα (μείγμα μετασχηματισμού) και αναδεύτηκαν ήπια.
- Το μείγμα μετασχηματισμού επώαστηκε στον πάγο για 20 λεπτά (κατά τη διάρκεια της επώασης προθερμάνθηκε το θρεπτικό μέσο LB στους 42° C στο υδατόλουτρο).
- Το μείγμα μετασχηματισμού υπέστη heat-shock στους 42° C για 45 δευτερόλεπτα.
- Και μεταφέρθηκε στον πάγο για 2 λεπτά.
- Στη συνέχεια, προστέθηκαν 250μl προθερμασμένου LB θρεπτικού μέσου στο μείγμα μετασχηματισμού και τα δεκτικά κύτταρα τοποθετήθηκαν οριζόντια στον κλίβανο στους 37° C για μία ώρα υπό το καθεστώς ανακίνησης για 180 κύκλους/λεπτό.
- Κατά τη διάρκεια της μιας ώρας προετοιμάστηκαν τρυβλία με θρεπτικό LB και αμπικιλίνη.
- Από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκαν 50 μl σε τρυβλίο με LB άγαρ και αμπικιλίνη 1μl/ml ( stock 100μg/ml).
- Και τέλος προστέθηκαν 16 μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA).
- Επώαση των τρυβλίων στους 37° C στον κλίβανο για 16 ώρες.
- Συλλογή λευκών αποικιών και συγκεκριμένα δύο από κάθε τρυβλίο καλλιέργειας, δηλαδή από κάθε δείγμα.

- Κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε 2 ml LB Broth (20g/L) με αμπικιλίνη 1μl/ml LB Broth (100μg/ml) και ακολούθησε επώαση στον κλίβανο στους 37° C για 16 ώρες σε 210 στροφές/λεπτό.
  - Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, έτσι ώστε να απομονωθεί ο ανασυνδυασμένος φορέας που περιείχαν οι λευκές αποικίες.
- iv. πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI: Για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, του οποίου θέσεις αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Για την αντίδραση κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκαν:

<b>Συστατικά μείγματος</b>	<b>Αντίδραση στα 20 μl</b>
Plasmid DNA	2 μl
10x H Buffer	2 μl
ddH <sub>2</sub> O	15 μl
Restriction enzyme (EcoRI)	1 μl

**Πίνακας 8-3**

Και ακολούθησε επώαση στον κλίβανο στους 37° C για μία ώρα, με το πέρασ της οποίας προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 3μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση.

Τα 23 μl που προέκυψαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Για τον προσδιορισμό του μήκους των επιθυμητών προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 120 Volts για περίπου 1 ώρα. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και φωτογραφήθηκε.

## 9 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Η αλληλούχιση των κλωνοποιημένων PCR δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην εταιρεία MacroGen Europe, Amsterdam, the Netherlands. Για την αντίδραση αλληλούχισης των κλωνοποιημένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν σαν εκκινήτες οι προαγωγείς T7 του πλασμιδιακού φορέα, που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης του τμήματος DNA.

## 10 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με τη μορφή χρωματογραφήματος πραγματοποιήθηκε διόρθωση των αλληλουχιών και μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με αλληλουχίες πρότυπων στελεχών εντεροϊών, με τη βοήθεια του BLAST. Για την επεξεργασία και τη μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα βιοπληροφορικής που διατίθενται στο διαδίκτυο, τα οποία περιγράφονται παρακάτω:

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Το πρόγραμμα αυτό αποτελεί μια δημοφιλή μέθοδο εύρεσης ομοιοτήτων μεταξύ νουκλεοτιδικών, αμινοξικών κ.α. αλληλουχιών. Ο αλγόριθμος BLAST πραγματοποιεί αναζήτηση στη διεθνή βάση δεδομένων ακολουθιών (GenBank) για αλληλουχίες ή τμήματα αλληλουχιών που παρουσιάζουν ομολογία με την αλληλουχία που μελετάμε. Χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των ικών στελεχών που απομονώσαμε και για την εύρεση «συγγενικών» ικών στελεχών που χρησιμοποιήσαμε στην επιδημιολογική και φυλογενετική μελέτη.
- Gene Runner V. 3.05: Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη διόρθωση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, τη μετάφραση της πολυπρωτεΐνης των ικών στελεχών στα τρία πιθανά πλαίσια ανάγνωσης (επιλέχθηκε αυτό που δεν περιείχε πρόωρο κωδικόνιο λήξης).
- Mega V. 5: Το εργαλείο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων των γενωμικών περιοχών των στελεχών που απομονώθηκαν. Η κατασκευή των δέντρων έγινε με βάση τον αλγόριθμο της Ένωσης Γειτόνων (Neighbor Joining – NJ), ο οποίος βασίζεται στην απόσταση. Χρησιμοποιεί, δηλαδή, το βαθμό της ανομοιότητας (απόστασης) ανάμεσα σε δύο στοιχισμένες ακολουθίες για να παράγει δέντρα. Τα

φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν, αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο bootstrap. Η τιμή bootstrap αποτελεί το μέτρο της επαναληπτικότητας του δέντρου. Συγκεκριμένα, δείχνει το πόσες φορές ένας συγκεκριμένος κλάδος εμφανίζεται στο δέντρο ύστερα από τη δημιουργία πολλών νέων συνόλων δεδομένων από το αρχικό σύνολο.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Από τα 55 κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) που εξετάστηκαν για την παρουσία εντεροϊών στο πειραματικό μέρος της εργασίας, σε 6 από αυτά επιβεβαιώθηκε αρχικά η ύπαρξη εντεροϊού με την ενίσχυση τμήματος 458bp στη συντηρημένη 5'UTR περιοχή με το ζεύγος εκκινητών UG52/UC53. Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκε ο ορότυπος του κάθε δείγματος με την ενίσχυση τμήματος 375bp στη VP1 περιοχή με το ζεύγος εκκινητών AN89/AN88.

### 2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ PCR ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με τη μορφή χρωματογραφήματος πραγματοποιήθηκε διόρθωση των αλληλουχιών και μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με αλληλουχίες πρότυπων στελεχών εντεροϊών, με τη βοήθεια του BLAST, καταλήγοντας έτσι στην ταυτοποίηση του οροτύπου του κάθε δείγματος όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί.

Δείγμα	Ορότυπος
ENY4	Echovirus 30
AK1439	Echovirus 30
BM1025	Echovirus 30
W2457	Echovirus 13
W3370	Echovirus 9
STEF3	Coxsackie B3

Πίνακας 2-1: Ταυτοποίηση οροτύπου των δειγμάτων

### 3 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΔΕΝΤΡΑ ΤΗΣ VP1 ΠΕΡΙΟΧΗΣ

Για την επιδημιολογική μελέτη του κάθε στελέχους κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με τμήματα της VP1 περιοχής κοινά με διάφορες κατατεθειμένες αλληλουχίες στελεχών του αντίστοιχου οροτύπου στη GeneBank.

Οι αλληλουχίες που επιλέχθηκαν για την ομοπαράθεση με τις αλληλουχίες των δειγμάτων είχαν query coverage > 90% και ident > 75%. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στη εισαγωγή, για να καταλήξουμε στην οροτυπική ταυτοποίηση ενός εντεροϊού, θα πρέπει η νουκλεοτιδική ομοιότητα της αλληλουχίας της VP1 περιοχής να είναι >75% μεταξύ ενός δείγματος και του πρότυπου στελέχους (Oberste et al., 1999).

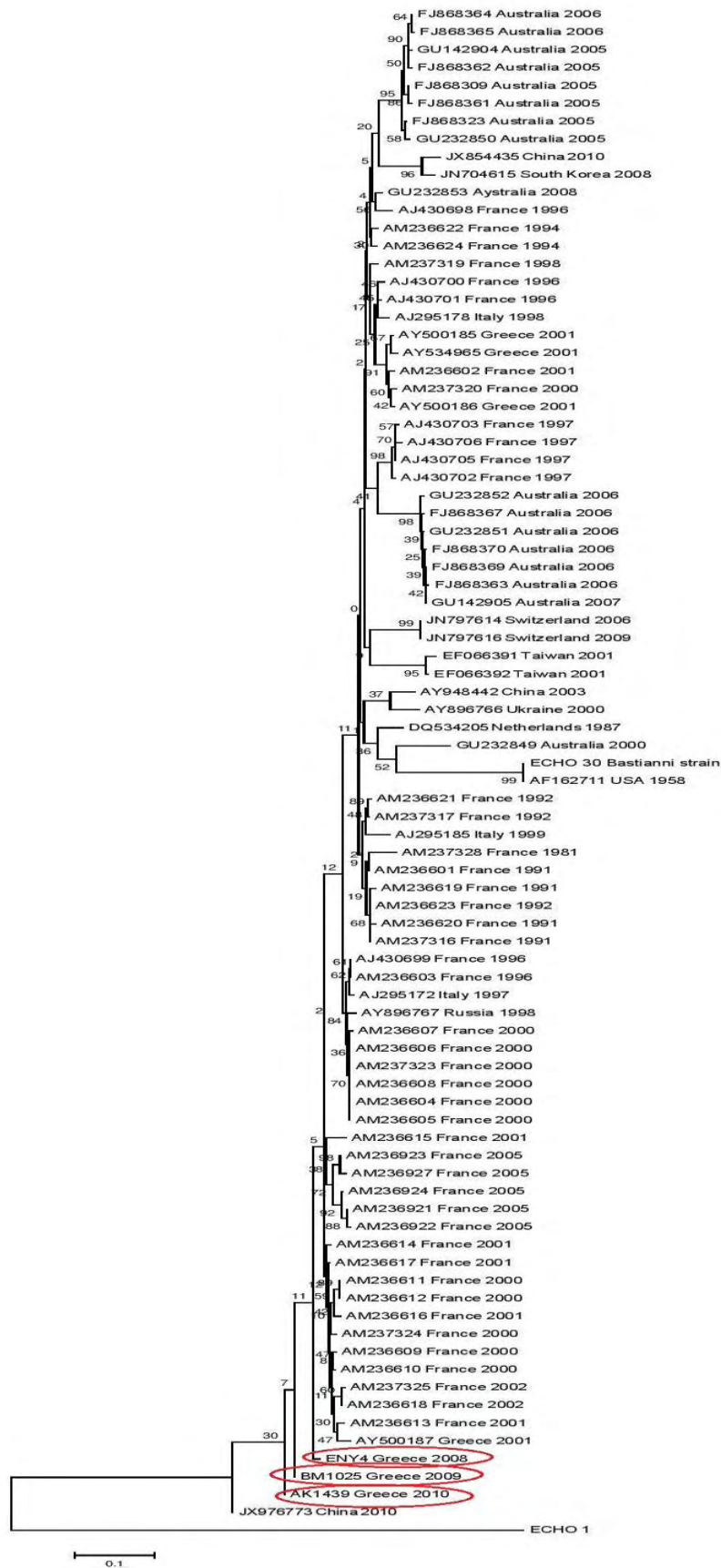
Στην εικόνα 3.1 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο των στελεχών ENY4, AK1439, BM1025 σε τμήμα 276nt (160-435nt της VP1 του Echovirus 30-Bastianni strain).

Στην εικόνα 3.2 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο του στελέχους W2457 σε τμήμα 375nt (70-444nt της VP1 του Echovirus 13-Del Carmen strain).

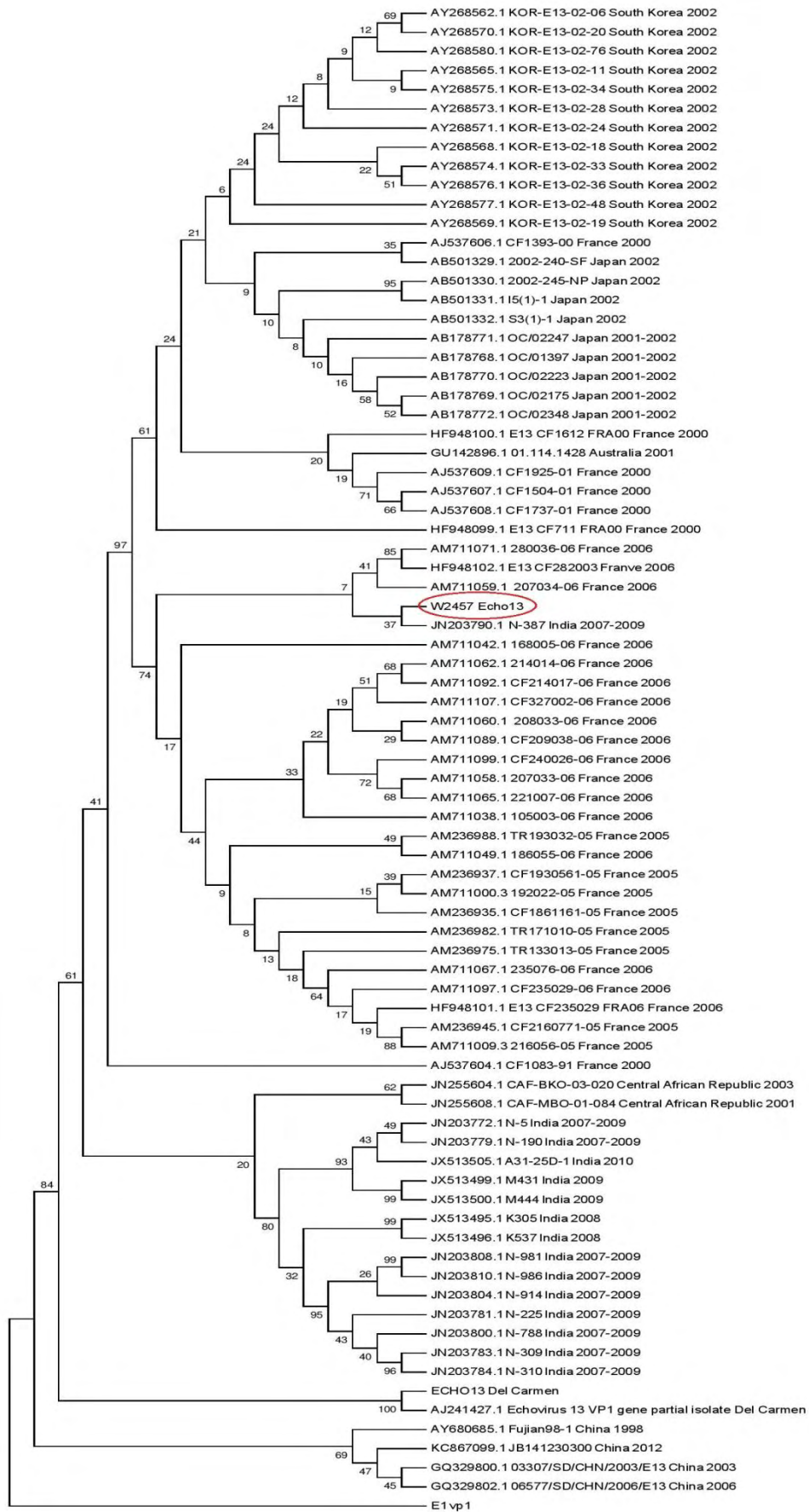
Στην εικόνα 3.3 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο του στελέχους W3370 σε τμήμα 360nt (85-450nt της VP1 του Echovirus 9-Hill strain).

Στην εικόνα 3.4 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο του στελέχους STEF3 σε τμήμα 343nt (94-437nt της VP1 του Coxsackie B3).

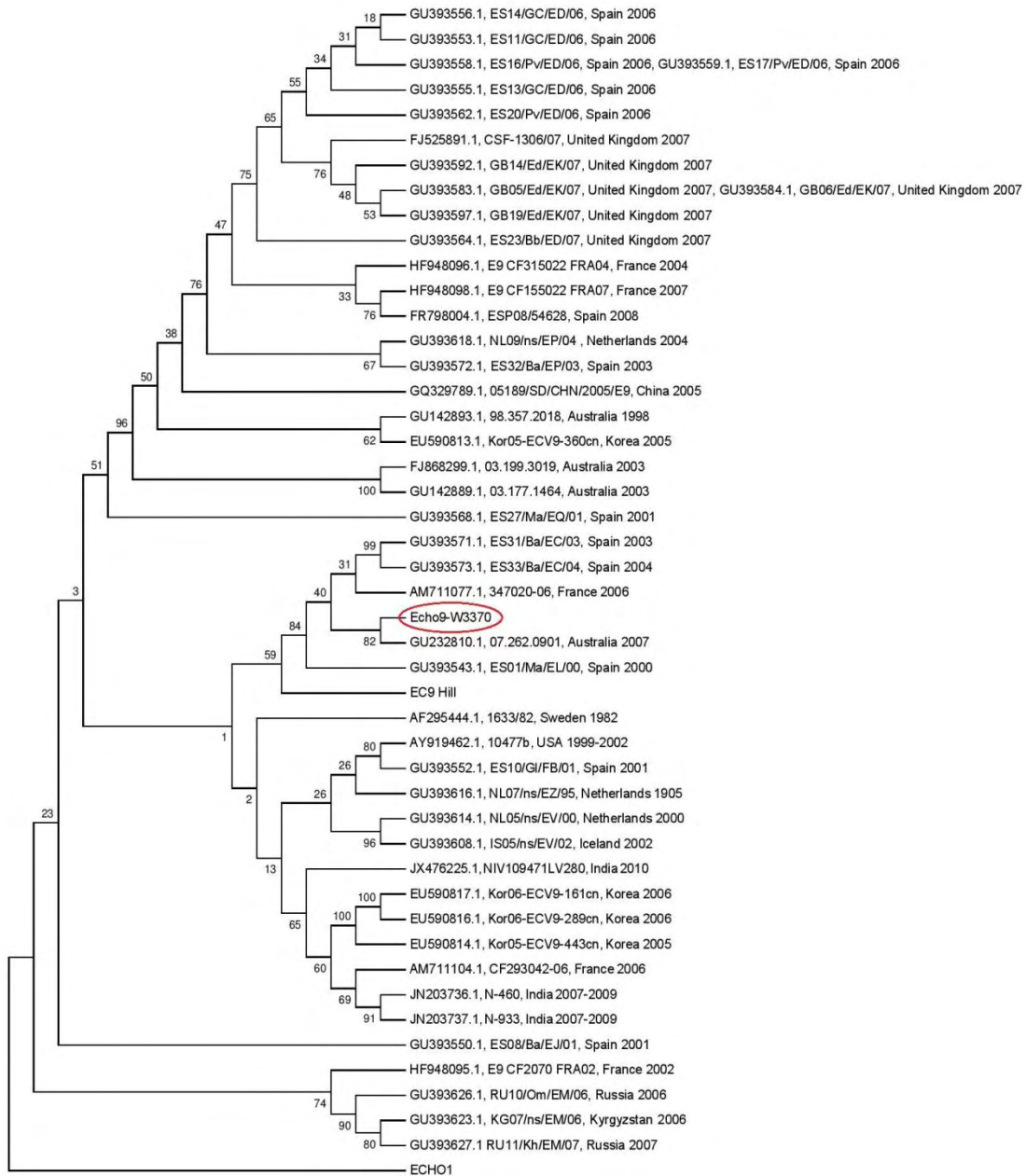
Το στέλεχος Echo 1 χρησιμοποιήθηκε ως ρίζα σε κάθε δέντρο.



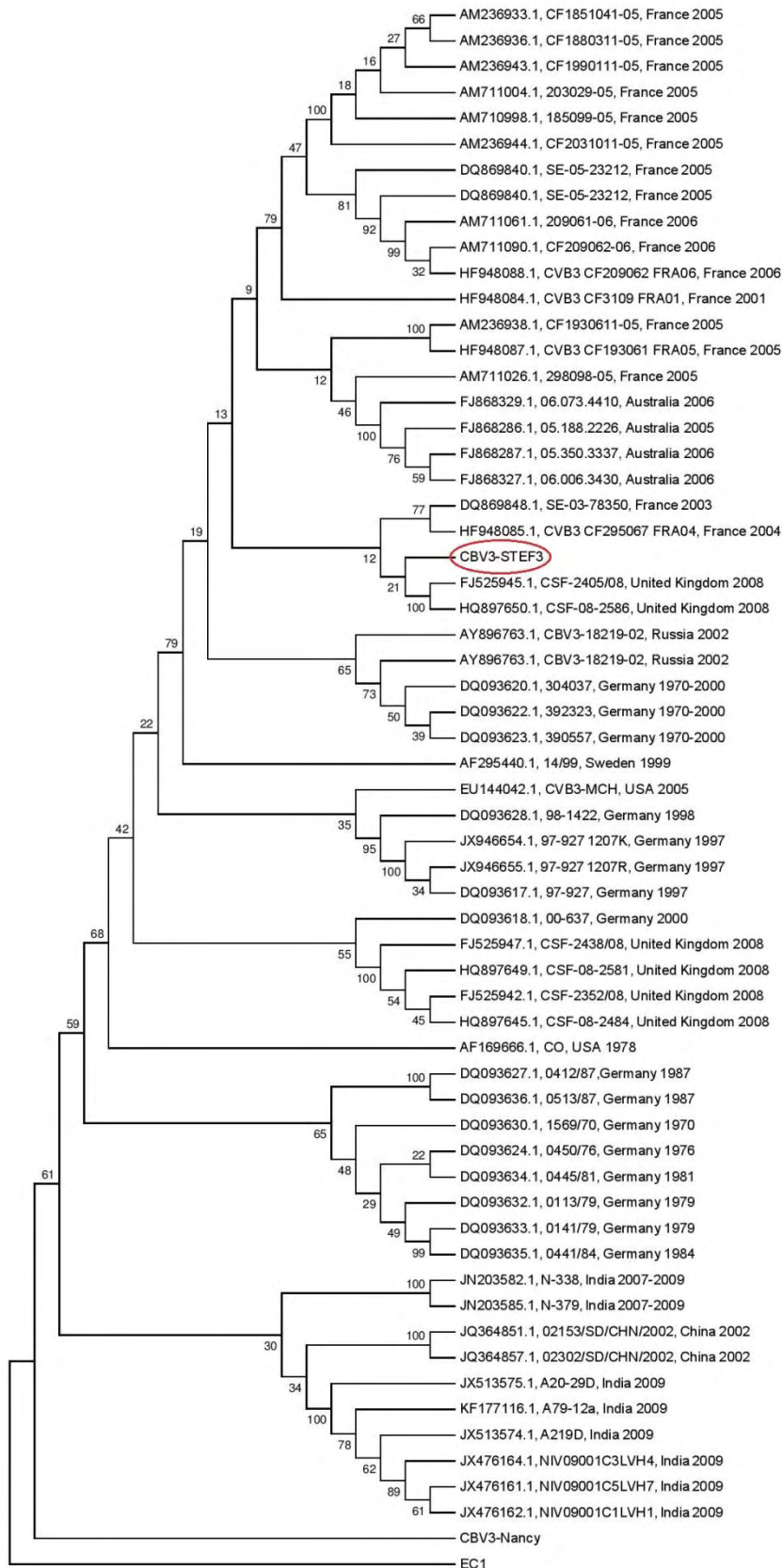
Εικόνα 3-1: Φυλογενετικό δέντρο της VP1 γενωμικής περιοχής των στελεχών ENY4(Ελλάδα 2008), AK1439(Ελλάδα 2010), BM1025(Ελλάδα 2009).



Εικόνα 3-2: Φυλογενετικό δέντρο της VP1 γενωμικής περιοχής του στελέχους W2457(Ελλάδα 2009).



Εικόνα 3-3: Φυλογενετικό δέντρο της VP1 γενωμικής περιοχής του στελέχους W3370(Ελλάδα 2010).



Εικόνα 3-4: Φυλογενετικό δέντρο της VP1 γενωμικής περιοχής του στελέχους STEF3(Ελλάδα 2013).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για την επιδημιολογική μελέτη των στελεχών ENY4, AK1439, BM1025, W2457, W3370, STEF3 χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση τμήμα της VP1 γενωμικής περιοχής κοινό για στελέχη του ίδιου οροτύπου κάθε φορά.

**ECHO30** Τα ENY4(Ελλάδα, 2008), BM1025(Ελλάδα, 2009), AK1439(Ελλάδα, 2010) εντοπίζονται κοντά στο δέντρο, αλλά δε φαίνεται να σχετίζονται με άλλα στελέχη από Ελλάδα. Από το φυλογενετικό δέντρο υποδεικνύονται δύο είσοδοι διαφορετικών στελεχών στην Ελλάδα το 2001 (*Kottaridi et al., 2001*) και το 2008-2010.

Ο Echo ιός 30 είναι ένας από τους πιο συχνούς Echo ιούς που απομονώνονται, και προκαλεί άσηπτη μηνιγγίτιδα σε περιοχές με εύκρατα κλίματα και έχει προκαλέσει μεγάλες επιδημίες άσηπτης μηνιγγίτιδας σε πολλές περιοχές του κόσμου τα τελευταία 40 χρόνια. Ο Echo ιός 30 δε φαίνεται να είναι γεωγραφικά περιορισμένος, καθώς ένας συγκεκριμένος γονότυπος μπορεί να κυκλοφορήσει χωρίς διακοπή σε πολλές διακριτές περιοχές για δεκαετίες (*Savolainen et al., 2000*). Επίσης, οι ιοί Echo 30 έχουν προκαλέσει μεγάλες επιδημίες με διάρκεια 2 έως 4 χρόνων, οι οποίες διαχωρίζονται από περιόδους όπου δεν παρατηρούνται πολλές απομονώσεις.

Ένας κλάδος φαίνεται να περιλαμβάνει στελέχη της Αυστραλίας κατά τη περίοδο 2005-2006. Στη συνέχεια φαίνεται να σχετίζονται ένα κινέζικο στέλεχος του 2010 με ένα της Νοτίου Κορέας του 2008. Σε άλλο κλάδο υπάρχει συσχέτιση γαλλικών στελεχών κατά τη περίοδο 1994-1998 με ένα στέλεχος της Αυστραλίας του 2008 και ένα της Ιταλίας του 1998. Τα ελληνικά στελέχη του 2001 σχετίζονται με γαλλικά του 2000-2001. Ομαδοποιημένα εντοπίζονται γαλλικά στελέχη του 1997 και στη συνέχεια, αυστραλιανά στελέχη του 2006-2007. Μαζί εντοπίζονται τα ελβετικά στελέχη του 2006-2009 και τα ταϊβανέζικα του 2001. Στη συνέχεια, εντοπίζονται κοντά στελέχη από Κίνα το 2003, Ουκρανία το 2000, Ολλανδία το 1987, Αυστραλία το 2000, το πρότυπο στέλεχος Bastianni εντοπίστηκε κοντά με στέλεχος της Αμερικής του 1958, γαλλικά στελέχη του 1981-2005 εντοπίζονται μαζί με ιταλικά στελέχη του 1997 και του 1999 καθώς και ένα ρώσικο του 1998.



Ο Echo 30 εντεροϊός δε φαίνεται να ακολουθεί κάποιο χρονολογικό ή γεωγραφικό πρότυπο εξάπλωσης υποδεικνύοντας ένα πολύ δυναμικό επιδημιολογικό πρότυπο, όπως έχει παρατηρηθεί και στο ξέσπασμα του ιού στη Γαλλία το 2005 (*Lénéque N. et al., 2010*)

**ECHO13** Το W2457 (Ελλάδα, 2009) φαίνεται να είναι κοντά με ένα στέλεχος της Ινδίας του 2007-2009 και στελέχη της Γαλλίας του 2006. Τα κορεάτικα στελέχη του 2002 είναι κοντά με τα στελέχη της Ιαπωνίας της ίδιας περιόδου (*Cheon et al., 2004*). Υπάρχει η δημιουργία κλάδου στελεχών της περιόδου 2000-2002, στις χώρες της Ιαπωνίας, Κορέας και Αυστραλίας (*Mullins et al., 2003*). Επίσης σε μελέτη αναφέρεται η ύπαρξη ενός γενότυπου την περίοδο 2000-2003, καθώς και η δημιουργία κλάδου της Ινδίας την περίοδο 2007-2008 (*Maan et al., 2013*). Ο ορότυπος Echo 13 εμφανιζόταν σπάνια παγκοσμίως μέχρι πριν το 2000, ενώ μετά φαίνεται να έχει παγκόσμια εξάπλωση. Μάλιστα ο Echo 13 αναφέρεται ως ένας ορότυπος με υψηλή γενετική ποικιλία η οποία όμως μπορεί να οφείλεται σε συνεχή κυκλοφορία του σε ιδιαίτερα υψηλής πυκνότητας πληθυσμούς κυρίως της κεντρικής και νότιας Ασίας (*Maan et al., 2013 , Mullins et al., 2003, Iwai et al., 2006, Archimbaud et al., 2003*). Από το φυλογενετικό δέντρο συμπεραίνουμε ότι ο ιός κυκλοφορούσε σε Ασία και Ευρώπη από το 2000 μέχρι το 2002, στη συνέχεια περιορίστηκε στην Ευρώπη (Γαλλία 2005-2006) και τέλος εμφανίστηκε τελευταία στην Ινδία από το 2007 μέχρι το 2010. Στην Κίνα συγκεκριμένο στέλεχος φαίνεται να κυκλοφόρησε για μεγάλο χρονικό διάστημα, 2003-2012, ίσως λόγω του μεγάλου αριθμού του πληθυσμού της ή των ανοσολογικά ευαίσθητων ομάδων της.

**ECHO9** Το W3370 (Ελλάδα, 2010) εντοπίζεται πιο κοντά με ένα στέλεχος της Αυστραλίας που απομονώθηκε το 2007, αλλά βρίσκεται κοντά και με στελέχη της Ισπανίας 2000-2004 και με ένα της Γαλλίας του 2006. Τα ισπανικά στελέχη του 2006 ήταν κοντά με τα στελέχη του Ηνωμένου Βασιλείου του 2007. Τα ρώσικα στελέχη του 2006-2007 ήταν κοντά με τα γαλλικά στελέχη του 2002. Σε ένα μεγάλο κλάδο εντοπίζονται κοντά ισπανικά στελέχη που απομονώθηκαν το 2001-2004 με στελέχη της Γαλλίας το 2006, της Σουηδίας το 1982, της Αμερικής το 1999-2002, της Ολλανδίας το 1995-2000, της Ισλανδίας το 2002, Ινδία 2007-2009, Κορέα 2005-2006.



Τέλος έχει αναφερθεί ότι ο ορότυπος Echo 9 κυρίως συνδέεται με ήπιες λοιμώξεις που επηρεάζουν τα παιδιά πάνω από την ηλικία των 5 ετών και τους εφήβους, αν και μπορεί να προκαλέσει πιο σοβαρά σύνδρομα σε νεογνά και ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς (*Khetsuriani et al., 2006*). Σχετίζεται με εκτεταμένες, μεγάλης κλίμακας εποχικές επιδημίες και εμφανίζει ένα τακτικό επιδημικό μοτίβο κρουσμάτων περίπου κάθε τρία έτη (*Dalwai et al., 2009, Khetsuriani et al., 2006*).

**CBV3** Το STEF3 (Ελλάδα, 2013) εντοπίζεται πιο κοντά με στελέχη που απομονώθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο το 2008 και στη Γαλλία το 2005-2006. Άλλα στελέχη από τη Γαλλία το 2005-2006 βρίσκονται κοντά με στελέχη που απομονώθηκαν στην Αυστραλία το 2005-2006. Άλλα στελέχη που απομονώθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο το 2008 είναι κοντά με γερμανικό στέλεχος του 2000. Στελέχη που απομονώθηκαν από τη Ρωσία το 2002 είναι κοντά με στελέχη της Γερμανίας από το 1997-2000 και με ένα της Σουηδίας που απομονώθηκε το 1999. Ινδικά στελέχη του 2007-2009 είναι κοντά με στελέχη της Κίνας του 2002 (*Chu et al., 2010*).

Όπως και σε άλλες λοιμώξεις από εντεροϊό, οι περισσότερες λοιμώξεις από Coxsackie B εντεροϊό λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια των ζεστών μηνών του καλοκαιριού και του φθινοπώρου (πχ Ιούνιος - Οκτώβριος) (*Moore et al., 1984*). Αυτό το πρότυπο της εποχικότητας ισχύει κυρίως για τους CBV4 και CBV5. Ωστόσο, αν και το 80% των λοιμώξεων από CBV συμβαίνει κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και του φθινοπώρου, η έλευση των μοριακών διαγνωστικών μεθόδων έδειξε ότι μπορούν να συσχετιστούν και με λοιμώξεις κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών (*Byington et al., 1999, Chambon et al., 2001*). Επιπλέον, οι CBV έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικά παθογόνα σε νεογνήτα και παιδιά (*Berlin et al., 1993, Kaplan et al., 1983*).

Το πρότυπο ετήσιας κυκλοφορίας του κάθε CBV ορότυπου ποικίλει (*CDC 2006*). Ο ιός Coxsackie B3 (μαζί με τους CVB1 και 4) ακολουθεί ένα επιδημικό πρότυπο : περίοδοι αυξημένης δραστηριότητας που συμβαίνουν σε άτακτα διαστήματα και μπορεί να διαρκέσουν από ένα έως μερικά χρόνια (*Alexander et al., 1993, Schiff 1979*).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Adams M.J., King, A.M.Q., and Carstens E.B.** (2013). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology* 158: 2023–2030.
2. **Alexander JP Jr, Chapman LE, Pallansch MA, Stephenson WT, Török TJ, Anderson LJ.** (1993) Coxsackievirus B2 infection and aseptic meningitis: a focal outbreak among members of a high school football team. *J Infect Dis.* 1993 May;167(5):1201-5. PubMed PMID: 8387565.
3. **Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow.** (1996) Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* 46:1-68.
4. **Arden, K.E., McErlean, P., Nissen, M.D., Sloots, T.P. and Mackay, I.M.** (2006). Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J. Med. Virol.* 78: 1232-1240.
5. **Baboonian C., Davies M. J. Booth J. C., and McKenna W. J.** (1997) Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 223: 31 – 52
6. **Bell EJ, McCartney RA, Basquill D, Chaudhuri AK.** (1986) Mu-antibody capture ELISA for the rapid diagnosis of enterovirus infections in patients with aseptic meningitis. *J Med Virol.* 1986 Jul;19(3):213-7.
7. **Belov G. A., Bonnet N. A., Kovtunovych G., Jackson C. L., Lippincott-Schwartz J., and Ehrenfeld E.** (2007) Hijacking Components of the Cellular Secretory Pathway for Replication of Poliovirus RNA. *J. Virol.* 81:558-567.
8. **Bergelson J. M., Chan M., Solomon K. R., St John N. F., Lin H., and Finberg R. W.** (1994) Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 6245–6248.
9. **Berlin LE, Rorabaugh ML, Heldrich F, Roberts K, Doran T, Modlin JF.** (1993) Aseptic meningitis in infants < 2 years of age: diagnosis and etiology. *J Infect Dis.* 1993 Oct;168(4):888-92. PubMed PMID: 8397269.
10. **Bienz K., Egger D., Troxler M., and Pasamontes L.** (1990) Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J. Virol.* 64: 1156-63
11. **Blomqvist S, Savolainen C, Raman L, Roivainen M, Hovi T.** (2002). Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features. *J Clin Microbiol.* 40: 4218-4223.
12. **Blondel B., G. Duncan, T. Couderc, F. Delpeyroux, N. Pavo and F. Colbere-Garapin.** 1998. Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J. NeuroVirol.* 4:1-26.
13. **Bolonaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorchis T.** (2006). Evolution of 2B and 2C genomic parts of species B Coxsackie viruses. Phylogenetic study and comparison with other regions. *Virus Genes* 32:249-59.
14. **Brown E. H.** (1972) Enterovirus Infections. *British Medical Journal.* 2:169-171
15. **Brown, B., Oberste, M.S., Maher, K. and, Pallansch, M.A.** (2003). Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* 77: 8973-8984.

16. **Byington CL, Taggart EW, Carroll KC, Hillyard DR.** (1999) A polymerase chain reaction-based epidemiologic investigation of the incidence of nonpolio enteroviral infections in febrile and afebrile infants 90 days and younger. *Pediatrics*. 1999 Mar;103(3):E27. PubMed PMID: 10049983.
17. **C. Kottaridi, E. Bolanaki, Z. Mamuris, C. Stathopoulos, P. Markoulatos,** (2001) Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation, *Archives of Virology* June 2006, Volume 151, Issue 6, pp 1117-1132
18. **C. Savolainen, T. Hovi, and M. N. Mulders,** (2000) Molecular epidemiology of echovirus 30 in Europe: succession of dominant sublineages within a single major genotype \_ Department of Virology, Enterovirus Laboratory, National Public Health Institute (KTL), Helsinki, Finland Accepted August 22, 2000
19. **Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., and Crainic R.** (2001) Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82(1): 79 – 91
20. **Chambon M, Archimbaud C, Bailly JL, Henquell C, Regagnon C, Charbonné F, Peigue-Lafeuille H.** (2001) Circulation of enteroviruses and persistence of meningitis cases in the winter of 1999-2000. *J Med Virol.* 2001 Oct;65(2):340-7. PubMed PMID: 11536242.
21. **Chan K. P., Goh K. T., Chong C. Y., Teo E. S., Lau G., and Ling A. E.** (2003) Epidemic Hand, Foot and Mouth Disease Caused by Human Enterovirus 71, Singapore. *Emerging Infectious Diseases.* 9: 78 – 85
22. **Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL.** (1988) Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 1988 Dec;26(12):2576-80.
23. **Chu PY, Ke GM, Chen YS, Lu PL, Chen HL, Lee MS, Chen BC, Huang TS, Li YC, Chou LC, Wang SY, Lin KH.** (2010) Molecular epidemiology of Coxsackievirus B3. *Infect GenetEvol.* 2010 Aug;10(6):777-84. doi: 10.1016/j.meegid.2010.04.004. Epub 2010 Apr 14. PubMed PMID: 20398802.
24. **Cuconati, A., W. Xiang, F. Lahser, T. Pfister, and E. Wimmer** (1998) A Protein Linkage Map of the P2 Nonstructural Proteins of Poliovirus. *J. Virol.* 72: 1297-1307.
25. **Curry S., Fry E., Blakemore W., Abu – Ghazaleh R., Jackson T., King A., Lea S., Newman J., and Stuart D.** (1997) Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 71: 9743 – 9752
26. **Dalwai, A., S. Ahmad, A. Pacsa, and W. Al Nakib** (2009) Echovirus type 9 is an important cause of viral encephalitis among infants and young children in Kuwait. *J. Clin. Virol.* 44:48–51.
27. **David M. Knipe, Peter M. Howley** (2007). *Fields Virology, 5<sup>th</sup> Edition* > Table of Contents > Volume I > Section I - General Virology > 2 - Principles of Virology
28. **De Jesus NH** (2007). "Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis". *Virol. J.* 4:70.doi:10.1186/1743-422X-4-70. PMID 17623069. PMC 1947962
29. **Doedens J. R., Giddings T. H. Jr, and Kirkegaard K.** (1997) Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J. Virol.* 71:9054-64.
30. **Domingo E., Martinez – Salas E., Sobrino F., de la Torre J. C., Portela A., Ortin J., Lopez – Galindez C., Perez – Brena P., Villanueva N., Najera R., et al.** (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance – a review. *Gene* 40: 1 – 8

31. **Dotta F., Censini S., van Halteren A. G., Marselli L., Masini M., Dionisi S., Mosca F., Boggi U., Muda A. O., Prato S. D., Elliott J. F., Covacci A., Rappuoli R., Roep B. O., and Marchetti P.** (2007) Coxsackie B4 virus infection of  $\beta$  cells and natural killer cells insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *PNAS* 104: 5115 – 5120
32. **Egger D., Teterina N., Ehrenfeld E. and Bienz K.** (2000) Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production and viral RNA synthesis. *J. Virol.* 74:6570-6580.
33. **Feachem R., Garelick H., Slade J.** (1981) Enteroviruses in the environment. *Trop. Dis. Bull.* 78: 185 – 230
34. **Gmyl A. P., Belousov E. V., Maslova S. V., Khitrina E. V., Chetverin A. B., and Agol A. I.** (1999) Nonreplicative RNA Recombination in Poliovirus. *J. Virol.* 73: 8958 – 8965.
35. **Grimwood K., Huang S. Q., Sadleir G. L., Nix A. W., Kilpatrick D. R., Oberste M. S., and Pallansch M. A.** (2003) Acute Flaccid Paralysis from Echovirus Type 33 Infection. *J. Clin. Microb.* 41:2230-2232.
36. **Grist NR.** Epidemiology and pathogenicity of coxsackieviruses. In: Schultheiss H-P, Ed. *New concepts in viral heart disease.* Berlin: Springer, 1988: 26-32.
37. **Gromeier M., Alexander L., and Wimmer E.** (1996) Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 2370 – 2375
38. **Halonen P., Rocha E., Hierholzer J., Holloway B., Hyypiä T., Hurskainen P, Pallansch M.** (1995) Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization. *J Clin Microbiol.* 1995 Mar;33(3):648-53
39. **Hellen C. U., Facke M., Krausslich H. G., Lee C. K., Wimmer E.** (1991) Characterization of poliovirus 2A proteinase by mutational analysis: residues required for autocatalytic activity are essential for induction of cleavage of eukaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol.* 65(8): 4226 – 4231
40. **Herold J. and Andino R.** (2001) Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* 7:581-591.
41. **Hunter, P.R.** (1998) *Waterborne Disease. Epidemiology and Ecology.* John Wiley and Son Ltd, Chichester, UK.
42. **Ishiko, H., Miura, R., Shimada, Y., Hayashi, A., Nakajima, H., Yamazaki, S. and Takeda, N.** (2002). Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. *Intervirology* 45: 136-141.
43. **Jurgens C. K., Barton D. J., Sharma N., Morasco B. J., Ogram S. A., and Flanagan J. B.** (2006) 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. *Virology.* 345:346-357.
44. **Kaplan MH, Klein SW, McPhee J, Harper RG.** (1983) Group B coxsackievirus infections in infants younger than three months of age: a serious childhood illness. *Rev Infect Dis.* 1983 Nov-Dec;5(6):1019-32. Review. PubMed PMID: 6318288.
45. **Kauder S. E. and Racaniello V. R.** (2004) Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* 113(12): 1743 – 1753
46. **Kessler HH, Santner B, Rabenau H, Berger A, Vince A, Lewinski C, Weber B, Pierer K, Stuenkel D, Marth E, Doerr HW.** (1997). Rapid diagnosis of enterovirus infection by a new one-step reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:976-977

47. **Khetsuriani, N., A. Lamonte-Fowlkes, S. Oberst, and M. A. Pallansch** (2006) Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. *MMWR Surveill. Summ.* **55**:1–20.
48. **Kirkegaard K., and Baltimore D.** (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* **47**: 433 – 443.
49. **Kistler, A., Avila, P.C., Rouskin, S., Wang, D., Ward, T., Yagi. S., Schnurr, D., Ganem, D., DeRisi, J.L. and Boushey, H.A.** (2007). Pan-viral screening of respiratory tract infections in adults with and without asthma reveals unexpected human coronavirus and human rhinovirus diversity. *J. Infect. Dis.* **196**: 817-825. Epub 2007 Aug 6.
50. **Knipe D. M., and Howley P. M.** (2007) *Fields Virology*, 5th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.
51. **Knowles N. J., Hovi T., Hyypia T., King A. M. Q., Lindberg A. M., Pallansch M. A., Palmenberg A. C., Simmonds P., Skern T., Stanway G., Yamashita T., and Zell R.** (2012) *Picornaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., and Lefkowitz E. J. *San Diego: Elsevier* 855 – 880
52. **Kopecka Helena,** (1999) Academic Press, Echoviruses. In: Allan Granoff, Robert G. Webster , "Encyclopedia of Virology, 3-Volume Set, ISBN-10: 0122270304.
53. **Kottaridi C., Bolanaki E., Mamuris Z., Stathopoulos C., Markoulatos P.** (2006) Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation. *Arch. Virol.* **151**:1117-32.
54. **Kuyumcu-Martinez N. M., M. E. Van Eden, P.Younan, and R. E. Lloyd** (2004), Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation:a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. and Cell. Biology* **24**(4):1779-1790.
55. **Lamson, D., Renwick, N., Kapoor, V., Liu, Z., Palacios, G., Ju, J., Dean, A., St George, K., Briese, T. and Lipkin, W.I.** (2006). MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005. *J. Infect. Dis.* **194**: 1398-1402.
56. **Lau, S.K., Yip, C.C., Tsoi, H.W., Lee, R.A., So, L.Y., Lau, Y.L., Chan, K.H., Woo, P.C. and Yuen, K.Y.** (2007). Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 3655-3664.
57. **Lee, W.-M., Kiesner, C., Pappas, T., Lee, I., Grindle, K., Jartti, T., Jakiela, B., Lemanske, R.F. Jr., Shult, P.A. and Gern, J.E.** (2007). A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS ONE* **2**(10): e966. doi:10.1371/journal.pone.0000966.
58. **Lévêque N, Jacques J, Renois F, Antona D, Abely M, Chomel JJ, Andréoletti L.,** (2010) Phylogenetic analysis of Echovirus 30 isolated during the 2005 outbreak in France reveals existence of multiple lineages and suggests frequent recombination events. *J Clin Virol.* **2010 Jun**;48(2):137-41. doi: 10.1016/j.jcv.2010.03.011. Epub 2010 Apr 8. PubMed PMID: 20381415.

59. **Li J. P. and Baltimore D.** (1990) An intragenic revertant of a poliovirus 2C mutant has an uncoating effect. *J. Virol.* 64:1102- 1107.
60. **Liu, Z., Donahue, R.E., Young, N.S. and Brown, K.E.** (2000). Sequencing and characterization of A-2 plaque virus: A new member of the Picornaviridae family. *Virology* 272: 168-176.
61. **Lukashev A. N., Lashkevich V. A., Ivanova O. E., Koroleva G. A., Hinkkanen A. E., and Itonen J.** (2003) Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.* 77: 10423-31.
62. **Madan V., Castelló A., and Carrasco L.** (2008) Viroporins from RNA viruses induce caspasedependent apoptosis. *Cellular Microbiology* 10:437–451.
63. **Magnius LO, Saleh LH, Vikerfors T, Norder H.** (1988). A solid-phase reverse immunosorbent test for the detection of enterovirus IgM. *J Virol Methods.* 1988 May;20(1):73-82.
64. **Marcotte L. L., Wass A. B., Gohara D. W., Pathak H. B., Arnold J. J., Filman D. J., Cameron C. E., and Hogle J. M.** (2007) Crystal Structure of Poliovirus 3CD Protein: Virally Encoded Protease and Precursor to the RNA-Dependent RNA Polymerase. *J. Virol.* 81:3583-3596.
65. **McErlean, P., Shackelton, L.A., Andrews, E., Webster, D.R., Lambert, S.B., Nissen, M.D., Sloots, T.P. and Mackay, I.M.** (2008), Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, *Human rhinovirus C* (HRV C). *PLoS ONE* 3(4): e1847 doi:10.1371/journal.pone.0001847.
66. **McErlean, P., Shackelton, L.A., Lambert, S.B., Nissen, M.D., Sloots, T.P. and Mackay, I.M.** (2007). Characterisation of a newly identified human rhinovirus, HRV-QPM, discovered in infants with bronchiolitis. *J. Clin. Virol.* 39: 67-75.
67. **McIntyre, C.L., Knowles, N.J. and Simmonds, P.** (2013). Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. *J. Gen. Virol.* 94: 1791-1806.
68. **Melchers W. J., Zoll J., Tessari M., Bakhmutov D. V., Gmyl A. P., Agol V. I., and Heus H. A.** (2006) A GCUA tetranucleotide loop found in the poliovirus oriL by in vivo SELEX (un)expectedly forms a YNMG-like structure: Extending the YNMG family with GYYA. *RNA* 12(9): 1671 – 1682
69. **Melnick J. L.** (1990) Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology, Second Edition* (ed. Fields B. N.): 549 – 605
70. **Melnick J. L.** (1996) “Fields Virology.” 3rd Ed., PA: Lippincott/Raven, Philadelphia
71. **Melnick J. L., Rennick V., Hampil, Schmidt N. J., Ho H. H.** (1973) Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of filed strains of 42 enteroviruses. *Bul.l World Health Organ.* 48(3): 263 – 268
72. **Mena, I., Perry, C.M., Harkins, S., Rodriguez, F., Gebhard, J. and Whitton, J.L.** (1999) The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *American Journal of Pathology*, 155, 1205–1215.
73. **Minor D. Philip, Morgan-Capner Peter, Muir Peter,** (2000), Enteroviruses, Principles and Practice of Clinical Virology, Fourth Edition Pages: 427–449, 2000 Published Online : 15 OCT 2002, DOI: 10.1002/0470842474.ch14
74. **Minor P. D., Ferguson M., Evans D. M., Almond J. W., and Icenogle J. P.** (1986) Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J. Gen. Virol.* 67:1283-1291.

75. **Molla A., Harris K. S., Paul A. V., Shin S. H., Mugavero J., and Wimmer E.** (1994), Stimulation of poliovirus proteinase 3Cpro-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J. Biol. Chem.* 269:27015-27020.
76. **Moore M, Kaplan MH, McPhee J, Bregman DJ, Klein SW.** (1984) Epidemiologic, clinical, and laboratory features of Coxsackie B1-B5 infections in the United States, 1970-79. *Public Health Rep.* 1984 Sep-Oct;99(5):515-22. PubMed PMID: 6091168; PubMed Central PMCID: PMC1424625.
77. **Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M. N., Poyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G. M., and van Loon A. M.** (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(1): 202 – 227
78. **Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M. N., Poyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G. M., and van Loon A. M.** (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 202 – 227
79. **Murray K. E., and Barton D. J.** (2003) Poliovirus CRE – dependent VPg uridylylation is required for positive – strand RNA synthesis but not for negative – strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77: 4739 – 4750
80. **Nishimura, Y. and Shimizu, H.** (2012). Cellular receptors for human enterovirus species A. *Front. Microbiol.* 3:105. Epub 2012 Mar 27.
81. **Nollens, H.H., Rivera, R., Palacios, G., Wellehan, J.F.X., Saliki, J.T., Caseltine, S.L., Smith, C.R., Jensen, E.D., Hui, J., Lipkin, W.I., Yochem, P.K., Wells, R.S., St. Leger, J. and Venn-Watson, S.** (2009). New recognition of enterovirus infections in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Vet. Microbiol.* 139: 170-175.
82. **Nomoto A., Detjen B. M., Pozzatti R., Wimmer E.** (1977) Location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* 268(5617): 208 – 213
83. **Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Flemister M. R., Brown B. A., and Pallansch M.A.** (1999) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* 37:1288-93.
84. **Oberste M. S., Maher K., Schnurr D., Flemister R. M., Lovchik C. J., Peters H., Sessions W., Kirk C., Chatterjee N., Fuller S., Hanauer J. M. and Pallansch A. M.** (2004). Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enterovirus and the rhinoviruses. *J. Gen. Virol.* 85:2577-2584
85. **Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA.** (2000) Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 2000 Mar;38(3):1170-4.
86. **Oberste, M.S., Maher, K. and Pallansch, M.A.** (2002). Molecular phylogeny and proposed classification of the simian picornaviruses. *J. Virol.* 76: 1244-1251.
87. **Ochs K, Saleh L, Bassili G, Sonntag VH, Zeller A, Niepmann M.** (2002) Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Mar. 2002, p. 2113–2122
88. **Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, Khan MA, Pasca A, Stanway G, Al-Nakib W.** (1990) Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples

- following genomic amplification. *J Gen Virol.* 1990 Sep;71 ( Pt 9):2141-7. PubMed PMID: 2170576.
89. **Pallansch M. and Roos R.**, (2007). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2007: 840-893
  90. **Palmenberg A. C.** (1987) Picornaviral processing: some new ideas. *J. Cell Biochem.* 33(3): 191 – 198 80
  91. **Park, N., Katikaneni P., Skern T., and Gustin K. E.** (2008) Differential targeting of nuclear pore complex proteins in poliovirusinfected cells, *Journal of Virology*, vol. 82, no. 4, pp. 1647–1655.
  92. **Paul A. V., Mugavero J., Molla A., and Wimmer E.** (1998) Internal ribosomal entry site scanning of the poliovirus polyprotein: implications for proteolytic processing. *Virology* 250(1): 241 – 253
  93. **Paul A. V., Mugavero J., Molla A., and Wimmer E.** (1998) Internal ribosomal entry site scanning of the poliovirus polyprotein: implications for proteolytic processing. *Virology* 250(1): 241 – 253
  94. **Pfister T., and Wimmer E.** (1999) Characterization of nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* 274: 6992-7001.
  95. **Pfister T., Mirzayan C. and Wimmer E.** (1999) Molecular biology. In “*Encyclopedia of Virology*”, second edition (A. Granoff & R.G. Webster, Eds), pp 1330-1348 Academic Press Ltd.
  96. **Pilipenco E.V., Gmyl A. P., and Agol V. I.** (1995) A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 23:1870–1875.
  97. **Pöyry, T., Kinnunen, L., Hovi, T. and Hyypiä, T.** (1999). Relationships between simian and human enteroviruses. *Journal of General Virology* 80: 635-638.
  98. **Prevot D., Decimo D., Herbreteau C. H., Roux F., Garin J., Luc Darlix J., and Ohlmann T.** (2003) Characterization of a novel RNA – binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO Jour.* 22:1909-1921.
  99. **Read SJ, Kurtz JB.** (1999) Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J Clin Microbiol.* 1999 May;37(5):1352-5
  100. **Richards O. C., and Ehrenfeld E.** (1998) Effects of poliovirus 3AB protein on 3D polymerasecatalyzed reaction. *J. Biol. Chem.* 273:12832-12840.
  101. **Rohll J. B., Moon D. H., Evans D. J., and Almond J. W.** (1995) The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J. Virol.* 69: 7835-44
  102. **Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Viktorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., and Agol V. I.** (1986) The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: A model of recombination between RNA genomes. *Virology* 155:202-213
  103. **Romero J. R.** (1999) Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 123:1161-9.
  104. **Rossmann M. G.** (1994) Viral cell recognition and entry. *Protein Sci.* 3:1712-1725.
  105. **Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, Lewinski C, Murphy N, Keyser EF, Spadoro J, Kao SY, Loeffelholz M.** (1994) Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microbiol.* 1994



- Oct;32(10):2590-2. PubMed PMID: 7814507; PubMed Central PMCID: PMC264111
106. **Rotbart HA.** (1990) Diagnosis of enteroviral meningitis with the polymerase chain reaction. *J Pediatr.* Jul;117(1 Pt 1):85-9. PubMed PMID:2164579.
  107. **Rueckert R. R.** (1985) Picornaviruses and their replication. In *Virology*, New York, Raven Press (ed. B. N. Fields): 705 – 738
  108. **Ryan, M.D., Jenkins, O., Hughes, P.J., Brown, A., Knowles, N.J., Booth, D., Minor, P.D. and Almond, J.W.** (1990). The complete nucleotide sequence of enterovirus type 70: relationships with other members of the Picornaviridae. *J. gen. Virol.* 71: 2291-2299.
  109. **Savolainen, C., Blomqvist, S., Mulders, M.N. and Hovi, T.** (2002). Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J. Gen. Virol.* 83: 333-340.
  110. **Schiff GM.** (1979) Coxsackievirus B epidemic at a boys' camp. *Am J Dis Child.* 1979 Aug;133(8):782-5. PubMed PMID: 223433.
  111. **Selinka Hans-Christoph, Michael Huber, Andreas Pasch, Karin Klingel, Christian Aepinus, Reinhard Kandolf.** (1998) Department of Molecular Pathology, Institute for Pathology, University of Tübingen, Liebermeisterstr. 8, D-72076 Tübingen, Germany
  112. **Shulman L.M., Manor Y., Azar R., Handsher R., Vonsover A., Mendelson E., Rothman S., Hassin D., Halmut T., Abramovitz B., and Varsano N.** (1997) Identification of a new strain of fastidious enterovirus 70 as the causative agent of an outbreak of hemorrhagic conjunctivitis. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2145-9.
  113. **Siafakas N, Markoulatos P, Stanway G.** (2002b) Molecular classification of coxsackie A viruses on the basis of the 5'-UTR: structural and evolutionary aspects. *J Mol Evol.* 2002 Dec;55(6):638-52
  114. **Siafakas N., A. Gergopoulou, P. Markoulatos, N. Spyrou, and G. Stanway.** 2001. Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J. Clin. Laboratory Analysis* 15:87-95.
  115. **Siafakas N., Markoulatos P., Stanway G., Tzanakaki G., Kourea-Kremastinou J.** (2002a). A reliable RT-PCR/RFLP assay for the molecular classification of enterovirus reference and wild type strains to either of the two genetic clusters on the basis of 5'-UTR. *Mol. Cell. Probes.* 16(3): 209-16.
  116. **Siafakas N., Markoulatos P., Vlachos C., Stanway G., Tzanakaki G., Kourea-Kremastinou J.** (2003). Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Mol. Cell. Probes.* 17(2-3): 113-23.
  117. **Simmonds, P., McIntyre, C.L., Savolainen-Kopra, C., Tapparel, C., Mackay, I.M. and Hovi, T.** (2010). Proposals for the classification of human rhinovirus species C into genotypically-assigned types. *J. Gen. Virol.* 91: 2409–2419. 2010 Jul 7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20610666.
  118. **Smyth, M., Tate, J., Hoey, E., Lyons, C., Martin, S. and Stuart, D.** (1995). Implications for viral uncoating from the structure of bovine enterovirus. *Nat Struct Biol.* 2: 224-231.
  119. **Stanway G.** (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* 71: 2483 – 2501

120. **Stanway G., Hughes P. J., Mountford R. C., Minor P. D. and Almond J. W.** (1984) The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res.* 12(20): 7859 – 7875
121. **Teterina N. L., Levenson E., Rinaudo M. S., Egger D., Bienz K., Gorbalenya A. E., and Ehrenfeld E.** (2006) Evidence for Functional Protein Interactions Required for Poliovirus RNA Replication. *J. Virol.* 80:5327-5337.
122. **Thoelen I, Lemey P, Van Der Donck I, Beuselinck K, Lindberg AM, Van Ranst M.** (2003). Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J Med Virol.* 2003 Jul;70(3):420-9
123. **Todd S., Nguyen J. H., and Semler B. L.** (1995) RNA-protein interactions directed by the 3' end of human rhinovirus genomic RNA. *J. Virol.* 69:3605-14.
124. **Towner J. S., Brown D. M., Nguyen J. H. C., and Semler B. L.** (2003) Functional conservation of the hydrophobic domain of polypeptide 3AB between human rhinovirus and poliovirus. *Virology.* 314:432-442
125. **Toyoda H., Nicklin M. J., Murray M. G., Anderson C. W., Dunn J. J., Studier F. W. and Wimmer E.** (1986) A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polypeptide. *Cell.* 45:761-70.
126. **Weidman M. K., Sharma R., Raychaudhuri S., Kundu P., Tsai W., and Dasgupta A.** (2003) The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res.* 95:75–85.
127. **Williams C. H., Oikarinen S., Tauriainen S., Salminen K., Hyöty H., and Stanway G. J.** (2006) Molecular analysis of an echovirus 3 strain isolated from an individual concurrently with appearance of islet cell and IA-2 autoantibodies. *Clin. Microbiol.* 44:441-8.
128. **Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao** (1993) Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
129. **Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao** (1993) Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
130. **Yin-Murphy M.** (1984) Acute hemorrhagic conjunctivitis, *Prog Med Virol.* 1984;29:23-44.Review. PubMed PMID: 6199813.
131. **Yongning H., Chipman R. P., Howitt J., Bator M. C., Whitt A. M., Baker S. T., Kuhn J. R., Anderson W. C., Freimuth P., and Rossmann G. M.** (2001) Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nature Structural Biology* 8:874 – 878.
132. **Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM.** (1992) General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol.* 1992 Jan;30(1):160-5.