

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Δρ. Νικόλαος Κ. Βαμβακόπουλος

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ (ΠΟΛΙΟΪΩΝ, COXSACKIE Β ΚΑΙ ECHO ΙΩΝ)
ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΜΑΛΙΑ Γ. ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

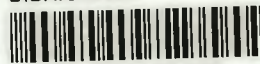
ΛΑΡΙΣΑ 2001

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

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

Αριθ. Εισ.: 679/1
Ημερ. Εισ.: 22-07-2011
Δωρεά: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ
Ταξίθετικός Κωδικός: Δ
579.257 2
ΓΕΩ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000103480

Στη μνήμη της αξέχαστης Δήμητρας

Στον Σταύρο, στους γονείς μας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

Συντμήσεις

5

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9

Ιστορικά στοιχεία

10

Συστηματική κατάταξη

12

Δομή και λειτουργία των εντεροϊών

21

Κύκλος ζωής και παθογένεια των εντεροϊών

32

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

43

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

46

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

62

Εισαγωγή στις εργασίες του ειδικού μέρους

63

- Improved genotyping vaccine and wild-type poliovirus strains by
restriction fragment length polymorphism analysis: clinical
diagnostic implications 64
- High sequence divergence in the 5' non coding region of reference
Coxsackie B and ECHO viral strains and clinical isolates revealed
by restriction fragment length polymorphism analysis 91

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	118
Ευχαριστίες	128
Περίληψη διατριβής	129
Περίληψη διατριβής (αγγλική μετάφραση)	130
Περίληψη 5^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Ιολογίας, Απρίλιος 1999, Αθήνα. (Βραβείο καλύτερης εργασίας)	131
Περίληψη 6^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Ιολογίας, Μάρτιος 1999, Αθήνα.	132

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AFP	Acute Flaccid Paralysis Οξεία χαλαρή παράλυση
bp	Base pairs Ζεύγη βάσεων
°C	Degrees Celcius Βαθμοί Κελσίου
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus Receptor Υποδοχέας των Coxsackie B ιών και των αδενοϊών
cDNA	DNA complementary to RNA DNA συμπληρωματικό στο RNA
CNS	Central Nervous System Κεντρικό νευρικό σύστημα
CPE	Cytopathic Effect Κυτταροπαθογόνος δράση
CSF	Cerebrospinal Fluid Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό
DAF	Decay Accelerating Factor Παράγοντας επιτάχυνσης της κυτταρικής κατάπτωσης
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium Θρεπτικό υλικό του Eagles, τροποποιημένο από τον Dulbecco
DNA	Deoxyribonucleic Acid Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
ECHO viruses	Enteric Cytopathic Human Orphan viruses Ιοί που δεν συνδέονται με κυτταροπαθογόνο δράση
FMDV	Foot-and-Mouth Disease Virus Ιός της ασθένειας ποδών και στόματος
g, mg, µg	gram, milligram, microgram γραμμάριο, μιλιγραμμάριο, μικρογραμμάριο

HeLa	Human Cervical Adenocarcinoma cell line Ανθρώπινη κυτταρική σειρά από τραχηλικό αδενοκαρκίνωμα
Hep-2	Human Epidermoid Carcinoma cell line Ανθρώπινη κυτταρική σειρά από επιδερμοειδές καρκίνωμα του λάρυγγα
HFMD	Hand-Foot-and-Mouth Disease Virus Ιός της ασθένειας χειρών, ποδών και στόματος
H.P.I.	Hellenic Pasteur Institute Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule – 1 Ενδοκυτταρικό μόριο πρόσφυσης – 1
I.P.P.	Institut Pasteur de Paris Ινστιτούτο Παστέρ των Παρισίων
IRES	Internal Ribosome Entry Site Εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος
kDa	kilodaltons
L20_B	Recombinant murine cell line expressing the human PVR gene Ανασυνδυασμένη κυτταρική σειρά που εκφράζει το γονίδιο PVR
M, Mm	Molar, millimolar
ml, μl	millilitre, microlitre μιλλιλίτρο, μικρολίτρο
μm	micrometer μικρόμετρο
pmol	picomol
mRNA	Messenger RNA Μεταφορικό RNA
NCR	Non coding Region Μη Κωδική Περιοχή
OPV	Oral Poliovirus Vaccine Στοματικό εμβόλιο έναντι της πολιομυελίτιδας

ORF	Open Reading Frame Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης
PBS	Phosphate Buffer Saline Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PCR	Polymerase Chain Reaction Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
PVR	Poliovirus Receptor Υποδοχέας των πολιοϊών
RD	Rabdomyosarcoma cell line Ανθρώπινη κυτταρική σειρά ραβδομυοσαρκώματος
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Πολυμορφισμοί μήκους μετά από επώαση με περιοριστικά ένζυμα
RLP	Ribosome Landing Pad Σημείο πρόσδεσης των ριβοσωμάτων
RNA	Ribonucleic Acid Ριβονουκλεϊκό οξύ
rpm	rounds per minute στροφές ανά λεπτό
rRNA	ribosomal RNA ριβοσωμικό RNA
RT	Reverse Transcription Αντίστροφη μεταγραφή
RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction Αντίστροφη μεταγραφή – Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
TBE	Tris – Boric acid – EDTA buffer Ρυθμιστικό διάλυμα Τρις-υδροξυμεθυλαμινομεθάνιου, βορικού οξέος και αιθυλενοδιάμινοτετραοξικού οξέος
UTR	Untranslated Region Μη μεταφραζόμενη περιοχή

VAPP	Vaccine Associated Paralytic Poliomyelitis Παραλυτική πολιομυελίτιδα οφειλόμενη στο εμβόλιο
Vero	African Green Monkey Kidney cell line Κυτταρική σειρά από νεφρό αφρικανικού πράσινου πιθήκου
VPg	Genome-linked Viral Protein Γενική πρωτεΐνη συνδεδεμένη στο γένωμα
WHO	World Health Organization Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ιστορικά στοιχεία.

Η οικογένεια των Picorna ιών (*Picornaviridae*), στην οποία ανήκει και το γένος των εντεροϊών (*Enterovirus*), είναι μία πολυσύνθετη ομάδα φυλογενετικά συγγενικών ιών, τα μέλη της οποίας υπερβαίνουν τους 200 ορότυπους. Οι Picorna ιοί είναι από τους πρώτους ιούς που ανακαλύφθηκαν και απομονώθηκαν. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η παλαιότερη περιγραφή ασθένειας με ιική αιτιολογία που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα, είναι σε μία αρχαία αιγυπτιακή επιτύμβια στήλη της εποχής του Ραμσή, περίπου το 1400 π.Χ. Στη στήλη αυτή, η οποία αναπαριστά τον ιερέα Siptah με την οικογένεια του, παρουσιάζεται η χαρακτηριστική κλινική εικόνα της παραλυτικής πολιομυελίτιδας (ασθένειας που οφείλεται σε Picorna ιούς, τους πολιοϊούς) με το πόδι του ιερέα να “κρέμεται” ισχνό και παράλυτο [1, 2].

Οι Loeffler και Frosch το 1898, ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν έναν μολυσματικό παράγοντα που προσβάλλει τα βοοειδή και ο οποίος αργότερα χαρακτηρίστηκε ως Picorna ιός. Ο ιός αυτός, ο Foot and Mouth Disease Virus (FMDV), όπως ονομάστηκε στη συνέχεια, ήταν λουπόν ο πρώτος Picorna ιός που ανακαλύφθηκε. Λίγο αργότερα, οι Landsteiner και Popper το 1908, απέδειξαν ότι η πολιομυελίτιδα, ασθένεια άγνωστης μέχρι τότε αιτιολογίας αλλά και υπεύθυνης για πολλές θανατηφόρες επιδημίες, οφείλεται σε ιό. Αν και χωρίς να απομονώσουν τον υπεύθυνο μολυσματικό παράγοντα, κατάφεραν να μεταδώσουν την ασθένεια σε πιθήκους, ενοφθαλμίζοντας τους με διηθημένο από πολύ λεπτό φίλτρο, νευρικό ιστό ανθρώπου πάσχοντα από πολιομυελίτιδα [3]. Με αυτό τον τρόπο, έδωσαν το έναυσμα για τον χαρακτηρισμό και την μελέτη των πολιοϊών, οι οποίοι είναι από τους πλέον παθογόνους για τον άνθρωπο Picorna ιούς. Οι πολιοϊοί ήταν και οι πρώτοι ιοί που απομονώθηκαν σε κυτταροκαλλιέργεια από τους Sabin και Olitsky, τρεις περίπου δεκαετίες αργότερα, το 1936 [4] και στη συνέχεια από τους Enders et al., το 1949 [5].

Την ίδια περίπου εποχή οι Dalldorf και Sickles [6, 7] απομόνωσαν από ένα παιδί που έπασχε από μία παραλυτική ασθένεια παρόμοια με την πολιομυελίτιδα, έναν άλλο μολυσματικό παράγοντα που μπορούσε να προσβάλει και νεογνά ποντίκια. Αυτή η ομάδα των μολυσματικών παραγόντων ονομάστηκε Coxsackie, εξαιτίας του τόπου καταγωγής του παιδιού (Coxsackie είναι το ινδιάνικο όνομα ενός χωριού στην πολιτεία της Νέας Υόρκης, στις Η.Π.Α.), και ταξινομήθηκε στην οικογένεια των Picorna ιών.

Από τη δεκαετία του 1950 και μετά, η εξάπλωση της χρήσης των κυτταροκαλλιιεργειών και η ανάπτυξη και βελτίωση των εργαστηριακών τεχνικών ταυτοποίησης των ιών, κατέστησε δυνατή την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό και των υπολοίπων μελών της οικογένειας των Picorna ιών, τη μελέτη των μεταξύ τους φυλογενετικών σχέσεων, αλλά και τη ταξινόμηση τους σε γένη.

Συστηματική κατάταξη.

Η οικογένεια των Ρικοπαίων αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες και σημαντικότερες ομάδες παθογόνων ιικών στελεχών που προσβάλλουν μία πληθώρα ξενιστών (με κυριότερο τον άνθρωπο, αλλά και ζώα με κτηνοτροφική σημασία) με σημαντικές οικονομικές και κοινωνικές συνέπειες, αλλά και σοβαρές επιπτώσεις για τη δημόσια υγεία [9].

Οι πρώτοι Ρικοπαίοι ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, ενώ η πλειοψηφία των υπολοίπων μελών της οικογένειας ανακαλύφθηκε στις δεκαετίες του 1940 και 1950. Μέχρι τις μέρες μας συνεχώς προστίθενται νέα μέλη, με αποτέλεσμα σήμερα ο συνολικός αριθμός των Ρικοπαίων να ανέρχεται στους 240 ορότυπους.

Η συστηματική κατάταξη των διαφόρων ιών σε γένη και οικογένειες και η διερεύνηση των μεταξύ τους φυλογενετικών σχέσεων είναι ιδιαίτερες σημαντικές, τόσο σε καθαρά βιολογικό-συστηματικό επίπεδο, όσο και σε κλινικό-διαγνωστικό επίπεδο. Στο επίπεδο της κλινικής ιατρικής η σωστή κατάταξη των ιών παρέχει μία αξιόπιστη βάση τόσο για την ακριβή αλλά και έγκαιρη διάγνωση, όσο και για την θεραπεία και πρόληψη των διαφόρων παθήσεων που προκαλούνται από ιούς [10].

Η αρχική κατάταξη των Ρικοπαίων στα διάφορα γένη που απαρτίζουν την οικογένεια βασίστηκε στις φυσικοχημικές ιδιότητες των ιικών σωματιδίων (όπως ευαισθησία στο pH και ανωτική πυκνότητα σωματιδίων σε κλίση CsCl), καθώς επίσης και στην αντιγονική και γενικότερη βιολογική συγγένεια των ιών αυτών μεταξύ τους [11]. Η εισαγωγή όμως, και η διάδοση νέων διαγνωστικών μεθόδων που βασίζονται στο γενετικό υλικό των ιών, όπως η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR), κατέστησαν έντονη την ανάγκη για ακριβέστερη κατάταξη των Ρικοπαίων, η οποία να ανταποκρίνεται στα μοριακά και γενετικά χαρακτηριστικά τους. Το γεγονός ότι το γένωμα των Ρικοπαίων

περιέχει σχετικά μικρό αριθμό ζευγών νουκλεοτιδικών βάσεων σε σχέση με άλλους ιούς, έχει διευκολύνει ιδιαίτερος τη μελέτη και την εύρεση των αλληλουχιών σε πολλά μέλη της οικογένειας αυτής και κατ'επέκταση τον πλήρη μοριακό και γενετικό χαρακτηρισμό τους. Επιπρόσθετα, η δυνατότητα κρυσταλλοποίησης των Picorna ιών και η εφαρμογή της κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X σε ολόκληρα τα ιικά σωματίδια (Εικόνα 1), προσέφερε υψηλής ευκρίνειας τρισδιάστατες απεικονίσεις και αποκάλυψε πολλά στοιχεία για τη δομή των ιών αυτών [12, 13, 14, 15, 16]. Ιοί της οικογένειας αυτής ήταν από τους πρώτους ανθρώπινους ιούς που μελετήθηκαν με μεγάλη λεπτομέρεια χρησιμοποιώντας την τεχνική της κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X.

Με τα σημερινά δεδομένα λοιπόν, η συστηματική κατάταξη στην οικογένεια των Picorna ιών βασίζεται κυρίως στα μοριακά και γενετικά δεδομένα που είναι πλέον διαθέσιμα για τους ιούς αυτούς και τα οποία επιτρέπουν τόσο την κατανόηση των μεταξύ τους φυλογενετικών σχέσεων, όσο και τη διερεύνηση των εξελικτικών μηχανισμών που λειτουργούν στη συγκεκριμένη ομάδα ιών [17]. Έτσι λοιπόν, η οικογένεια των Picorna ιών (*Picornaviridae*) περιλαμβάνει 240 αντιγονικά διακριτούς ορότυπους που κατανέμονται σε 9 γένη: *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* και *Teschovirus*, όπως φαίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 1 [18, 19].

Το γένος των εντεροϊών (*Enterovirus*), το οποίο αποτελεί και το αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης, περιλαμβάνει συνολικά 89 ορότυπους, από τους οποίους οι 64 προσβάλλουν τον άνθρωπο, ενώ οι υπόλοιποι 25 προσβάλλουν χοίρους, βοοειδή και πιθήκους. Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί περιλαμβάνουν τους πολιοϊούς (3 ορότυποι), τους Coxsackie A ιούς (23 ορότυποι), τους Coxsackie B ιούς (6 ορότυποι), τους ECHO ιούς (από τα αρχικά των λέξεων Enteric Cytopathic Human Orphan – 28 ορότυποι) και τους μη ταξινομημένους εντεροϊούς 68-71 (οι πιο πρόσφατα απομονωθέντες εντεροϊοί, οι οποίοι

έχουν αριθμηθεί με βάση τη σειρά αναγνώρισης τους – 4 ορότυποι) [20, 21]. Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται αναλυτικά όλοι οι ορότυποι των ανθρώπινων εντεροϊών, με λεπτομερή στοιχεία που αφορούν τη χρονολογία και το υλικό απομόνωσης των πρότυπων στελεχών των ορότυπων αυτών.

Με τον όρο “ορότυπος” περιγράφεται ένα σύνολο ιικών στελεχών, τα οποία παρουσιάζουν τις αυτές ορολογικές ιδιότητες, δηλαδή περιέχουν τα ίδια αντιγόνα. Ο ορότυπος ενός ιού μπορεί να περιλαμβάνει έναν αριθμό διαφορετικών “στελεχών”, τα οποία έχουν τις ίδιες μεν ορολογικές ιδιότητες, μπορεί όμως να παρουσιάζουν μικρές διαφορές στο γενετικό τους υλικό ή στις βιοχημικές τους ιδιότητες. Με τον όρο “πρότυπο στέλεχος” ή “στέλεχος αναφοράς” εννοείται το στέλεχος εκείνο, βάσει του οποίου έγινε η περιγραφή του ορότυπου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Συστηματική κατάταξη της οικογένειας *Picornaviridae*.

Οικογένεια: <i>Picornaviridae</i>			
Γένη	Αριθμός οροτύπων	Αρχέτυπο μέλος	Είδος ξενιστών
<i>Enterovirus</i>	89	<i>Poliovirus</i>	Άνθρωπος, βοοειδή, χοίροι, πίθηκοι
<i>Rhinovirus</i>	103	<i>Human rhinovirus A</i>	Άνθρωπος, βοοειδή
<i>Cardiovirus</i>	4	<i>Encephalomyocarditis virus</i>	Άνθρωπος, ποντίκια
<i>Aphovirus</i>	8	<i>Foot-and-mouth disease virus</i>	Βοοειδή, χοίροι αιγοπρόβατα, άλογα
<i>Hepatovirus</i>	2	<i>Hepatitis A virus</i>	Άνθρωπος
<i>Parechovirus</i>	2	<i>Human parechovirus</i>	Άνθρωπος
<i>Erbovirus</i>	1	<i>Equine rhinitis B virus</i>	Άλογα
<i>Kobuvirus</i>	1	<i>Aichi virus</i>	Άνθρωπος
<i>Teschovirus</i>	10	<i>Porcine teschovirus</i>	Χοίροι
<i>Μη ταξινομημένοι Picorna ιοί</i>	20	-	Διάφοροι ξενιστές
ΣΥΝΟΛΟ	240		

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Τα 64 πρότυπα στελέχη των ανθρώπινων εντεροϊών.**A. Πολιοϊοί**

Ορότυπος	Πρότυπο στέλεχος	Προέλευση	Χρονολογία απομόνωσης	Ασθένεια	Υλικό απομόνωσης
Poliovirus 1	Brunhilde	Maryland	1939	Παραλυτική πολιομυελίτιδα	Κόπρανα
	Mahoney	Ohio	1941	-	Κόπρανα
Poliovirus 2	Lansing	Michigan	1937	Παραλυτική πολιομυελίτιδα	Εγκέφαλος
Poliovirus 3	Leon	California	1937	Παραλυτική πολιομυελίτιδα	Σπονδυλική στήλη

B. Coxsackie A ιοί

Ορότυπος	Πρότυπο στέλεχος	Προέλευση	Χρονολογία απομόνωσης	Ασθένεια	Υλικό απομόνωσης
Coxsackie A1	Tompkins	Coxsackie, N.Y.	1947	Παράλυση	Κόπρανα
Coxsackie A2	Fleetwood	Delaware	1947	Παράλυση	Κόπρανα
Coxsackie A3	Olson	New York	1948	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
Coxsackie A4	High Point	North Carolina	1950	-	Λύματα
Coxsackie A5	Swartz	New York	1950	Πολιομυελίτιδα	Κόπρανα
Coxsackie A6	Gdula	New York	1949	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
Coxsackie A7	Parker	New York	1949	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
Coxsackie A8	Donovan	New York	1949	Πολιομυελίτιδα	Κόπρανα
Coxsackie A9	Bozek	New York	1950	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
Coxsackie A10	Kowalik	New York	1950	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
Coxsackie A11	Belgium-1	Belgium	1951	Μυαλγία	Κόπρανα
Coxsackie A12	Texas-12	Texas	1948	-	Μύγες
Coxsackie A13	Flores	Mexico	1952	-	Κόπρανα
Coxsackie A14	G-14	South Africa	1950	-	Κόπρανα
Coxsackie A15	G-9	South Africa	1950	-	Κόπρανα
Coxsackie A16	G-10	South Africa	1951	-	Κόπρανα
Coxsackie A17	G-12	South Africa	1951	-	Κόπρανα
Coxsackie A18	G-13	South Africa	1950	-	Κόπρανα
Coxsackie A19	NIH-8663 (Dohi)	Japan	1952	Σύνδρομο Guillain-Barre	Κόπρανα
Coxsackie A20	IH-35	New York	1955	Ηπατίτιδα	Κόπρανα
Coxsackie A21	Kuykendall	California	1952	Πολιομυελίτιδα	Κόπρανα

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Τα 64 πρότυπα στελέχη των ανθρώπινων εντεροϊών (συνέχεια).**B. Coxsackie A ιοί (συνέχεια)**

Ορότυπος	Πρότυπο στέλεχος	Προέλευση	Χρονολογία απομόνωσης	Ασθένεια	Υλικό απομόνωσης
Coxsackie A22	Chulman	New York	1955	Έμετος και διάρροια	Κόπρανα
Coxsackie A24	Joseph	South Africa	1952	-	Κόπρανα

Γ. Coxsackie B ιοί

Ορότυπος	Πρότυπο στέλεχος	Προέλευση	Χρονολογία απομόνωσης	Ασθένεια	Υλικό απομόνωσης
Coxsackie B1	Conn-5	Connecticut	1948	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
Coxsackie B2	Ohio-1	Ohio	1947	Καλοκαιρινή γρίπη	Κόπρανα
Coxsackie B3	Nancy	Connecticut	1949	Πυρετός	Κόπρανα
Coxsackie B4	JVB	New York	1951	Κοιλιακοί πόνοι	Κόπρανα
Coxsackie B5	Faulkner	Kentucky	1952	Παράλυση και ατροφία	Κόπρανα
Coxsackie B6	Schmitt	Philippines	1953	-	Κόπρανα

Γ. ECHO ιοί

Ορότυπος	Πρότυπο στέλεχος	Προέλευση	Χρονολογία απομόνωσης	Ασθένεια	Υλικό απομόνωσης
ECHO 1	Farouk	Egypt	1951	-	Κόπρανα
ECHO 2	Cornelis	Connecticut	1951	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
ECHO 3	Morrisey	Connecticut	1951	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
ECHO 4	Pesascek	Connecticut	1951	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
ECHO 5	Noyce	Maine	1954	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
ECHO 6	D'Amori	Rhode Island	1955	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
ECHO 7	Wallace	Ohio	?	-	Κόπρανα
ECHO 9	Hill	Ohio	1953	-	Κόπρανα
ECHO 11	Gregory	Ohio	?	-	Κόπρανα
ECHO 12	Travis	Philippines	1953	-	Κόπρανα
ECHO 13	Del Carmen	Philippines	1953	-	Κόπρανα
ECHO 14	Tow	Rhode Island	1954	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
ECHO 15	Ch 96-51 (Charleston)	West Virginia	1951	-	Κόπρανα

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Τα 64 πρότυπα στελέχη των ανθρώπινων εντεροϊών (συνέχεια).**Γ. ECHO ιοί (συνέχεια)**

Ορότυπος	Πρότυπο στέλεχος	Προέλευση	Χρονολογία απομόνωσης	Ασθένεια	Υλικό απομόνωσης
ECHO 16	Harrington	Massachusetts	1951	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
ECHO 17	CHNECHO 29	Mexico City	?	-	Κόπρανα
ECHO 18	Metcalf	Ohio	?	Διάρροια	Κόπρανα
ECHO 19	Burke	Ohio	?	Διάρροια	Κόπρανα
ECHO 20	JV-1	Washington D.C.	1956	Πυρετός	Κόπρανα
ECHO 21	Farina (E26D)	Massachusetts	1950	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
ECHO 24	DeCamp	Ohio	1956	Διάρροια	Κόπρανα
ECHO 25	JV-4	Washington D.C.	1957	Διάρροια	Κόπρανα
ECHO 26	Coronel	Philippines	1953	-	Κόπρανα
ECHO 27	Bacon (1-36-4)	Philippines	1953	-	Κόπρανα
ECHO 29	JV-10	Washington D.C.	1955	-	Κόπρανα
ECHO 30	Bastianni	New York	1958	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Εγκέφαλος
ECHO 31	Caldwell	Kansas	1955	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα
ECHO 32	PR-10	Puerto Rico	?	Γαστρεντερίτιδα	Κόπρανα
ECHO 33	Toluca-3	Mexico	1959	-	Κόπρανα

Δ. Μη ταξινομημένοι εντεροϊοί

Ορότυπος	Πρότυπο στέλεχος	Προέλευση	Χρονολογία απομόνωσης	Ασθένεια	Υλικό απομόνωσης
Enterovirus 68	Fermon	California	1962	Πνευμονία	?
Enterovirus 69	Toluca-1	Toluca, Mexico	1959	-	Κόπρανα
Enterovirus 70	J 670/71	Japan	1971	Οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα	Οφθαλμός
Enterovirus 71	BrCr	California	1970	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Κόπρανα

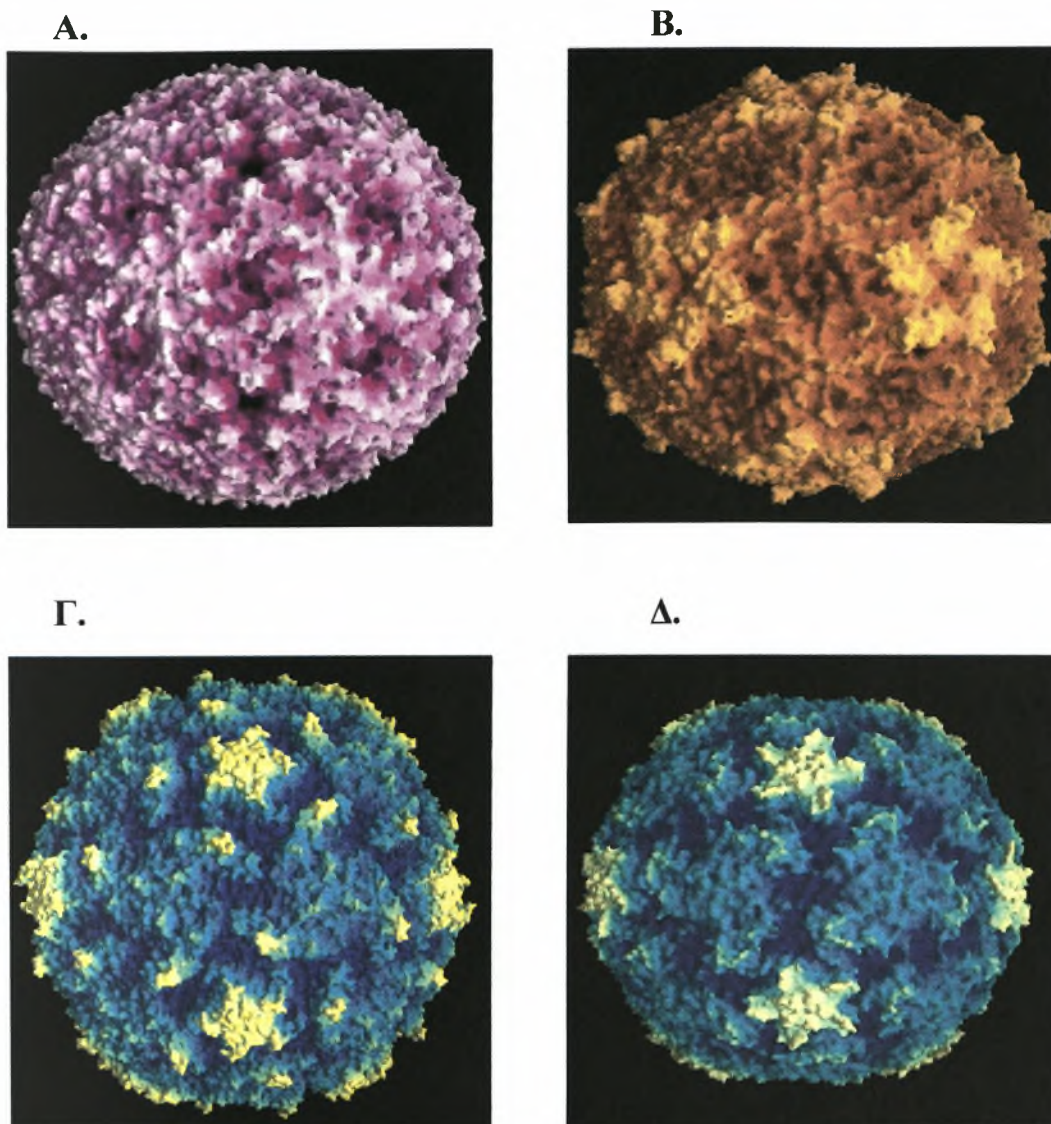
Ανακεφαλαίωση του ΠΙΝΑΚΑ 2.

Στο σύνολο τους οι ανθρώπινοι εντεροϊοί αποτελούνται από τους:

Πολιοϊούς	: 3 ορότυποι
Coxsackie A ιούς	: 23 ορότυποι
Coxsackie B ιούς	: 6 ορότυποι
ECHO ιούς	: 28 ορότυποι
Μη ταξινομημένους εντεροϊούς 68 - 71	: 4 ορότυποι

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν οι πολιοϊοί, οι Coxsackie B ιοί και οι ECHO ιοί.

Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Υψηλής ευκρίνειας απεικονίσεις της τρισδιάστατης δομής των ιϊκών σωματιδίων τεσσάρων διαφορετικών Picorna ιών, όπως αποτυπώνονται μετά από κρυσταλλογραφία με ακτίνες X. **A.** *Foot and Mouth Disease Virus* (Γένος: *Aphovirus*). **B.** *Encephalomyocarditis virus* (Γένος: *Cardiovirus*). **Γ.** *Poliovirus 1* (Γένος: *Enterovirus*) και **Δ.** *Rhinovirus14* (Γένος: *Rhinovirus*).

Δομή και λειτουργία των εντεροϊών.

Οι εντεροϊοί (όπως και όλοι οι Picorna ιοί) είναι μη ελυτροφόροι ιοί, δηλαδή δεν περιβάλλονται από λιπιδικό φάκελλο. Το καψίδιο τους έχει διάμετρο περίπου 27-30 nm (ανάλογα με τον ορότυπο του ιού και το βαθμό αφυδάτωσης του καψιδίου) και είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας. Αποτελείται από 60 πρωτομερή αντίγραφα τεσσάρων πολυπεπτιδίων, των VP1, VP2, VP3 και VP4 (οι οποίες αποτελούν και τις μοναδικές δομικές πρωτεΐνες των Picorna ιών). Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται πυκνά μεταξύ τους και σχηματίζουν το καψίδιο [20].

Η συγκρότηση του καψιδίου του ιού επιτυγχάνεται μέσω της ένωσης δώδεκα πενταμερών, κάθε ένα από τα οποία αποτελείται από αντίγραφα των VP1, VP3 και μίας πρόδρομης πρωτεΐνης της VP0, στην οποία είναι ομοιοπολικά προσδεδεμένες οι VP4 και VP2. Η διάσπαση της VP0 στις VP4 και VP2, που είναι από τα τελευταία στάδια σχηματισμού του ώριμου καψιδίου, μπορεί να σχετίζεται με τον εγκλεισμό του νουκλεϊκού οξέος του ιού στο καψίδιο, όπως επίσης και με τη σταθεροποίηση του ώριμου πλέον ιϊκού σωματιδίου [21, 23]. Σε κάθε καψίδιο ένα ή δύο αντίγραφα της VP0 παραμένουν αδιάσπαστα. Η λειτουργική σημασία του γεγονότος αυτού όμως, παραμένει ανεξιχνίαστη [11]. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2**, οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, σε αντίθεση με τη VP4 η οποία περικλείεται στο εσωτερικό του καψιδίου. Το κάθε πενταμερές σταθεροποιείται από ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου και αμινοτελικού άκρου των VP1 και VP3 μαζί με την VP4. Γειτονικά πενταμερή συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τμημάτων των VP2 και VP3. Η ισχύς των υδρογονοδεσμών είναι ιδιαίτερα μειωμένη και αυτό βεβαίως ενδέχεται να διευκολύνει την αποδιάταξη του καψιδίου

των ιών και την απελευθέρωση του νουκλεϊκού του οξέος στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή του [11].

Παρόλο που οι πρωτεΐνες των εντεροϊών (και των Picorna ιών γενικότερα) δεν είναι γλυκοζυλιωμένες, η VP4 (και κατ'επέκταση και η VP0) είναι συνδεδεμένη στο αμινοτελικό της άκρο με ένα μόριο μυριστικού οξέος [24]. Το συγκεκριμένο αυτό λιπαρό οξύ έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει σε ιούς αρκετών διαφορετικών οικογενειών και έχει προταθεί ότι η λειτουργική του σημασία βρίσκεται στη σύνδεση του ιού με τον υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή, με την αποδιάταξη του καψιδίου και την απελευθέρωση του ιού στο κυτταρικό περιβάλλον, καθώς επίσης και με τη δημιουργία του καψιδίου κατά τη συγκρότηση του ώριμου πλέον ιού [24]. Επιπρόσθετα, η δυνατότητα φωσφορυλίωσης των VP2 και VP4 πρωτεϊνών από κυτταρικές κινάσες, γεγονός που οδηγεί στην αποσταθεροποίηση του καψιδίου, ενδέχεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση του νουκλεϊκού οξέος του ιού στο κυτταρικό περιβάλλον του ξενιστή [25].

Οι εντεροϊοί, όπως άλλωστε δηλώνει και το όνομα της οικογένειας στην οποία ανήκουν (*Picornaviridae*: Pico RNA ιοί) είναι μικροί ιοί, το γένωμα των οποίων αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας, μήκους περίπου 7500 νουκλεοτιδίων [26, 27, 28]. Οι εντεροϊοί παρουσιάζουν μία συγκεκριμένη οργάνωση στο γένωμα τους, η οποία είναι κοινή για όλους τους ιούς που ανήκουν στην οικογένεια *Picornaviridae*. Έτσι λοιπόν, στο γένωμα τους περιλαμβάνονται τρία τμήματα με διαφορετική λειτουργικότητα το καθένα: η **5' μη κωδική περιοχή (5' non coding region – 5' NCR)**, το **ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame – ORF)** και την **3' μη κωδική περιοχή (3' non coding region – 3' NCR)** [29]. Στο 5' άκρο του γενώματος είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη μία μικρή βασική πρωτεΐνη, η **VpG** που αποτελείται από 23 περίπου αμινοξέα και κωδικοποιείται από τον ίδιο τον ιό. Η VpG πιστεύεται ότι συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό του γενώματος και στη

συγκρότηση των ιικών σωματιδίων [30]. Στο 3' άκρο του γενώματος υπάρχει μία πολυαδενυλιωμένη περιοχή (**poly(A) tail**), μήκους περίπου 75 νουκλεοτιδίων [31]. Τα παραπάνω στοιχεία συνοψίζονται στο σχήμα της **Εικόνας 3**.

Κάθε ένα από τα τρία βασικά τμήματα του γενετικού υλικού των εντεροϊών (**5' NCR, ORF και 3' NCR**) έχει ιδιαίτερη λειτουργική σημασία και διαδραματίζει συγκεκριμένο ρόλο στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής των εντεροϊών.

- **5' μη κωδική περιοχή (5' NCR):** Η 5' μη κωδική περιοχή των εντεροϊών και γενικότερα των Picorna ιών είναι αρκετά μεγαλύτερη από αντίστοιχες 5' NCR άλλων ιών ή και κυττάρων. Με μήκος περίπου 750 νουκλεοτιδίων αποτελεί το 8-12% του συνολικού γενώματος των ιών αυτών. Η περιοχή αυτή είναι ιδιαίτερος συντηρημένη σε όλους τους Picorna ιούς και μάλιστα μεταξύ κοντινών φυλογενετικά ιών παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδικών βάσεων [32]. Μάλιστα, μεγάλο μέρος της 5' NCR αποτελείται από νουκλεοτίδια που διατηρούνται πλήρως ή σχεδόν πλήρως από είδος σε είδος. Το συγκεκριμένο γεγονός υποδηλώνει πως η περιοχή αυτή έχει πολύ μεγάλη λειτουργική σημασία για τους εντεροϊούς και τους Picorna ιούς γενικότερα, και μάλιστα η λειτουργικότητα της περιοχής αυτής είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της. Εντούτοις, με πειράματα μεταλλαξογένεσης στην 5' NCR, έχει αποδειχθεί ότι περιορισμένος αριθμός μεταλλάξεων στην περιοχή αυτή δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των ιών [33, 34].

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό της 5' NCR τόσο στους εντεροϊούς, όσο και στους υπόλοιπους Picorna ιούς, είναι ότι, συγκριτικά με άλλες περιοχές του γενώματος, αποτελείται από πολύ υψηλότερο ποσοστό νουκλεοτιδίων γουανίνης και κυτοσίνης [32, 35]. Η αυξημένη αυτή περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη ενδεχομένως

αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι η δευτεροταγής δομή διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο στη λειτουργικότητα της 5' NCR. Είναι γνωστό ότι μεταξύ γουανίνης-κυτοσίνης δημιουργούνται τρεις δεσμοί υδρογόνου, ενώ μεταξύ αδενίνης-θυμίνης μόνο δύο με αποτέλεσμα οι δευτεροταγείς δομές που αναπτύσσονται σε μόρια νουκλεϊκών οξέων με υψηλή περιεκτικότητα σε γουανίνη-κυτοσίνη να είναι πολύ πιο σταθερές. Με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή είναι δυνατόν να προβλεφθούν τέτοιου είδους δευτεροταγείς δομές [36]. Στην περίπτωση των εντεροϊών, τέτοιου είδους μοντέλα έχουν ενισχυθεί με πειραματικά δεδομένα και έχουν προταθεί συγκεκριμένου τύπου δευτεροταγείς δομές για την 5' NCR των ιών αυτών [37, 38, 39]. Τα μοντέλα αυτά προβλέπουν τρεις κύριες δομικές περιοχές στην 5' NCR των εντεροϊών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από συμμεταβλητότητα, δηλαδή μεταξύ διαφορετικών ιών διατηρούνται οι ίδιες δευτεροταγείς δομές, παρά τις όποιες διαφορές παρουσιάζουν στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων τους. Η διατήρηση αυτών των χαρακτηριστικών υποδηλώνει ότι έχουν κάποια λειτουργική σημασία. Η σημασία αυτή δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστή, το συγκεκριμένο όμως τμήμα του γενετικού υλικού των Picorna ιών ερευνάται εκτεταμένα και θεωρείται πολύ πιθανό ότι η περιοχή αυτή, παρόλο που δεν μεταφράζεται, εμπλέκεται στην σταθεροποίηση του γενώματος των ιών αυτών, καθώς επίσης και στον πολλαπλασιασμό του RNA και τον εγκλεισμό του στο καψίδιο [40]. Αυτές οι υποθέσεις ενισχύονται από το γεγονός ότι ακόμα και σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες μπορεί να επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή της 5' NCR, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την παθογένεια των ιών [41, 42, 43, 44], τη θερμοανθεκτικότητα τους και την μορφολογία των μολυσματικών πλακών [45].

- **Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame – ORF):** Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ή περιοχή ORF) είναι η κωδική περιοχή του γενώματος των εντεροϊών, δηλαδή η μεταφραζόμενη σε δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες, περιοχή.
 - Οι δομικές πρωτεΐνες είναι οι VP1, VP2, VP3 και VP4 (οι καψιδικές δηλαδή πρωτεΐνες), οι οποίες σύμφωνα με την ονοματολογία των Rueckert και Wimmer [46] ονομάζονται και 1D, 1B, 1C και 1A αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες αυτές κωδικοποιούνται από το τμήμα της περιοχής ORF που βρίσκεται προς το 5' άκρο του γενώματος. Οι VP1, VP2 και VP3 έχουν παρόμοια μεγέθη που κυμαίνονται γύρω στα 200 – 250 αμινοξέα, ενώ η VP4 έχει πολύ μικρότερο μέγεθος και αποτελείται από περίπου 70 – 85 αμινοξέα [23]. Προτού επιτευχθεί η υψηλής ευκρίνειας τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής αρκετών Picorna ιών, ήταν ήδη γνωστό ότι οι καψιδικές πρωτεΐνες παρουσίαζαν μεγάλη αμινοξική ποικιλότητα (δηλαδή διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων) μεταξύ διαφορετικών οροτύπων και ότι οι διαφορές αυτές εστιάζονταν κυρίως στις τρεις μεγαλύτερες πρωτεΐνες και συχνότερα στα υδρόφιλα τμήματα αυτών [11]. Κάτι τέτοιο είναι άλλωστε αναμενόμενο από το γεγονός ότι είναι αυτές ακριβώς οι πρωτεΐνες, οι οποίες καθορίζουν τα ιδιαίτερα αντιγονικά χαρακτηριστικά του κάθε ορότυπου, όπως δηλαδή την προσκόλληση στους κυτταρικούς υποδοχείς του ξενιστή, την εξουδετέρωση του ιού από τα αντισώματα του ξενιστή και ούτω καθ' εξής. Ο καθορισμός των τρισδιάστατων δομών διαφόρων Picorna ιών, όπως π.χ. του ρινοϊού τύπου 14 και του πολιοϊού τύπου 1 (**Εικόνα 1**), συνέβαλαν σημαντικά στην κατανόηση της δομής των καψιδικών πρωτεϊνών και του ρόλου που παίζουν στον πολλαπλασιασμό των ιών αυτών [15, 16]. Τέτοιου είδους κρυσταλλογραφικά δεδομένα απέδειξαν ότι οι διάφοροι Picorna ιοί παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες στη δομή τους και ότι οι καψιδικές πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 είναι σχεδόν όμοιες

μεταξύ τους από άποψη δομής. Κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες αποτελείται από οκτάκλινη δομή β-βαρελίου, ενώ οι κυριότερες διαφορές μεταξύ τους απαντώνται κυρίως στο μέγεθος των θηλειών (loops) ή/και άλλων προεξοχών που βρίσκονται στα β-φύλλα του πυρήνα αυτής της κατασκευής. Είναι ενδιαφέρον να τονιστεί ότι η πρωτεϊνική δομή του β-βαρελίου απαντάται επίσης στον φυτικό ιό Southern Bean Mosaic Virus (SBMV), γεγονός που υποδηλώνει ότι ενδέχεται να είναι κοινή σε πολλούς RNA ιούς με εικοσαεδρικό καψίδιο [16]. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που είναι διαθέσιμα μέχρι σήμερα για τους διάφορους Picorna ιούς, αποδεικνύουν ότι οι καψιδικές πρωτεΐνες έχουν παρόμοια δομή, θέση και σχετικό προσανατολισμό στους διάφορους ορότυπους, χωρίς βέβαια αυτό να συνεπάγεται και ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία. Επιπρόσθετα, η διαλεύκανση της δομής των ιών αυτών προσέφερε σημαντικότερες πληροφορίες σχετικά με τις αντιγονικές τους περιοχές. Αυτές οι περιοχές έχουν χαρτογραφηθεί στις καψιδικές πρωτεΐνες και συγκεκριμένα στις υπερμεταβλητές περιοχές των θηλειών (loops) που βρίσκονται στα β-φύλλα των πρωτεϊνών αυτών και οι οποίες προεξέχουν στην επιφάνεια του καψιδίου του ιού [15, 16, 47]. Με τον τρόπο αυτό, οι προεξοχές της επιφάνειας (αντιγόνα επιφάνειας του ιού) αποτελούνται από μεταβλητές αμινοξικές αλληλουχίες, “προστατεύοντας” έτσι τα πιο κρίσιμα τμήματα των καψιδικών πρωτεϊνών (τα οποία ενδεχομένως στερούνται παρόμοιας εξελικτικής δυναμικής) από τις επιθέσεις του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή.

- Οι μη δομικές (λειτουργικές) πρωτεΐνες των εντεροϊών είναι οι 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D, οι οποίες κωδικοποιούνται από το τμήμα της περιοχής ORF που βρίσκεται προς το 3' άκρο του γενώματος. Σε ορισμένες περιπτώσεις, υπάρχουν και πρόδρομα μόρια των πρωτεϊνών αυτών, τα οποία είναι λειτουργικώς ενεργά, όπως για

παράδειγμα η πρωτεΐνη 3CD που είναι πρόδρομη των 3C και 3D και εμπλέκεται στην επεξεργασία και ωρίμανση των καψιδικών πρωτεϊνών του πολιοϊού [48]. Συγκρίσεις μεταξύ των λειτουργικών πρωτεϊνών διαφορετικών Picorna ιών απέδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές είναι περισσότερο συντηρημένες σε σχέση με τις δομικές πρωτεΐνες, αφενώς εξαιτίας της μικρότερης εξελικτικής πίεσης που δέχονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και αφετέρου εξαιτίας της ανάγκης για την διατήρηση της λειτουργικότητας των ενεργών τους ενζυμικών κέντρων. Η πιο συντηρημένη από όλες τις λειτουργικές πρωτεΐνες είναι η 3D, η οποία είναι η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του ιού και παρουσιάζει περισσότερο από 95% ομολογία μεταξύ διαφόρων οροτύπων των εντεροϊών. Η λειτουργική περιοχή της πολυμεράσης αυτής φαίνεται ότι περιλαμβάνει ένα GDD (Γλυκίνη – Ασπαρτικό οξύ – Ασπαρτικό οξύ) μοτίβο, το οποίο διατηρείται εξελικτικά σε όλους τους Picorna ιούς και είναι παρόμοιο με τα μοτίβα που περιλαμβάνονται στις πολυμεράσες άλλων RNA ιών [49]. Μία άλλη πρωτεΐνη, η οποία είναι επίσης ιδιαίτερα συντηρημένη μεταξύ διαφορετικών οροτύπων είναι η 2C που πιθανότατα εμπλέκεται στη σύνθεση του ιϊκού RNA [50, 51]. Η πρωτεΐνη αυτή περιέχει πεπτιδικά μοτίβα που απαντώνται στις ελικάσες [52]. Οι ελικάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τον διαχωρισμό δίκλωνων μορίων DNA και RNA, καθώς και συμπλόκων DNA-RNA και μία τέτοια ενεργότητα είναι ενδεχομένως απαραίτητη κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού του ιϊκού RNA. Πέραν όλων αυτών, η 2C ενδέχεται να εμπλέκεται και στον καθορισμό της δομής του καψιδίου [53].

Το γεγονός ότι στους Picorna ιούς το ιϊκό RNA μεταφράζεται αρχικά σε μία μεγάλη πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, προϋποθέτει την ύπαρξη πρωτεολυτικής ικανότητας προκειμένου να δημιουργηθούν οι ώριμες λειτουργικές και δομικές πρωτεΐνες του ιού.

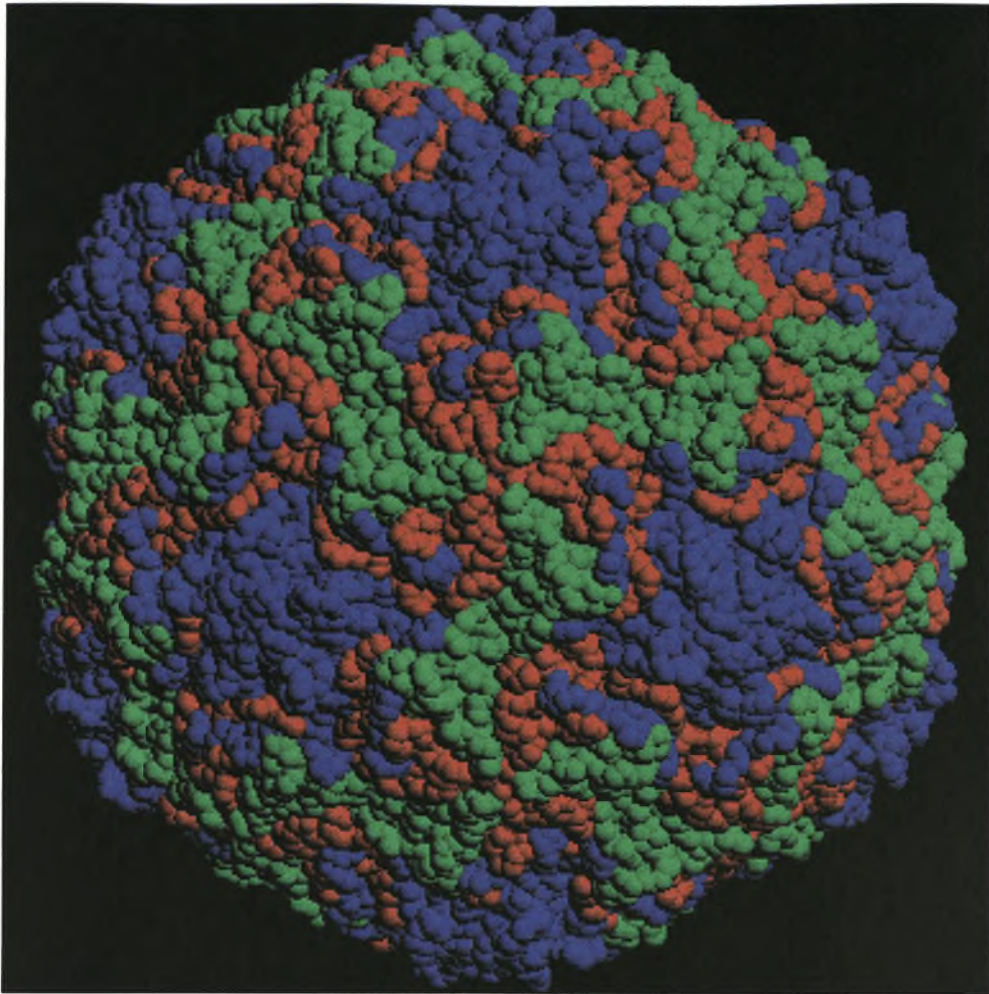
Η πρωτεΐνη 3C είναι η κύρια πρωτεάση των εντεροϊών και γενικότερα των Picorna ιών. Πρόκειται για μία πρωτεάση κυστεΐνης, η οποία στους περισσότερους Picorna ιούς φαίνεται να καταλύει τη διάσπαση πεπτιδικών δεσμών μεταξύ γλουταμίνης και γλυκίνης [54, 55]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι τα αποτελέσματα μεταλλάξεων που συμβαίνουν κοντά στο 5' άκρο του γενώματος των Picorna ιών (και που οδηγούν σε μειωμένη σύνθεση του ιϊκού RNA) μπορούν να αναστραφούν μέσω μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη 3C [56]. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά άμεσα με το ιϊκό RNA, άρα έχει και άλλες λειτουργίες πέραν των πρωτεολυτικών. Μία άλλη πολύ σημαντική πρωτεάση είναι η 2A, η οποία καταλύει την πρωταρχική διάσπαση της πρόδρομης πολυπρωτεΐνης, διαχωρίζοντας τις καψιδικές (δομικές) από τις λειτουργικές (μη δομικές) πρωτεΐνες του ιού [57]. Η πρωτεΐνη αυτή είναι πολύ πιθανό ότι εμπλέκεται στη διάσπαση της κυτταρικής πρωτεΐνης p220, η οποία αποτελεί τμήμα του συμπλόκου "cap" και επομένως είναι απαραίτητη για τον πρωτεϊνοσυνθετικό μηχανισμό του κυττάρου. Κατά συνέπεια, διάσπαση της p220 συνεπάγεται άρση της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης του ξενιστή και κατ'επέκταση έναρξη της ιϊκής πρωτεϊνοσύνθεσης και του ιϊκού πολλαπλασιασμού [58].

Η πρωτεΐνη 3B είναι μία μικρή πολυπεπτιδική αλυσίδα, η οποία έχει βρεθεί να είναι ομοιολογικά προσδεδεμένη στην 5' μη κωδική περιοχή, χωρίς όμως να έχει διαλευκανθεί πλήρως ο ρόλος της [59]. Τέλος, όσον αφορά τις 2B και 3A λειτουργικές πρωτεΐνες δεν υπάρχουν ακόμα στοιχεία που να διαφωτίζουν το ρόλο τους, αν και για την 2B πιστεύεται ότι εμπλέκεται στον προσδιορισμό των ξενιστών [60].

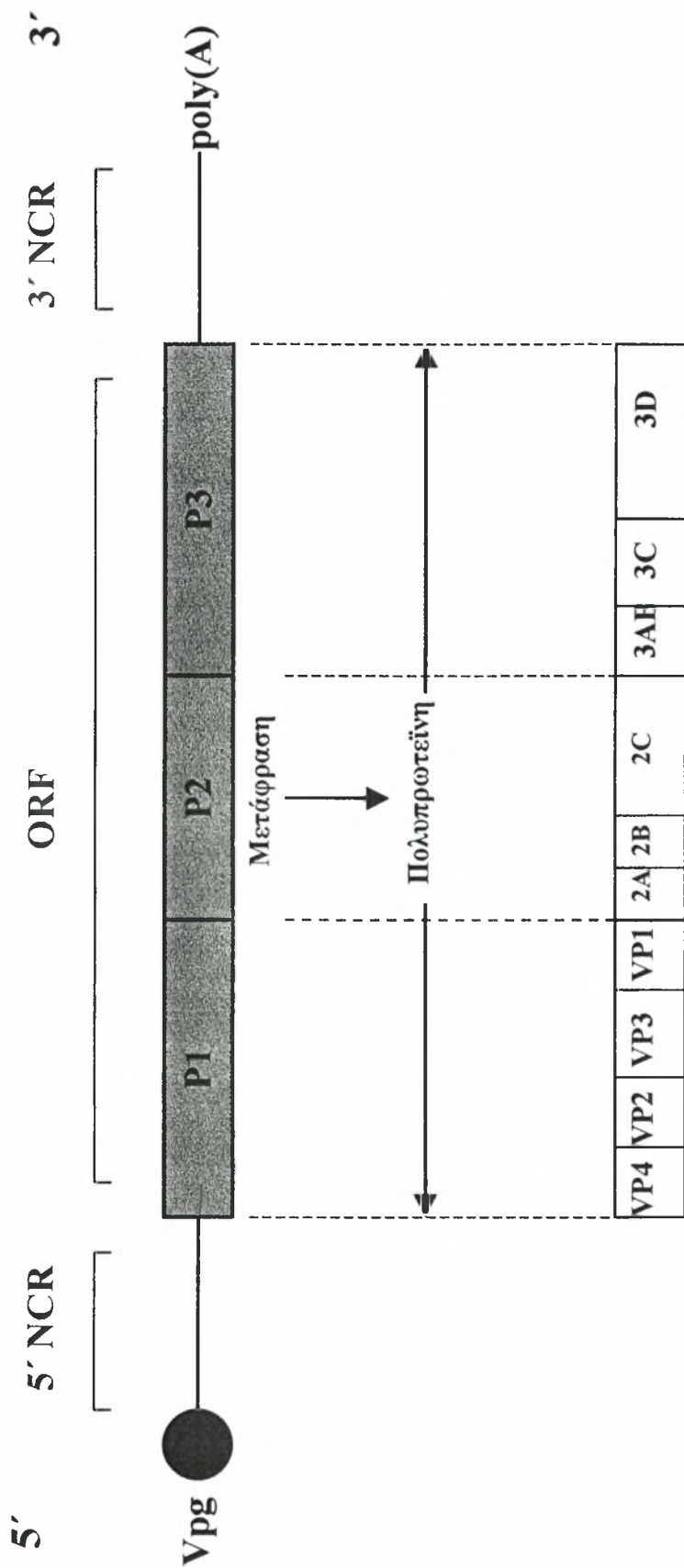
- **3' μη κωδική περιοχή (3' NCR):** Η 3' μη κωδική περιοχή του γενώματος, η οποία έπεται της περιοχής ORF (δηλαδή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης), ποικίλει σε μήκος

στους διάφορους Picorna ιούς και αποτελείται από 40 έως 120 περίπου νουκλεοτίδια, ανάλογα με τον ορότυπο. Στους εντεροϊούς συγκεκριμένα αποτελείται από 70 έως 100 νουκλεοτίδια. Αρκετές δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές έχουν προταθεί για την περιοχή αυτή [28, 61], οι οποίες υποστηρίζονται και από πειραματικά δεδομένα βιοχημικών αναλύσεων [62, 63]. Οι εντεροϊοί μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κύριες ομάδες, ανάλογα με το μήκος και την αλληλουχία της 3' NCR: στην ομάδα των Coxsackie B ιών και σε αυτή των πολιοϊών. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες έγκειται στο ότι η 3' NCR στην ομάδα των Coxsackie B ιών, έχει μήκος περίπου 100 νουκλεοτίδια και διάταξη θηλείας (stem loop), ενώ στην ομάδα των πολιοϊών έχει μήκος περίπου 70 νουκλεοτίδια και χωρίς να παρουσιάζει τη διάταξη της θηλείας [64]. Αν και δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για την λειτουργικότητα και τον ρόλο της 3' NCR, πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην έναρξη του πολλαπλασιασμού του ιϊκού RNA, χωρίς όμως να έχει χαρτογραφηθεί κάποια ειδική αλληλουχία για την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης του ιού [65].

Η **Εικόνα 3** παρουσιάζει μία αναλυτική σχηματική αναπαράσταση της δομής του γενώματος των εντεροϊών και κατά συνέπεια των Picorna ιών, ενδεικνύοντας τη λειτουργικότητα, τη θέση και το σχετικό μέγεθος των διαφόρων περιοχών που απαρτίζουν το γένωμα των ιών αυτών.



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή της δομής ενός καψιδίου εντεροϊού. Η πρωτεΐνη VP1 απεικονίζεται με μπλέ χρώμα, η VP2 με πράσινο και η VP3 με κόκκινο. Η VP4 δεν είναι ορατή γιατί βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου. Το κάθε σφαιρίδιο στην απεικόνιση αυτή αναπαριστά ένα αμινοξύ των διαφόρων πολυπεπτιδικών αλυσίδων.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του γενώματος των εντεροϊών. Στο σχήμα παρουσιάζονται η VPg, η 5' μη κωδική περιοχή (5'NCR), το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), η 3' μη κωδική περιοχή (3'NCR), και η πολυαδενυλιωμένη ουρά [poly(A) tract]. Στο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης διακρίνονται τρεις περιοχές: η P1 που κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες (VP4, VP2, VP3, VP1) και οι P2 και P3 που κωδικοποιούν για τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού (2A, 2B, 2C, 3AB, 3C, 3D).

Κύκλος ζωής και παθογένεια των εντεροϊών.

Ο παθογόνος κύκλος ζωής όλων των ιών μετά την είσοδο τους στον κατάλληλο οργανισμό-ξενιστή επιτυγχάνεται με την προσκόλληση τους σε έναν ή περισσότερους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων του οργανισμού που διαθέτουν τους αντίστοιχους υποδοχείς για τον ιό. Αυτοί οι υποδοχείς σε κανονικές συνθήκες συμμετέχουν στις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου και οι ιοί, προκειμένου να εξασφαλίσουν την επιβίωση τους μέσω των ξενιστών τους, έχουν προσαρμοσθεί εξελικτικά ώστε να χρησιμοποιούν αυτούς τους υποδοχείς ως σημεία εισόδου στο κυτταρικό περιβάλλον. Οι γνωστοί κυτταρικοί υποδοχείς των ανθρώπινων εντεροϊών παρουσιάζονται συνοπτικά στον

Πίνακα 3.

Ο υποδοχέας ο οποίος χρησιμοποιείται από όλους τους ορότυπους των πολιοϊών είναι ο PVR (Poliovirus Receptor). Πρόκειται για έναν υποδοχέα ο οποίος έχει μελετηθεί περισσότερο από οποιονδήποτε άλλον και αυτό κυρίως λόγω της ιδιαίτερης κλινικής και επιδημιολογικής σημασίας των πολιοϊών, οι οποίοι προκαλούν την πολιομυελίτιδα. Για πρώτη φορά μελετήθηκε και εντοπίστηκε με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία παρεμπόδιζαν ειδικά την προσκόλληση των τριών οροτύπων των πολιοϊών, αλλά όχι άλλων Picorna ιών [66, 67]. Μερικά χρόνια αργότερα, η κλωνοποίηση και η εύρεση της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον PVR, έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή (δηλαδή ο PVR) είναι μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών [68]. Ο PVR αποτελείται από ένα εξωκυτταρικό τμήμα που περιέχει τρεις περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μία κυτταροπλασματική απόληξη [69]. Η κυτταρική λειτουργία του PVR είναι ακόμα άγνωστη, αλλά εικάζεται ότι πιθανώς παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και συγκόλληση κυττάρων μεταξύ τους, όπως συμβαίνει

και με άλλα μέλη της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Οι πολιοϊοί μπορούν να μολύνουν μόνο πρωτεύοντα και ιστοκαλλιέργειες πρωτευόντων, αλλά έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να μολύνουν και διαγονιδιακά ποντίκια, που εκφράζουν τον ανθρώπινο PVR. Τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν θανατηφόρα παραλυτική ασθένεια, η οποία κλινικά και ιστολογικά προσομοιάζει με πολιομυελίτιδα. Το γεγονός αυτό δείχνει ξεκάθαρα ότι ο PVR είναι ο παράγοντας που καθορίζει το είδος του ξενιστή και την παθογένεια των πολιοϊών [70, 71]. Τα σημεία προσκόλλησης του πολιοϊού βρίσκονται στο τμήμα 1 του αμινικού άκρου του υποδοχέα [72, 73], υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι και τα άλλα τμήματα του υποδοχέα είναι απαραίτητα για την προσκόλληση του πολιοϊού, συμβάλλοντας είτε άμεσα, είτε έμμεσα, επηρεάζοντας τη δομή του τμήματος 1 [74, 75, 76]. Πειράματα μεταλλάξεων απέδειξαν ότι υπάρχουν τρία κυρίως σημεία στον PVR που είναι υπεύθυνα για την προσκόλληση και είσοδο του πολιοϊού στον ανθρώπινο οργανισμό [77, 78].

Όσον αφορά τους Coxsackie A ιούς, οι πρώτες ενδείξεις για τους υποδοχείς των ιών αυτής της κατηγορίας διαπιστώθηκαν όταν παρατηρήθηκε ότι μονοκλωνικά αντισώματα που εμποδίζουν την προσκόλληση ρινοϊών στην επιφάνεια των ξενιστών τους, εμποδίζουν επίσης και την προσκόλληση μερικών Coxsackie A ιών [79]. Αργότερα, όταν ανακαλύφθηκε ότι ο υποδοχέας για την πλειοψηφία των ρινοϊών είναι ο ICAM-1, προτάθηκε ότι είναι επίσης και ο υποδοχέας για αρκετούς από τους Coxsackie A ιούς [80, 81]. Κάποιοι άλλοι ορότυποι των Coxsackie A ιών χρησιμοποιούν ως υποδοχείς τις ιντεγκρίνες $\alpha_3\beta_3$ για να συνδεθούν με την κυτταρική επιφάνεια [82, 83], αλλά και τον DAF (Decay Accelerating Factor, CD55 – Παράγοντας Επιτάχυνσης της Κυτταρικής Κατάπτωσης) [84, 85].

Σχετικά με τους ECHO ιούς, τουλάχιστον δύο μόρια της κυτταρικής επιφάνειας έχουν αναγνωρισθεί ότι λειτουργούν ως υποδοχείς για τους διάφορους ορότυπους αυτής της ομάδας των ιών. Το ένα είναι η ιντεγκρίνη $\alpha_2\beta_1$ (Very Late Antigen 2 – VLA 2) [86, 87], η

κανονική κυτταρική λειτουργία της οποίας είναι η συμβολή της στη σύνδεση με το κολλαγόνο και τη λαμινίνη [88]. Το άλλο μόριο είναι ο παράγοντας DAF [89]. Πέραν αυτών, έχει επιπλέον εντοπισθεί μία πρωτεΐνη 44 kDa, η οποία λειτουργεί ως υποδοχέας για τους ECHO ιούς; η πρωτεΐνη όμως αυτή δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα [90].

Τα πρώτα αποτελέσματα της έρευνας για τους υποδοχείς των Coxsackie B ιών αναφέρθηκαν το 1985, όταν ανιχνεύθηκε μία πρωτεΐνη 49,5 kDa, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων HeLa και η οποία αλληλεπιδρά με τους ιούς αυτούς [91, 92]. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη λειτουργεί και ως υποδοχέας των αδενοϊών και για τον λόγο αυτόν είναι γνωστή ως CAR (Coxsackievirus-Adenovirus Receptor). Η ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων του CAR, έδειξε ότι ο υποδοχέας αυτός ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών [93, 94]. Η κυτταρική λειτουργία του CAR παραμένει προς το παρόν άγνωστη. Έχει επίσης αναφερθεί ότι και ο παράγοντας DAF διαδραματίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στην είσοδο του ιού στο κυτταρικό περιβάλλον [95], κατά πάσα πιθανότητα αλληλεπιδρώντας με τον CAR [96]. Εντούτοις, εικάζεται ότι η είσοδος των Coxsackie B ιών στο κύτταρο σχετίζεται και με την ιντεγκρίνη $\alpha_6\beta_6$ [97], αλλά και με μία πρωτεΐνη 100 kDa που μοιάζει με τη νουκλεολίνη, αλλά δεν έχει ακόμα πλήρως διαλευκανθεί ο ρόλος της [98].

Ο κύκλος ζωής λοιπόν, των εντεροϊών αρχίζει με την προσκόλληση του καψιδίου του ιού στους κατάλληλους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή. Η προσκόλληση αυτή δίνει τα ερεθίσματα για αλλαγές στη χωροδιάταξη του καψιδίου με πρώτη την απώλεια της καψιδικής πρωτεΐνης VP4. Ακολουθεί η απελευθέρωση του γενώματος του ιού στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, μέσω μίας διαδικασίας που δεν έχει ακόμα πλήρως διαλευκανθεί. Η **Εικόνα 4** παρουσιάζει μία σχηματική αναπαράσταση της εισόδου του νουκλεϊκού οξέος των εντεροϊών στο κυτταρόπλασμα, μέσω των υποδοχέων του κυττάρου.

Μόλις το RNA του ιού απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα, αρχίζει η μετάφραση του γενώματος με τη χρήση των ριβοσωμάτων του κυττάρου. Το αρνητικής πολικότητας RNA του ιού δρα ως mRNA, μέσω της μετάφρασης του οποίου δημιουργείται μία πολυπρωτεΐνη 210 kDa περίπου. Η πρόδρομη αυτή πολυπρωτεΐνη διασπάται με αυτοκατάλυση από τις ιϊκές πρωτεάσες 2A και 3CD, στις τέσσερις δομικές και τις επτά λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Αναλυτικότερα, η πολυπρωτεΐνη διασπάται αρχικά από την 2A ιϊκή πρωτεάση σε δύο τμήματα: στο τμήμα που περιέχει τις δομικές πρωτεΐνες και σε αυτό που περιέχει τις λειτουργικές [99]. Περαιτέρω διάσπαση αυτών των τμημάτων επιτυγχάνεται με την πρόδρομη πρωτεάση 3CD αρχικά, και με την 3C τελικά (βλέπε και το σχήμα στην **Εικόνα 3**) [100].

Έχει αποδειχθεί ότι η μετάφραση του γενώματος επιτυγχάνεται με την προσκόλληση των κυτταρικών ριβοσωμάτων σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο εσωτερικό της δευτεροταγούς δομής της 5' NCR [101, 102]. Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται IRES (Internal Ribosome Entry Site) ή RLP (Ribosome Landing Pad) [11]. Αντίθετα, τα κυτταρικά mRNA στην πλειοψηφία τους, εφαρμόζουν το “μοντέλο ανίχνευσης”, σύμφωνα με το οποίο η έναρξη της μετάφρασης συντελείται από την αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ των ριβοσωμάτων και του 5' άκρου του mRNA [103], και εν συνεχεία τα ριβοσώματα “ανιχνεύουν” το mRNA και αρχίζουν τη μετάφραση από την πρώτη τριπλέτα έναρξης (AUG) ή από κάποια επόμενη, ανάλογα με τη συνάφεια του γενετικού υλικού και του κυτταρικού περιβάλλοντος. Η αλληλουχία που περιβάλλει το κωδικόνιο έναρξης στα κυτταρικά mRNA είναι η 5' ...GCC(A/G)CCAUGG...3' [11]. Παρά τις όποιες διαφορές όσον αφορά τον τρόπο έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης, μία αλληλουχία που συμβαδίζει αρκετά με αυτό το πρότυπο φαίνεται να υπάρχει γύρω από το εναρκτήριο κωδικόνιο της περιοχής ORF (Open Reading Frame) στους περισσότερους Picorna ιούς [34]. Οι

αλληλουχίες που συμπεριλαμβάνονται στην περιοχή IRES (ή RLP) είναι πλούσιες σε νουκλεοτίδια γουανίνης και κυτοσίνης και στην δευτεροταγή τους δομή σχηματίζουν μία θηλεία (stem loop) [104]. Μεταξύ της περιοχής αυτής και του ριβοσωμικού rRNA εικάζεται ότι υπάρχει συμπληρωματικότητα, ιδιαίτερα όσον αφορά τους εντεροϊούς [105].

Η εσωτερική προσκόλληση των ριβοσωμάτων και έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των Picorna ιών και υπάρχουν ενδείξεις και για άλλους ιούς ότι χρησιμοποιούν αυτό το μοντέλο. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα αυτής της στρατηγικής είναι η ανεξάρτηση της ιϊκής πρωτεϊνοσύνθεσης από το σύμπλοκο cap, το οποίο είναι απαραίτητο για τα κυτταρικά mRNA που ακολουθούν το “μοντέλο ανίχνευσης”. Όπως έχει προαναφερθεί, η ιϊκή πρωτεάση 2A διασπά την κυτταρική πρωτεΐνη p220 (η οποία αποτελεί τμήμα του συμπλόκου cap) και με τον τρόπο αυτό παρεμποδίζεται η πρωτεϊνοσύνθεση του κυττάρου-ξενιστή αλλά όχι αυτή του ιού, η οποία είναι ανεξάρτητη από το σύμπλοκο cap [106].

Μόλις, λοιπόν, ολοκληρωθεί η μετάφραση των δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών, ο ιός είναι έτοιμος να αρχίσει τον πολλαπλασιασμό του γενώματος του εντός του ξενιστή. Ο πολλαπλασιασμός του RNA του ιού επιτυγχάνεται με την RNA εξαρτώμενη RNA ιϊκή πολυμεράση και με τη βοήθεια άλλων παραγόντων ιϊκής αλλά και κυτταρικής προέλευσης [107, 108, 109]. Το πρώτο στάδιο είναι η αντιγραφή του RNA σε συμπληρωματικό RNA αρνητικής πολικότητας, το οποίο στη συνέχεια λειτουργεί ως μήτρα για την παραγωγή νέων μορίων RNA θετικής πολικότητας [110, 111, 112]. Στη συνέχεια ακολουθεί ο εγκλεισμός του γενετικού υλικού σε ένα πρόιμης μορφής ιϊκό σωματίδιο, το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3. Μόλις ολοκληρωθεί ο εγκλεισμός του γενώματος, η VP0 διασπάται στις VP2 και VP4 και δημιουργείται πλέον το ώριμο ιϊκό σωματίδιο [113]. Ανά

κύτταρο-ξενιστή παράγονται περίπου 10^4 - 10^5 καινούργια ιικά σωματίδια, τα οποία απελευθερώνονται και προσβάλλουν νέα κύτταρα [114].

Ο αρχικός ξενιστής μετά την απελευθέρωση των νέων ιών τελικά καταστρέφεται, αφενός λόγω του μεγάλου αριθμού των ιών που παράγονται και αφετέρου λόγω της αναστολής των διαδικασιών της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης [115]. Τα προαναφερθέντα στάδια του λυσιγόνου κύκλου ζωής ενός εντεροϊού στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή αναπαρίστανται σχηματικά στην **Εικόνα 4**.

Οι εντεροϊοί μεταδίδονται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και εισάγονται στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπου από το στόμα (**Εικόνα 5**). Η περίοδος επώασης (που ορίζεται ως ο χρόνος που μεσολαβεί από την είσοδο του ιού στον οργανισμό, έως την εμφάνιση των συμπτωμάτων και την έναρξη της ασθένειας) είναι συνήθως από 7 έως 14 ημέρες, αλλά μπορεί να ποικίλει και από 2 έως 35 ημέρες σε ακραίες περιπτώσεις [116]. Μετά τον αρχικό και συνεχόμενο πολλαπλασιασμό των εντεροϊών στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και του εντέρου, προκαλείται χαμηλού επιπέδου ιαιμία, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε περαιτέρω πολλαπλασιασμό των ιών σε κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και τελικά στο όργανο-στόχο (νωτιαίο μυελό, εγκέφαλο, μήνιγγες, μυοκάρδιο, δέρμα).

Ο ιός εκκρίνεται από τα κόπρανα σχεδόν αμέσως μετά την είσοδο και τον πολλαπλασιασμό του στον οργανισμό και για αρκετές εβδομάδες μετά (έως και οκτώ εβδομάδες). Επιπλέον παραμένει στον φάρυγγα για μία με δύο εβδομάδες μετά τη μόλυνση σε άτομα που παρουσιάζουν είτε κλινικές, είτε υποκλινικές ενδείξεις. Οι εντεροϊοί μπορούν να απομονωθούν από κόπρανα, φαρυγγικά επιχρίσματα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, νωτιαίο μυελό, εγκέφαλο, περικαρδιακό υγρό και ιστό του μυοκαρδίου, επιπεφυκότα και πλεγές του

δέρματος, αλλά σπανιότατα και πολύ δύσκολα από το αίμα, καθώς η περίοδος της αιμίας που προκαλούν είναι πολύ μικρή. Κάθε τύπος εντεροϊού έχει και το δικό του όργανο-στόχο [116]. Δύο ή περισσότεροι εντεροϊοί μπορούν να πολλαπλασιαστούν ταυτόχρονα στο γαστρεντερικό σύστημα (γεγονός που συμβάλλει στον γενετικό ανασυνδυασμό και τη φυσική εξέλιξη του γένους), αλλά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ο πολλαπλασιασμός του ενός μπορεί να είναι ανταγωνιστικός για τον πολλαπλασιασμό των υπολοίπων [117]. Επομένως, μία ενεργός λοίμωξη από εντεροϊό κατά τη διάρκεια του εμβολιασμού για πολιομυελίτιδα, θα μπορούσε να εμποδίσει τον εξασθενημένο, αλλά ζωντανό ιό του εμβολίου Sabin να εγκατασταθεί στο έντερο και να προκαλέσει την επιθυμητή ανοσία. Στην περίπτωση αυτή, η επανάληψη του εμβολιασμού είναι απαραίτητη.

Οι ασθένειες που προκαλούνται από τους ανθρώπινους εντεροϊούς ποικίλουν σε συμπτώματα και σε σοβαρότητα από ασυμπτωματικές λοιμώξεις και κοινό κρύωμα, έως θανατηφόρες περιπτώσεις μηνιγγίτιδας, εγκεφαλίτιδας και παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Η γεωγραφική κατανομή των εντεροϊών είναι παγκόσμια και σε ήπια κλίματα, η κυκλοφορία τους αυξάνεται στη διάρκεια του καλοκαιριού και στις αρχές του φθινοπώρου [118]. Επιπλέον, ευνοείται ιδιαίτερα η ανάπτυξη τους σε περιοχές με μεγάλη πληθυσμιακή πυκνότητα και κακές συνθήκες υγιεινής [119]. Μερικοί από τους ορότυπους των εντεροϊών είναι ενδημικοί και η συχνότητα εμφάνισης τους παραμένει η ίδια περίπου, χωρίς αλλαγές από χρόνο σε χρόνο, ενώ άλλοι ορότυποι προκαλούν επιδημίες και στα μεταξύ των επιδημιών διαστήματα η συχνότητα εμφάνισης τους είναι ιδιαίτερα μειωμένη [120].

Οι πολιοϊοί μπορούν να προκαλέσουν από αδιαφοροποίητη εμπύρετη νόσο (κυρίως τη διάρκεια του καλοκαιριού), έως και θανατηφόρο παραλυτική πολιομυελίτιδα [65].

Οι Coxsackie B ιοί, αντίστοιχα μπορούν να προκαλέσουν πλευροδυνία (τύποι 1-5), άσηπτη μηνιγγίτιδα (τύποι 1-6) και σπανίως παράλυση (τύποι 2-5). Επιπλέον είναι

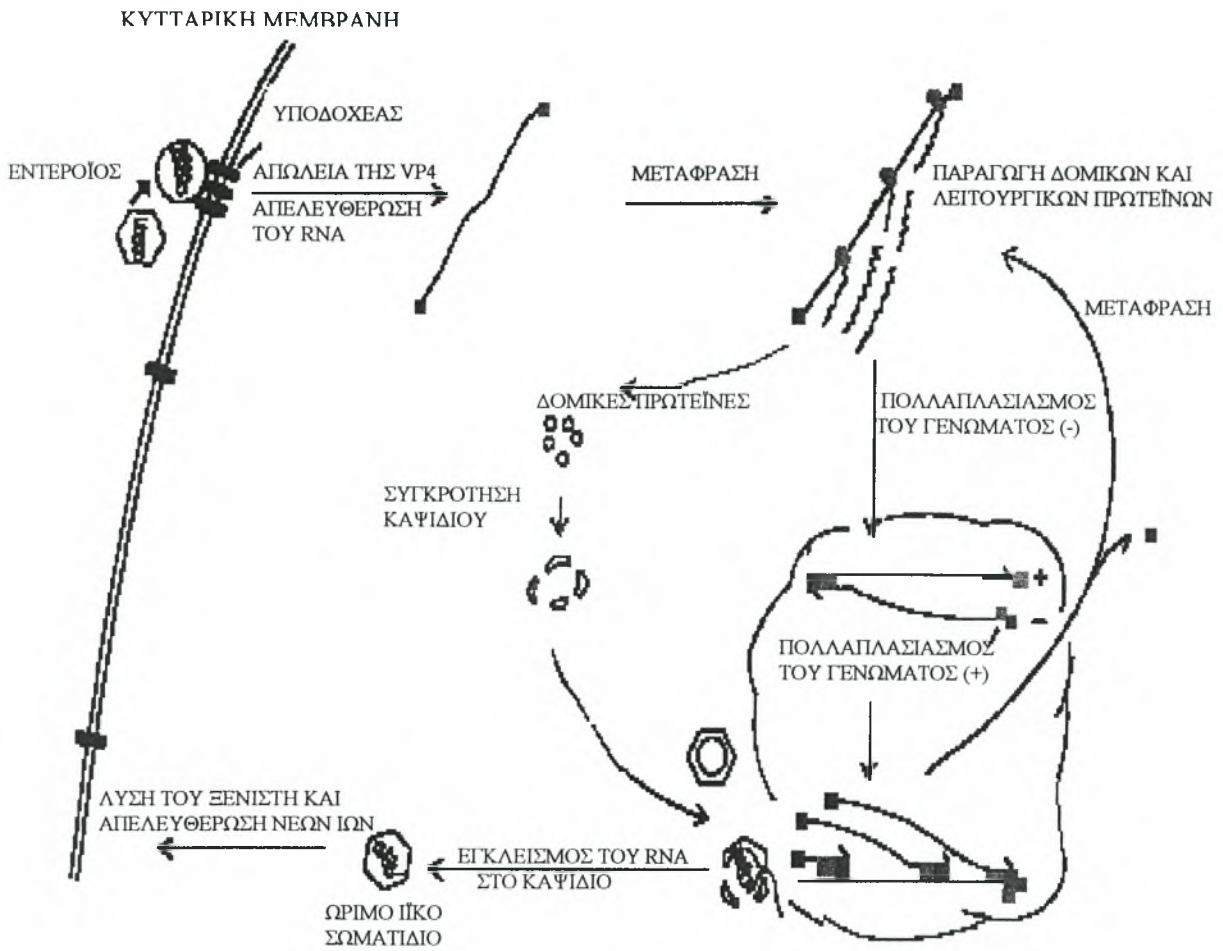
υπεύθυνοι για αρκετές περιπτώσεις περικαρδίτιδας και μυοκαρδίτιδας (τύποι 1-5), λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού και πνευμονία (τύποι 4 και 5), δερματικό εξάνθημα και ηπατίτιδα (τύπος 5), σύνδρομο χρόνιας κόπωσης κ.ο.κ. [116]. Μερικά στελέχη τόσο των Coxsackie B ιών, όσο και των πολιοϊών έχουν συνδεθεί με τα περισσότερα περιστατικά εντεροϊογενούς μηνιγγίτιδας [121], ενώ για τα περισσότερα περιστατικά ιογενούς μυοκαρδίτιδας έχουν ενοχοποιηθεί οι Coxsackie B ιοί [122].

Οι Coxsackie A ιοί μπορούν να προκαλέσουν μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, αιμορραγική επιπεφυκίτιδα, αλλά και την ασθένεια χειρών, ποδών και στόματος (Hand-Foot-and-Mouth Disease – HFMD) [116].

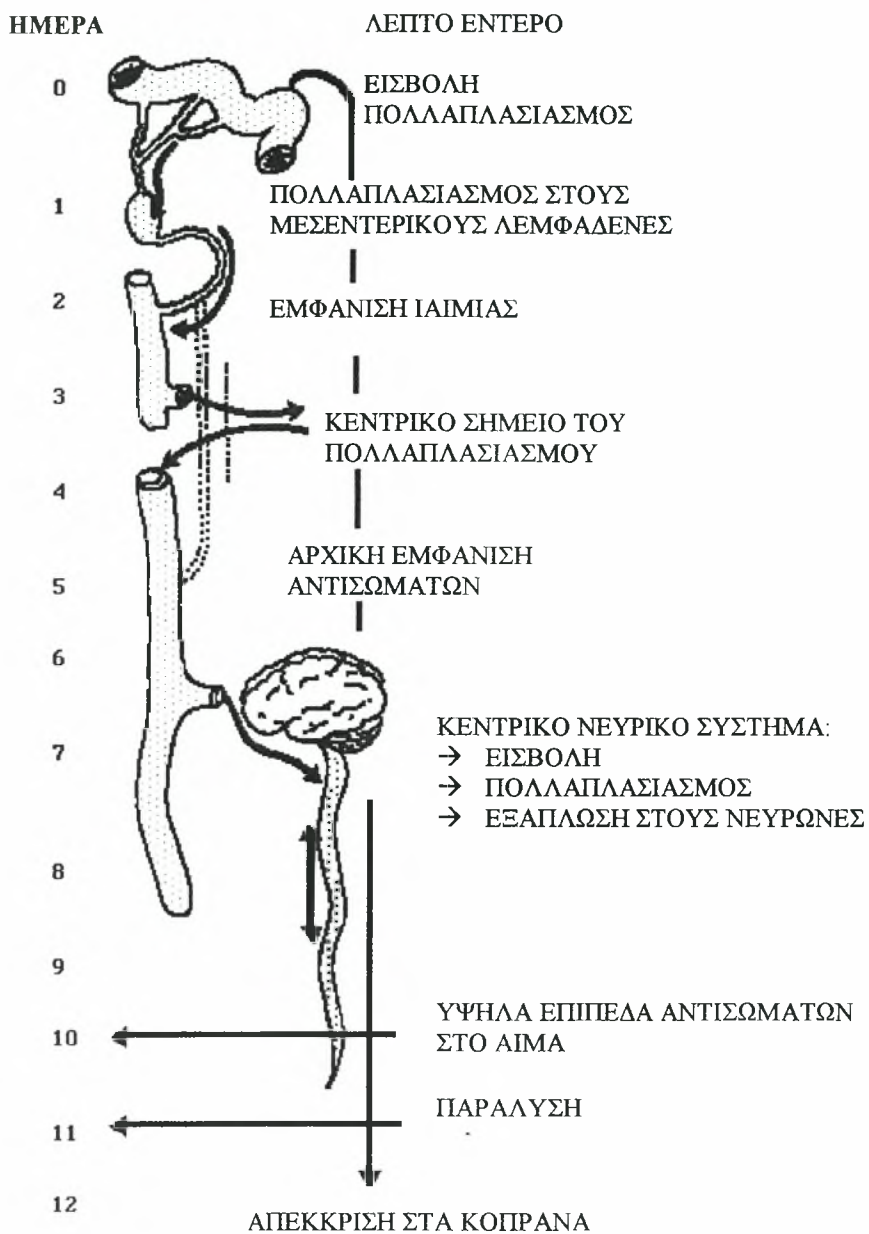
Οι ECHO ιοί συνήθως παραμένουν ασυμπτωματικοί ή προκαλούν μικρής σημασίας λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος, όπως άλλωστε υποδηλώνεται και από το όνομα τους (Enteric Cytopathic Human Orphan viruses – Orphan, δηλαδή δεν συνδέονται συνήθως με κάποια ασθένεια). Έχουν όμως ενοχοποιηθεί για περιστατικά άσηπτης μηνιγγίτιδας, εγκεφαλίτιδας, λοιμώξεις των νεογνών κ.ο.κ. [123, 124].

Πίνακας 3. Υποδοχείς των ανθρώπινων εντεροϊών

Ιός	Υποδοχέας
Πολιοϊοί	PVR (Poliovirus Receptor)
Coxsackie A ιοί	Ιντεγκρίνη $\alpha_3\beta_3$ ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1) DAF (Decay Accelerating Factor)
ECHO ιοί	Ιντεγκρίνη $\alpha_2\beta_1$ (VLA-2/Very Late Antigen-2) DAF (Decay Accelerating Factor)
Coxsackie B ιοί	Υποδοχέας για αδενοϊούς και Coxsackie B ιούς (CAR/Coxsackievirus-Adenovirus Receptor) DAF



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της εισόδου και του πολλαπλασιασμού ενός εντεροϊού στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση του παθογόνου κύκλου ζωής ενός εντεροϊού στον ανθρώπινο οργανισμό.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης.

Η διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς είναι πολύ σημαντική, δεδομένου ότι αυτή η ομάδα των Ρικοπα ιών είναι αρκετές φορές υπεύθυνη για σοβαρότατες ασθένειες και επιδημίες με μεγάλο κοινωνικό και οικονομικό κόστος. Οι πολιοϊοί για παράδειγμα, είναι υπεύθυνοι για την παραλυτική πολιομυελίτιδα, κρούσματα της οποίας απαντώνται ακόμη και σήμερα σε υποβαθμισμένες περιοχές του πλανήτη μας. Κατά συνέπεια, η ταχεία και ακριβής ταυτοποίηση των εντεροϊώσεων μπορεί να συμβάλλει τα μέγιστα τόσο στην άμεση και αποτελεσματική αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων, όσο και στην πρόληψη τους. Η απόκτηση πληροφοριών για τους ορότυπους των εντεροϊών που ανιχνεύονται σε κλινικά, αλλά και περιβαλλοντικά δείγματα αποτελεί ένα αναπόσπαστο τμήμα των επιδημιολογικών προγραμμάτων παρακολούθησης της κυκλοφορίας και της εξέλιξης των εντεροϊών στους ανθρώπινους πληθυσμούς.

Κατά κανόνα, η εργαστηριακή διάγνωση των εντεροϊώσεων βασίζεται στην απομόνωση των ιών σε κυτταροκαλλιέργεια και στην επακόλουθη ταυτοποίηση τους με την μέθοδο της οροεξουδετέρωσης. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες κυτταρικές σειρές για την απομόνωση και καλλιέργεια των εντεροϊών, οι περισσότεροι από τους οποίους αναπτύσσονται ικανοποιητικώς σε αυτές. Εντούτοις, η ταυτοποίηση των εντεροϊών με οροεξουδετέρωση, είναι ιδιαίτερος προβληματική, δεδομένου ότι παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης λίγων μόνο οροτύπων εντεροϊών, είναι εξαιρετικά χρονοβόρος και πολλές φορές αδυνατεί να δώσει σαφή αποτελέσματα για την ταυτότητα ενός απομονωθέντος στελέχους εξαιτίας των ταχέων ρυθμών εξέλιξης των αντιγονικών σημείων των εντεροϊών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η χρησιμοποίηση σύγχρονων τεχνικών της μοριακής βιολογίας για την ανάπτυξη μίας ταχείας και αξιόπιστης μεθόδου ταυτοποίησης

στελεχών εντεροϊών από κλινικά δείγματα για τη διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, αλλά και την επιδημιολογική παρακολούθηση των ιώσεων αυτών. Η εισαγωγή της μεθόδου της Αντίστροφης Μεταγραφάσης – Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction / RT-PCR) για την ευρεία ανίχνευση των εντεροϊών έδωσε μία νέα ώθηση προς αυτή την κατεύθυνση. Επιπρόσθετα, η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ανίχνευση του λοιμογόνου παράγοντα απευθείας από το κλινικό δείγμα του ασθενούς ή ατόμου από το περιβάλλον του ασθενούς. Κατά συνέπεια η τεχνική της RT-PCR και οι παραλλαγές αυτής μπορούν να αντικαταστήσουν τις συμβατικές τεχνικές απομόνωσης εντεροϊών. Στην παρούσα μελέτη η τεχνική της RT-PCR εφαρμόστηκε στην ανίχνευση των πολιοϊών, των Coxsackie B και των ECHO ιών, σε συνδυασμό με τη μελέτη των πολυμορφισμών μήκους μετά από επώαση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (ανάλυση RFLP / Restriction Fragment Length Polymorphism analysis) για την περαιτέρω ταυτοποίηση και διαφοροποίηση των ιών αυτών. Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε στη μελέτη αυτή βασίζεται στη χρήση της τεχνικής της RT-PCR με ειδικά εκκινητικά μόρια που ανιχνεύουν αντίστοιχες περιοχές της 5'μη κωδικής περιοχής του γενετικού υλικού των εντεροϊών. Η περιοχή αυτή του γενώματος των εντεροϊών επιλέχθηκε λόγω του ότι είναι ιδιαίτερα συντηρημένη μεταξύ των διαφόρων οροτύπων των εντεροϊών, δεδομένης της εξαιρετικά μεγάλης σημασίας της στον πολλαπλασιασμό και στη μετάφραση του γενετικού υλικού. Η μοριακή μελέτη αυτής της περιοχής του γενετικού υλικού των εντεροϊών, πέραν της συνεισφοράς στη διάγνωση και επιδημιολογική παρακολούθηση των ιώσεων, συμβάλλει σε πολύ μεγάλο βαθμό και στην κατανόηση της βιολογίας και των εξελικτικών σχέσεων των ιών αυτών.

Βιβλιογραφία

1. Ghalioungui P. (1973). *The House of Life: Magic and Medical Science in Ancient Egypt*. B.M. (Israel, ed.) Amsterdam.
2. Minor P.D. (1992). The molecular biology of poliovaccines. *Journal of General Virology*, 73, 3065-3077.
3. Landsteiner K., Popper E. (1908). Mikroskopische preparate von einen menschlichen und zwei affenmunckenmarken. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 21, 1830.
4. Sabin A.B., Olitsky P.K. (1936). Cultivation of poliovirus in vitro in human embryonic nervous tissue. *Proceedings of the Society of Experimental and Biological Medicine*, 34, 357-359.
5. Enders J.F., Weller T.H., Robbins F.C. (1949). Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissue. *Science*, 109, 85-87.
6. Dalldorf G., Sickles G.M. (1948). An unidentified filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science*, 108, 61-62.
7. Dalldorf G., Sickles G.M., Plager H., Gifford R. (1949). A virus recovered from the feces of "poliomyelitis" patients pathogenic for suckling mice. *Journal of Experimental Medicine*, 89, 567-582.
8. Muir P., van Loon A.M. (1997). Enterovirus infections of the central nervous system. *Intervirology*, 40, 153-166.
9. Andino R., Boddeker N., Silvera D., Gamarnik A. (1999). Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends in Microbiology*, 7, 855-861.

10. Hyypia T., Hovi T., Knowles N.J., Stanway G. (1997). Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *Journal of General Virology*, 78, 1-11.
11. Stanway G. (1990). Structure, function and evolution of picornaviruses. *Journal of General Virology*, 71, 2483-2501.
12. Eggers H.J. (1998). Accomplishments and challenges in picornavirology as observed by a medical doctor. *Clinical and Diagnostic Virology*, 9, 67-76.
13. Luo M., Vriend G., Kamer G., Minor I., Arnold E., Rossmann M.G., Boege U., Scraba D.G., Duke G.M., Palmenberg A.C. (1987). The atomic structure of Mengovirus at 3.0 Å resolution. *Science*, 235, 182-191.
14. Logan D., Abu-Ghazaleh R., Blakemore W., Curry S., Jackson T., King A., Lea S., Lewis R., Newman J., Parry N., et al. (1993). Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 362, 566-568.
15. Hogle J.M., Chow M., Filman D.J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229, 1385-1365.
16. Rossmann M.G., Arnold E., Erickson J.W., Frankenberger E.A., Griffith J.P., Hecht H.J., Johnson J.E., Kamer G., Luo M., Mosser A.G., et al. (1985). Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, 317, 145-153.
17. Pringle C.R. (1999). Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Archives of Virology*, 144/10, 2065-2070.
18. King, A.M.Q., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypia T., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Palmenberg A.C., Skern T., Stanway G. (2000). Picornaviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of*

- Viruses. (Van Regenmortel M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., et al eds), Pp. 657-673. Academic Press, New-York, San Diego.
19. Pringle C.R. (1999). Virus Taxonomy – 1999. The Universal System of Virus Taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Archives of Virology*, 144/2, 421-429.
 20. Rueckert R.R. (1990). Picornaviridae and their replication. In Fields BN, Knipe DM et al eds: *Virology*. New York, Raven Press 1990, 507-548.
 21. Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A.. (1999). Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *Journal of Virology*, 73, 3, 1941-1948.
 22. Rossmann MG., Johnson J.E. (1989). Icosahedral RNA virus structure. *Annual Reviews of Biochemistry*, 58, 533-573.
 23. Σιαφάκας Ν., Γεωργοπούλου Α., Μαρκουλάτος Π., Σπύρου Ν. (1999). Βιολογία των εντεροϊών: δομή, λειτουργία, παθογένεση και εξέλιξη τους. Μέρος Α'. *Ελληνική Ιολογία*, 4, 1, 7-24.
 24. Chow M., Newman J.F., Filman D., Hogle J.M., Rowlands D.J., Brown F. (1987). Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 327, 482-486.
 25. Ratka M., Lackmann M., Ueckermann C., Karlins U., Koch G. (1989). Poliovirus-associated protein kinase: destabilization of the virus capsid and stimulation of the phosphorylation reaction by Zn²⁺. *Journal of Virology* 63, 9, 3954-3960.
 26. Sonnenberg N. (1990). Poliovirus translation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 161, 23-47.

27. Richardson O.C., Ehrenfeld E. (1990) Poliovirus RNA replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 161, 89-119.
28. Poyry T., Kinnunen L., Hyypia T., Brown B., Horsnell C., Hovi T., Stanway G. (1996). Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *Journal of General Virology*, 77, 1699-1717.
29. Hellen C.U.T., Wimmer E. (1995). Enterovirus genetics. In H.A. Rotbart (ed.) *Human enterovirus infections*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 25-72.
30. Nomoto A., Detjen B., Pozzatti R., Wimmer E. (1977). The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature*, 268, 208-213.
31. Armstrong J.A., Edmonds M., Nakazato H., Phillips B.S., Vaughan M.H. (1972). Polyadenylic acid sequences in the virion RNA of poliovirus and eastern equine encephalitis virus. *Science*, 176, 526-528.
32. Stanway G., Hughes P.J., Mountford R.C., Minor P.D., Almond J.W. (1984). The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Research* 12, 20, 7859-7875.
33. Kuge S., Nomoto A. (1987). Construction of a viable detection and insertion mutants of the Sabin Strain of type 1 poliovirus: function of the 5' non coding sequence in viral replication. *Journal of Virology*, 61, 1478-1487.
34. Trono D., Andino R., Baltimore D. (1988). An RNA sequence of hundreds of nucleotides at the 5' end of poliovirus RNA is involved in allowing viral protein synthesis. *Journal of Virology*, 62, 2291-2299.

35. Palmenberg A.C. (1987). Comparative organization and genome structure in picorna viruses. In *Positive Strand RNA Viruses, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series* (eds. M.A. Brinton & R. Rueckert), 54, 25-34.
36. Clarke B.E., Brown A.L., Currey K.M., Newton S.E., Rowlands D.J., Carroll A.R. (1987). Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Research*, 15, 7067-7079.
37. Rivera V.M., Welsch J.D., Maizel J.V. Jr. (1988). Comparative sequence analysis of the 5' non coding region of the enteroviruses and rhinoviruses. *Virology*, 165, 201-209.
38. Pilipenko E.V., Blinov V.M., Romanova L.I., Sinyakov A.N., Maslova S.V., Agol V.I. (1989). Conserved structural domains in the 5'-untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence. *Virology*, 168, 2, 201-209.
39. Skinner M.A., Racaniello V.R., Dunn G., Cooper J., Minor P.D., Almond J.W. (1989). New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *Journal of Molecular Biology* 207, 379-392.
40. Andino R., Rieckhof G.E., Achacoso P.L., Baltimore D. (1993). Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNA complex formed around the 5' end of viral RNA. *EMBO Journal*, 12, 3587-3598.
41. Cann A.J., Stanway G., Hughes P.J., Minor P.D., Evans D.M.A., Schild G.C., Almond J.W. (1984). Reversion to neurovirulence of the live attenuated Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *Nucleic Acids Research*, 12, 7787-7792.

42. Kawamura N., Kohara M., Abe S., Komatsu T., Tago K., Arita M., Nomoto A. (1989). Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. *Journal of Virology*, 63, 1302-1309.
43. Moss E.G., O'Neil R.E., Racaniello V.R. (1989). Mapping of attenuating sequences of an avirulent poliovirus type 2 strain. *Journal of Virology*, 63, 1884-1890.
44. Tu Z., Chapman N.M., Hufnagel G., Tracy S., Romero J.R., Barry W.H., Zhao L., Currey K., Shapiro B. (1995). The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *Journal of Virology*, 69, 4607-4618.
45. Ramshing A.I., Collins D.N. (1995). A point mutation in the VP4 coding sequence of coxsackievirus B4. *Archives of Virology*, 140, 2215-2226.
46. Rueckert R.R., Wimmer E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *Journal of Virology*, 50, 957-959.
47. Acharya R., Fry E., Stuart D., Fox G., Rowlands D., Brown F. (1989). The three dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 337, 709-716.
48. Ypma-Wong M.F., Dewalt P.G., Johnson V.H., Lamb J.G., Semler B.L. (1988). Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology*, 166, 1, 265-270.
49. Kamer G., Argos P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research*, 12, 7269-7282.

50. Dever T.E., Glynias M.J., Merrick W.C. (1987). GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 84: 1814-1818.
51. Hodgman T.C. (1988). A new superfamily of replicative proteins. *Nature*, 333: 22-23.
52. Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Donchenko A.P., Blinov V.M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Research*, 17, 12, 4713-4730.
53. Li J.P., Baltimore D. (1990). An intragenic revertant of a poliovirus 2C mutant has an uncoating defect. *Journal of Virology*, 64, 1102-1107.
54. Hanecak R., Semler B.L., Anderson C.W., Wimmer E. (1982). Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: antibodies to polypeptide P3-7c inhibit cleavage at glutamine-glycine pairs. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 79, 3973-3977.
55. Hanecak R., Semler B.L., Ariga H., Anderson C.W., Wimmer E. (1984). Expression of a cloned gene segment of poliovirus in *E.coli*: evidence of autocatalytic production of the viral proteinase. *Cell*, 37, 1063-1073.
56. Andino R., Rieckhof G.E., Trono D., Baltimore D. (1990). Substitutions in the protease (3C^{pro}) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 5' non coding region. *Journal of Virology*, 64, 2, 607-612.
57. Toyoda H., Nicklin M.J.H., Murray M.G., Anderson C.W., Dunn J.J., Studier F.W., Wimmer E. (1986). A second virus encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell*, 45, 761-770.

58. Krausslich H.G., Nicklin M.J.H., Toyoda H., Wimmer E., (1987). Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eukaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *Journal of Virology*, 61, 2711-2718.
59. Flanagan J.B., Petterson R.F., Ambros V., Hewlett M.J., Baltimore D. (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5' terminus of virion and replicative RNAs of poliovirus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 74, 961-965.
60. Lomax N.B., Yin F.H. (1989). Evidence for the role of the P2 protein of human rhinovirus in its host range change. *Journal of Virology*, 63, 2396-2399.
61. Iizuka N., Kuge S., Nomoto A. (1987). Complete nucleotide sequence of the genome of coxsackievirus B1. *Virology*, 156: 64-73
62. Jacobson S.J., Konings D.A.M., Sarnow P. (1993). Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *Journal of Virology*, 62: 2961-2971.
63. Pilipenko E.V., Maslova S.V., Sinyakov A. N., Agol V. I. (1992). Towards identification of cis-acting elements involved in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs: a proposal for the existence of tRNA-like terminal structures. *Nucleic Acids Research*, 20: 1739-1745.
64. Auvinen P., Stanway G., Hyppia T. (1989). Genetic diversity of enterovirus subgroups. *Archives of Virology*, 104: 175-186.
65. Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M.N., Poyry T., Weissbriech B., Kandolf R., Cleator G.M., van Loon A.M. (1998). Molecular typing of enteroviruses: Current status and future requirements. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 1, 202-207.

66. Minor P.D., Pipkin P.A., Hockley D., Schild G.C., Almond J.W. (1984). Monoclonal antibodies which block cellular receptors of poliovirus. *Virus Research*, 1, 3, 203-212.
67. Nobis P., Zibirre R., Meyer G., Kuhne J., Warnecke G., Koch G. (1985). Production of a monoclonal antibody against an epitope on HeLa cells that is the functional poliovirus binding site. *Journal of General Virology*, 66, 2563-2569.
68. Mendelsohn C.L., Wimmer E., Racaniello V.R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56, 5, 855-865.
69. Koike S., Horie H., Ise I., Okitsu A., Yoshida M., Iizuka N., Takeuchi K., Takegami T., Nomoto A. (1990). The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO Journal*, 9, 10, 3217-3224.
70. Koike S., Taya C., Kurata T., Abe S., Ise I., Yonekawa H., Nomoto A. (1991). Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 3, 951-955.
71. Ren R.B., Costantini F., Gorgacz E.J., Lee J.J., Racaniello V.R. (1990). Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell*, 63, 2, 353-362.
72. Freistadt M.S., Racaniello V.R. (1991). Mutational analysis of the cellular receptor for poliovirus. *Journal of Virology*, 65, 3873-3876.
73. Koike S., Ise I., Nomoto A. (1991). Functional domains of the poliovirus receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 4104-4108.
74. Bernhardt G., Harber J., Zibert A., de Crombrughe M., Wimmer E. (1994). The poliovirus receptor: identification of domains and amino acid residues critical for virus binding. *Virology*, 203, 2, 344-356.

75. Selinka H.C., Zibert A., Wimmer E. (1991). Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intracellular adhesion molecule 1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 3598-3602.
76. Selinka H.C., Zibert A., Wimmer E. (1992). A chimaeric poliovirus/CD4 receptor confers susceptibility to poliovirus on mouse cells. *Journal of Virology*, 66, 2523-2526.
77. Aoki J., Koike S., Ise I., Sato-Yoshida Y., Nomoto A. (1994). Amino acid residues on human poliovirus receptor involved in interaction with poliovirus. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 11, 8431-8438.
78. Morrison M.E., He Y.J., Wien M.W., Hogle J.M., Racaniello V.R. (1994). Homolog-scanning mutagenesis reveals poliovirus receptor residues important for virus binding and replication. *Journal of Virology*, 68, 4, 2578-2588.
79. Colonno R.J., Callahan P.L., Leippe D.M., Rueckert R.R., Tomassini J.E. (1989). Inhibition of rhinovirus attachment by neutralizing monoclonal antibodies and their Fab fragments. *Journal of Virology*, 63, 1, 36-42.
80. Greve J.M., Davis G., Meyer A.M., Forte C.P., Yost S.C., Marlor C.W., Kamarck M.E., McClelland A. (1989). The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*, 56, 5, 839-847.
81. Staunton D.E., Merluzzi V.J., Rothlein R., Barton R., Marlin S.D., Springer T.A. (1989). A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell*, 56, 5, 849-853.
82. Shafren D.R., Dorahy D.J., Ingham R.A., Burns G.F., Barry R.D. (1997). Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *Journal of Virology*, 71, 6, 4736-4743.

83. Lublin D.M., Atkinson J.P. (1989). Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annual Reviews of Immunology* 7, 35-58.
84. Roivainen M., Piirainen L., Hovi T., Virtanen I., Riikonen T., Heino J., Hyypia T. (1994). Entry of coxsackievirus A9 into host cells: specific interactions with alpha v beta 3 integrin, the vitronectin receptor. *Virology*, 203, 2, 357-365.
85. Roivainen M., Hyypia T., Piirainen L., Kalkkinen N., Stanway G., Hovi T. (1991). RGD-dependent entry of coxsackievirus A9 into host cells and its bypass after cleavage of VP1 protein by intestinal proteases. *Journal of Virology*, 65, 9, 4735-4740.
86. Bergelson J.M., Shepley M.P., Chan B.M., Hemler M.E., Finberg R.W. (1992). Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science*, 255, 1718-1720.
87. Elices M.J., Hemler M.E. (1989). The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86, 24, 9906-9910.
88. King S.L., Kamata T., Cunningham J.A., Emsley J., Liddington R.C., Takada Y., Bergelson J.M. (1997). Echovirus 1 interaction with the human very late antigen-2 (integrin alpha2beta1) I domain. Identification of two independent virus contact sites distinct from the metal ion-dependent adhesion site. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 45, 28518-28522.
89. Ward T., Pipkin P.A., Clarkson N.A., Stone D.M., Minor P.D., Almond J.W. Decay-accelerating factor CD55 is identified as the receptor for echovirus 7 using CELICS, a rapid immuno-focal cloning method. *EMBO Journal*, 13, 21, 5070-5074.

90. Mbida A.D., Pozzetto B., Gaudin O.G., Grattard F., Le Bihan J.C., Akono Y., Ros A. (1992). A 44,000 glycoprotein is involved in the attachment of echovirus-11 onto susceptible cells. *Virology*, 189, 1, 350-353.
91. Mapoles J.E., Krah D.L., Crowell R.L. (1985). Purification of a HeLa cell receptor protein for group B coxsackieviruses. *Journal of Virology*, 55, 560-566.
92. Hsu K.H., Lonberg-Holm K., Alstein B., Crowell R.L. (1988). A monoclonal antibody specific for the cellular receptor for the group B coxsackieviruses. *Journal of Virology*, 62, 5, 1647-1652.
93. Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S., Horwitz M.S., Crowell R.L., Finberg R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275, 5304, 1320-1323.
94. Tomko R.P., Xu R., Philipson L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 3352-3356.
95. Shafren D.R., Bates R.C., Agrez M.V., Herd R.L., Burns G.F., Barry R.D. (1995). Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *Journal of Virology*, 69, 6, 3873-3877.
96. Shafren D.R., Williams D.T., Barry R.D. (1997). A decay-accelerating factor-binding strain of coxsackievirus B3 requires the coxsackievirus-adenovirus receptor protein to mediate lytic infection of rhabdomyosarcoma cells. *Journal of Virology*, 71, 12, 9844-9848.

97. Agrez M.V., Shafren D.R., Gu X., Cox K., Sheppard D., Barry R.D. (1997). Integrin alpha v beta 6 enhances coxsackievirus B1 lytic infection of human colon cancer cells. *Virology*, 239, 1, 71-77.
98. de Verdugo U.R., Selinka H.C., Huber M., Kramer B., Kellermann J., Hofschneider P.H., Kandolf R. (1995). Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses. *Journal of Virology*, 69, 11, 6751-6757.
99. Γεωργοπούλου Α., Σιαφάκας Ν., Μαρκουλάτος Π., Σπύρου Ν., Βαμβακόπουλος Ν. (1999). Μοριακή διαφοροποίηση πολιοϊών και Coxsackie B ιών: εφαρμογές στην κλινική διάγνωση. *Ελληνική Ιολογία*, 4, 2, 81-93.
100. Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., Vamvakopoulos N. (2000). Improved genotyping vaccine and wild-type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 12, 4337-4342.
101. Pelletier J., Kaplan G., Racaniello V.R., Sonenberg N. (1988). Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Molecular and Cellular Biology*, 8, 3, 1103-1112.
102. Pelletier J., Sonenberg N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334, 320-325.
103. Kozak M. (1989). The scanning model for translation: an update. *Journal of Cell Biology*, 108, 229-241.
104. Iishi T., Shiroki K., Iwai A., Nomoto A. (1999). Identification of a new element for RNA replication within the internal ribosome entry site of poliovirus RNA. *Journal of General Virology*, 80, 917-920.

105. Iizuka N, Kohara M, Hagino-Yamagishi K, Abe S, Komatsu T, Tago K, Arita M, Nomoto A. (1989). Construction of less neurovirulent polioviruses by introducing deletions into the 5' noncoding sequence of the genome. *Journal of Virology*, 63, 12, 5354-5363.
106. Sonenberg N., Pelletier J. (1989). Poliovirus translation: a paradigm for a novel initiation mechanism. *BioEssays*, 11, 128-132.
107. Blyn L.B., Towner J.S., Semler B.L., Ehrenfeld E. (1997). Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *Journal of Virology*, 71, 6243-6246.
108. Gamarnic A.V., Andino R. (1997). Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' non coding region of poliovirus RNA. *RNA*, 3, 882-892.
109. Hellen C.U.T., Witherell G.W., Schmid M., Shin S.H., Pestova T.V., Gill A., Wimmer E. (1993). A cytoplasmic 57 kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, 7642-7646.
110. McBride A.E., Schlegel A., Kirkegaard K. (1996). Human protein Sam68 relocalization and interaction with poliovirus RNA polymerase in infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 2296-2301.
111. Meerovitch K., Svitkin Y.V., Lee H.S., Lejbkowitz F., Kenan D.J., Chan E.K.L., Agol V., Keene J.D., Sonenberg N. (1993). La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *Journal of Virology*, 67, 3798-3807.

112. Parlsey T.B., Towner J.S., Blyn L.B., Ehrenfeld E., Semier B.L. (1997). Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5' terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA*, 3, 1124-1134.
113. Johnson K.A., Sarnow P. (1995) in *Human Enterovirus Infections* (Rotbart H., ed). American Society of Microbiology Press, pp. 95-112.
114. Kitamura N., Semler B.L., Rothberg P.G., Larsen G.R., Adler C.J., Dorner A.J., Emini E.A., Hanecak R., Lee J.J., van der Werf S., Anderson C.W., Wimmer E. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291, 547-553.
115. 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. *Journal of Virology* 65, 8, 4226-4231.
116. Melnick J.L. (1990). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. In *Virology* (Fields B.N., ed.) Raven Press, New York, Second Edition, pp. 549-605.
117. van Wezel A.L., van Steenis G., van der Marel P., Osterhaus A.D. (1984). Inactivated poliovirus vaccine: current production methods and new developments. *Reviews of Infectious Diseases*, 6, 2, S335-S340.
118. Strikas R.A., Anderson L.J., Parker R.A. (1986). Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enteroviruses in the United States, 1970-1983. *Journal of Infectious Diseases*, 153, 346-351.
119. Kok P.W., Leeuwenburg J., Tukei P., van Wezel A.L., Kapsenberg J.G., van Steenis G., Galazka A., Robertson S.E., Robinson D. (1992). Serological and virological

- assessment of oral and inactivated poliovirus vaccines in a rural population in Kenya. *Bulletin of the World Health Organization*, 70, 93-103.
120. Morens D.M. Pallansch M.A. (1995). *Epidemiology*. (Rotbart H.A., ed.) in *Human Enterovirus Infections*. Washington, American Society for Microbiology, pp. 3-23.
 121. Berlin L.E., Rorabaugh M.L., Heldrich F., Roberts K., Doran T., Modlin J.F. (1993). Aseptic meningitis in infants <2 years of age: diagnosis and etiology. *Journal of Infectious Diseases* 168, 888-892.
 122. Moore M. (1982). From the Centers for Disease Control. Enteroviral Disease in the United States. 1970-1979. *Journal of Infectious Diseases*, 146, 103-108.
 123. Grist N. R., Bell E. J., Assaad F. (1978). Enteroviruses in human disease. *Progress in Medical Virology* 24, 114-157.
 124. Huttunen P., Santii J., Pulli T., Hyypia T. (1996). The major echovirus group is genetically coherent and related Coxsackie B viruses. *Journal of General Virology*, 77, 715-725.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή στις εργασίες του ειδικού μέρους

Το σύνολο των πειραματικών δεδομένων και αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης έχουν δημοσιευτεί και είναι υπό δημοσίευση αντίστοιχα, σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά που ευρετηριάζονται στο Science Citation Index:

- Η πρώτη εργασία με τίτλο: “Improved Genotyping Vaccine and Wild-Type Poliovirus Strains by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: Clinical Diagnostic Implications” έχει δημοσιευθεί στο περιοδικό “Journal of Clinical Microbiology”, στο τεύχος του Δεκεμβρίου του 2000, τόμος 38(12), σελίδες 4337-4342.
- Η δεύτερη εργασία με τίτλο: “High Sequence Divergence in the 5’ Non Coding Region of Reference Coxsackie B and ECHO Viral Strains and Clinical Isolates Revealed by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis” τελεί υπό δημοσίευση στο περιοδικό “Molecular and Cellular Probes”, 2001, under press.

Οι προαναφερθείσες εργασίες παρατίθενται ως έχουν στο ειδικό μέρος της παρούσας μελέτης.

**IMPROVED GENOTYPING POLIO VACCINE AND WILD TYPE
ENTEROVIRAL STRAINS BY RESTRICTION FRAGMENT LENGTH
POLYMORPHISM: CLINICAL DIAGNOSTIC IMPLICATIONS.**

**Amalia Georgopoulou^{1, 2}, Panayotis Markoulatos*¹, Niki Spyrou¹ and
Nicholas C. Vamvakopoulos²**

- 1: Department of Virology, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias Ave.,
115 21, Athens, Greece.
- 2: Department of Biology & Genetics, University of Thessaly, Medical School,
22 Papakyriazi str., Larisa 412 22, Greece.

Running title: Improved genotyping polioviruses by RFLP

* Corresponding author: Dr. P. Markoulatos
Department of Virology
Hellenic Pasteur Institute
127 Vas. Sofias Ave
115 21 Athens, Greece.
Tel. 30-1-64 47 959 (X 274)
Fax. 30-1-64 23 498
e-mail: vresearch@hol.gr

ABSTRACT

The combination of preventive vaccination and diagnostic typing of viral isolates from clinical poliomyelitis cases constitutes our main protective shield against polioviruses. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) adaptation in reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR) methodology has advanced diagnostic genotyping of polioviruses, although further improvements are definitely needed. We report here an improved RFLP polio genotyping procedure. A highly conserved segment within the 5' non coding region (5'NCR) of polio enteroviruses, was selected for RT-PCR amplification by the UC53/ UG52 primer pair, hoping that it would be most resistant to the inescapable genetic alteration/drift experienced by the other segments of the viral genome. Complete inter- and intratypic genotyping of polioviruses by the present RFLP method was accomplished with a minimum set of four restriction endonucleases (*HaeIII*, *DdeI*, *NcoI* and *AvaI*). To compensate for potential genetic drift in clinical samples, altering the recognition sites of *HaeIII*, *DdeI*, or *NcoI* in atypical clinical samples the RFLP patterns of *HpaII* and *StyI* have been analyzed, as alternative replacements. The specificity of the method was also successfully assessed by RFLP analysis of 55 reference non-polio enteroviral controls. The concerted implementation of these conditional protocols to diagnostic inter- and intratypic polio genotyping was evaluated with 21 clinical samples with absolute success.

INTRODUCTION

Human enteroviruses (family *Picornaviridae*) consist of more than 60 serotypes that include polioviruses, Coxsackie A and B viruses, echoviruses and the undesignated enteroviruses 68-71 (21, 22, 23, 25, 32). The enteroviral genome consists of a positive single stranded RNA molecule about 7500 nucleotides long, that contains an approximately 750nt-long 5' non coding region (5'NCR), a single open reading frame (ORF) and a short 3' non coding region (3'NCR). A small, basic protein (VPg) is covalently attached to the 5' end of the genome, while the 3' end is modified by polyadenylation. Enteroviral 5'NCRs are highly conserved as they appear to play vital roles in viral translation, virulence and possibly encapsidation (9, 12, 24, 30, 31, 34).

Polioviruses, the most pathogenic of all enteroviruses, include three distinct serotypes designated type 1, type 2 and type 3, that were originally defined by their patterns of reactivity with neutralizing antibodies (3). Polioviruses are the main causative agents of poliomyelitis but have also been associated with seasonal undifferentiated febrile illness particularly during summer outbreaks (15, 22) and enteroviral meningitis (2). Poliomyelitis, a life threatening acute paralytic disease, is being effectively controlled by the inactivated poliovirus vaccine (IPV) (28) and the oral poliovirus vaccine (OPV) (26, 27). OPV contains all three attenuated poliovirus serotypes live from sequential passage in monkey tissues. Vaccination by live OPV viral strains (Sabin 1, 2 and 3) generally mounts a long-lasting immune response protecting the organism from future viral infections by wild type polio strains (26, 27). However, rare reversion of live OPV vaccine strains, may occasionally cause

vaccine-associated paralytic poliomyelitis (5, 6, 7, 9, 13, 18). Detailed typing of all polioviruses isolated from poliomyelitis cases is therefore essential to Public Health Polio Surveillance Programs, aiming to eradicate wild type polioviruses.

The WHO recommended poliovirus serotyping procedure, allows only intertypic but not intratypic differentiation of clinical polioviral isolates (19, 35). Recent advances in molecular virology utilizing highly efficient Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification methods have provided new alternatives to poliovirus detection and typing (17, 33). Thus, PCR genotyping of polioviruses includes serotype-specific PCR primers (11), genotype Sabin-specific PCR primers (36) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis (1, 5), that may potentially allow their inter- and intratypic differentiation. In practice however, the published RFLP method failed to type or even detect a small but nevertheless significant fraction of clinical poliovirus isolates (8, 33). These findings prompted our present attempt to develop an improved RT-PCR/RFLP method for direct genotyping vaccine and wild type poliovirus strains.

We report here our contribution towards this goal. More specifically, a 440 bp long RT-PCR fragment was amplified from the highly conserved 5'NCR of enteroviruses. The product was then enzymatically digested by a selected set of four restriction endonucleases generating inter- and intratypic poliovirus specific patterns (type specific RFLP's) readily discernible from those of the 55 reference non-polio enterovirus strains so far tested, as RFLP controls of polio-specific RFLP's. To account for potential genetic drift of clinical poliovirus isolates within the recognition sequence of the proposed minimum set of four restriction endonucleases commonly employed, namely *HaeIII*, *DdeI*, *NcoI* & *AvaI*, two additional restriction

endonucleases, *HpaII* and *StyI*, were used as alternative replacements. Our method typed correctly all 21 (100%) polio clinical isolates tested so far.

MATERIALS AND METHODS

Virus stocks, clinical samples and cells. Table 1 summarizes the type and source of poliovirus reference strains used in this study. Clinical specimens were obtained from the collection of clinical samples maintained by the Department of Virology of H.P.I (Table 2). They had been stored at -80°C for periods ranging from few months to several years prior to reinoculation and were typed by seroneutralization with rabbit polyclonal antibodies (National Institute for Public Health and the Environment, RIVM, The Netherlands) without revealing their identity prior to genotyping. Reference viral strains and infected clinical samples were propagated in Vero (african green monkey kidney cells), L20 (recombinant murine cell line that contains the human receptor for polioviruses) (11) and Hep-2 cells (cell line derived from a human epidermoid carcinoma of the larynx), that were grown in round-bottomed plastic tubes. The tubes were incubated at 37°C for a period of 1 to 4 days. When complete cytopathic effect was observed, the tubes were frozen at -20°C , thawed and centrifuged at 3500rpm in a Beckman GPR centrifuge, at 4°C for 20min. The supernatants were discarded and the pellets were used in RNA extraction. To account for potential false positive results, negative controls were routinely included in all experimental procedures.

Extraction of viral RNA. Viral RNA was extracted primarily from infected cell pellets, using a commercially available kit (Snap-O-Sol, Biotecx, Houston, Texas, USA). Total cellular RNA was resuspended in 20 μl RNase free sterile distilled water (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) and stored at -80°C , until RT-PCR

amplification analysis. Virally infected cell culture supernatants were used as an alternative source of viral RNA templates.

Oligonucleotide primers. The primers used in this study were selected from the highly conserved 5'NCR of the known enteroviral sequences, using available primer design computer programs (10). The selected downstream primer UC53 sequence was 5'-TTGTCACCATAACCAGCCA-3', while the upstream UG52 was 5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3'. Primer UG52 was identical to previously described primer 1 (37). Primer UC53 differs in one internal position from primer 3, indicated by bold type letter and is one base shorter at the 5' end (37). This primer pair amplified all 58 reference enteroviral strains examined so far except from the unassigned strains 68-71 and Coxsackie A1, A19 and A22 strains which have not yet been tested. The originally described primers have been used in enteroviral detection (37). Their use in poliovirus genotyping is attempted here for the first time. GenBank coordinates of primers UC53 and UG52 on the corresponding reference polioviral genomes were calculated by the Gene Runner version 3.00 program (Hastings Software, Inc., USA). Primers were synthesized by Genosys (Europe, Cambridge, U.K.), adjusted to a concentration of 7nmol/μl in sterile distilled water and stored at -20°C.

Reverse transcription and PCR. cDNA synthesis and PCR reagents were obtained from Amersham Life Sciences (Cleveland, Ohio, USA). Reverse transcription was performed in 20μl reactions containing 1μl (25u) RNase inhibitor, 1μl downstream primer UC53 solution, 5μl extracted RNA solution, 4μl 5X reverse transcriptase buffer, 2μl 100mM mixture of the four dNTPs, 10u AMV reverse transcriptase and 6μl RNase free sterile distilled water (Sigma). The reaction was

incubated at 37°C for 60min and the AMV reverse transcriptase enzyme was heat inactivated by incubating at 95°C for 5min. Enzymatic amplifications were performed in 100µl reactions containing 92µl PCR reaction mixture (10µl 10X PCR buffer with 1.5mM MgCl₂, 8µl 10mM mixture of the four dNTPs, 2u *Taq* DNA Polymerase and 73µl RNase free sterile distilled water), 4µl cDNA and 2µl of each primer, using forty cycles of denaturation (94°C, 30sec), annealing (45°C, 30sec) and primer extension (72°C, 1min) in a Perkin Elmer Gene Amp PCR system 9600 thermal cycler. The PCR amplicons were analyzed by electrophoresis in 2.5% TBE-agarose mini gels containing 1µg/ml ethidium bromide, visualized and recorded in a FOTO/PHORESIS I system (FOTODYNE, Hartland, Wisconsin, USA), as described (14).

RFLP analysis of PCR products. 20µl aliquots of the RT-PCR amplicons were digested singly with 20u of the various restriction enzymes used, including *HaeIII*, *HpaII*, *NcoI*, *SylI*, *BstOI* and *AvaI* (Promega Corporation, Madison, USA) and *DdeI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), in a final volume of 30µl at 37°C for 2h according to manufacturer's recommendations. The results were analyzed in 3% agarose gels (Metaphor FMC Bioproducts, Rockland, USA), containing 1µg/ml ethidium bromide, visualized and recorded as described above. Restriction analysis and multiple alignment projects of GenBank submitted polioviral sequences, were performed by the Gene Runner version 3.00 program (Hastings Software, Inc. USA).

Computer analysis. The RFLP patterns were analyzed and fragment sizes were calculated using the Gel Pro Analyzer program (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). The fragment sizes reported were calculated relative to the known fragment sizes of the *HaeIII* digest of phage ΦX174 DNA (GIBCO BRL, Life

Technologies, Maryland, USA), that was included as a marker in all electrophoretic runs. The size fluctuations between repetitive runs were almost undetectable.

RESULTS

RT-PCR amplification of polio enteroviral 5'NCR target: RT-PCR amplification of all reference polioviral strains (wild type and vaccine) and all 21 clinical samples used in this study (Tables 1 & 2 respectively) by the UC53/UG52 primer pair (see Materials & Methods), generated the expected enteroviral-specific 440 bp long product, shown in the uncut lane 1 in Figure 1 (panels A & B) and Figure 2 (panels A & B). As a testament to the conserved nature of the selected 5'NCR RT-PCR polio amplification target, all 55 reference non-polio enteroviral strains used as RFLP control of polio-specific RFLP patterns shown below, also generated the expected 440 bp long product (data not shown).

Genotyping reference polioviral strains: The 440 bp long RT-PCR products of Sabin polioviruses types 1 to 3 (S1, S2, S3) and Mahoney, MEF, Saukett wild type poliovirus strains, were digested initially with restriction endonucleases *HaeIII*, *DdeI*, *HpaII*, *NcoI* and *StyI*. These enzymes were selected from the published sequences of polioviral genomes including Sabin 1, 2 and 3 vaccine strains and Mahoney wild type strain. The restriction fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis (Figure 1 panels A & B) and their computer-calculated sizes are shown in Table 1. Their different RFLP patterns allowed complete intertypic differentiation between polioviruses type 1, 2 and 3 and intratypic between polioviruses type 2 (Sabin 2 and MEF) and type 3 (Sabin 3 and Saukett). Differentiation of Sabin poliovirus type 1 from Mahoney wild type strain was achieved by the additional use of *AvaI* restriction endonuclease, as shown in both Figure 1 (panels A and B) and Table 1.

Our RFLP analysis indicated that complete inter- and intratypic differentiation of reference polioviruses required a minimum number of four restriction endonucleases. To account for rare genetic drift in certain clinical samples altering certain polio-specific RFLP patterns, we studied the RFLP patterns of seven restriction endonucleases as alternative replacements. Of those only *BstOI* proved unsuitable replacement of *AvaI*, restricting both Sabin type 1 and Mahoney strains (Table 1).

Genotyping clinical samples: To assess the diagnostic value of the method in clinical practice twenty-one clinical enteroviral isolates, that had been typed by seroneutralization without revealing their identity prior to genotyping (Table 2), were subjected to RFLP analysis by analogy to reference strains (Figure 2, panels A & B). Table 2 summarizes their RFLP generated computer calculated sizes. Direct comparison between the RFLP patterns of the clinical samples (Table 2) and those of the reference polioviral strains (Table 1), led to proper genotypic assignment of all clinical samples.

More specifically, clinical samples with patient code numbers 6899, 7062, 1085, 6902, 6097, 7060 that had previously been serotyped as poliovirus type 1, were correctly genotyped as poliovirus type 1 by RFLP. Their subdivision as Sabin 1 or Mahoney was achieved with the addition of *AvaI* endonuclease. Three clinical samples (patient code numbers 1085, 6097 and 6899) were genotyped as Mahoney and the remaining three (patient code numbers 7062, 6902 and 7060) were genotyped as Sabin 1 vaccine strain. Similar results were obtained for the eleven clinical samples (patient code numbers 6901, 6189, 8001, 38423, 6579, 6624, 6646, 5749, 6650, 73917 and 73824), which had been serotyped as poliovirus type 2 and genotyped as

Sabin poliovirus type 2 vaccine strain by the present RFLP method. Correspondingly, the remaining four clinical samples (patient code numbers 8029, 6423, 6976 and 6835) were also properly genotyped as Sabin 3, in agreement to their serotypic assignment as poliovirus type 3.

Proposed minimum diagnostic enzymatic combination – suggested use of alternative enzyme replacements: As already mentioned complete inter- and intratypic differentiation of polioviruses can be achieved with only four of the six informative restriction endonucleases. With the exception of *AvaI*, which is indispensable for intratypic differentiation of polioviruses type 1 and cannot be replaced, the five remaining endonucleases may be interchanged as in Figure 3 to allow proper genotyping in cases of non informative RFLP patterns caused by recombination and/or sporadic point mutation events in clinical samples. Such diagnostic demands have been encountered and are being investigated.

More specifically, we propose a complete genotyping procedure involving initial digestion of the RT-PCR product of unknown clinical samples with the minimum set of four restriction endonucleases *HaeIII*, *DdeI*, *NcoI* and *AvaI*. If any of the first three enzymes produces a non informative pattern it can be replaced as shown in Figure 3. For instance, *HpaII* can replace *HaeIII* or *DdeI* and *StyI* can replace *NcoI*. Alternatively, constant use of *NcoI*, *StyI* & *AvaI* and interchanging *DdeI* or *HpaII*, completes the eight possible minimum diagnostic enzymatic combinations achieved by the present set of six restriction endonucleases used in groups of four at a time.

DISCUSSION

The accurate typing of viral isolates is critical for polio management. RFLP developments in PCR methodology have contributed greatly to these diagnostic demands (1, 5). Their implementation however, revealed certain weaknesses calling for definite improvements (8, 33). Central to our quest for an improved RFLP-based protocol for inter- and intratypic differentiation of polioviruses, was the selection of the most highly conserved segment within the 5'NCR of polio enteroviral genome as target for RT-PCR amplification (9, 12, 24, 30, 31, 34), along with the proper choice of UC53/UG52 primer pair (37). Our working hypothesis being that even large genomic alterations in other segments of the viral genome, would reflect only minor changes in the conserved 5'NCR, or that the selected target would not tolerate extensive genetic drift due to strict functional limitations for viral viability (9, 12, 24, 30, 31, 34).

RT-PCR amplification of the selected target/primer combination produced a 440 bp long fragment from all polio and 55 non polio reference strains and all the clinical polio isolates tested so far. The remaining non polio reference strains, namely Coxsackie A1, A19, A22 and the unassigned enteroviruses 68-71 have not been tested by this RT-PCR amplification protocol yet. Diagnostic RFLP analysis of polio-specific RT-PCR fragments differentiated fully all reference poliovirus strains and all clinical poliovirus isolates analyzed so far. The criterion used for the selection of informative restriction enzymes for polio-specific RFLP analysis, was generation of distinct polio-specific reference RFLP patterns when compared with themselves and with the 55 non polio reference enteroviral controls. Of the seven enzymes tested by

these criteria, only *HaeIII*, *HpaII*, *DdeI*, *StyI* and *NcoI* produced highly informative RFLP patterns with all polio and non-polio enteroviruses examined. *AvaI* was used solely with polioviruses, while *BstOI* was non informative for reasons explained below.

The sequence in the 5'NCR's of Sabin 1 (accession number V01150) (20) was aligned with the sequence kindly provided by Dr François Delpeyroux (4). This alignment revealed a difference at nucleotide position 355 (T in the GenBank sequence, C in the sequence provided by Dr François Delpeyroux). Since the recognition sequence of *BstOI* is CC/(A/T)GG, where the bold type letter corresponds to position 355, and given that a *BstOI* restriction site appeared in our experiments, it was concluded that the correct nucleotide at this position was cytosine and not thymidine. Another difference between the two sequences, was detected at nucleotide position 26 (G in the GenBank sequence of Sabin 1, A in the sequence provided by Dr François Delpeyroux), that was not investigated any further.

With the exception of Sabin poliovirus type 1, all the other viral genotypes/serotypes for which published sequence information was available, including Sabin 2 and Sabin 3 vaccine strains and Mahoney wild type strain, gave the expected RFLP patterns.

A minimum number of four restriction enzymes, *HaeIII*, *DdeI*, *NcoI* & *AvaI*, was sufficient for complete inter- and intratypic differentiation of polioviruses. *HpaII* and *StyI* were also examined however, to compensate for potential genetic drift, altering the recognition sites of *HaeIII*, *DdeI*, or *NcoI* in atypical clinical samples. The only irreplaceable member of the minimal diagnostic set of four restriction endonucleases was *AvaI*. The eight conditional enzymatic combinations summarized

in Figure 3, will thus extend the provisional genotyping powers of the method to a broader spectrum of variant vaccine or wild type polio strains. Such variant strains have been identified and will be the subject of a future publication.

Multiple polioviral infections will require subcloning adaptations of RT-PCR products prior to RFLP analysis for genotypic assignment by the present method. The method will theoretically fail to type or even identify potentially viable polio variants with extensive genomic alterations and/or major recombinations within the 5'NCR RT-PCR amplification target. In practice however, no such case has been found yet in the present polio and the 85 non-polio clinical enteroviral samples tested. Hoping that severely deformed polioviruses to the extent that they will escape detection by this method, in the functionally sensitive 5'NCR will be extremely rare or even non-existent due to viability constraints, we foresee improved applicability of the method in inter- and intratypic polio enteroviral diagnostic genotyping aiming to eradicate wild type polioviruses.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Radu Crainic, Epidemiologie Moleculaire des Enterovirus, Institut Pasteur Paris for helpful discussions and encouragement during the course of this study. We would also like to thank the staff of the Hellenic Pasteur Institute for collection and storage of clinical samples and the National Institute of Public Health and the Environment in Netherlands for kind donation of reference viral strains, used in this study. One of us (G.A.) wishes to thank professors J. Messinis and S. Haidas, members of her thesis committee for guidance. The work was supported in part by research grants from the European Union-Copernicus CIPA-CT94-0123 and the Greek Ministry of Health to P.M. and N.S., and the research proceeds of the Biology & Genetics Laboratory, University of Thessaly Medical School (code no 2094) to prof. N.C.V.

REFERENCES

1. **Balanant, J., S. Guillot, A. Candrea, F. Delpeyroux, and R. Crainic.** 1991. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphic assay. *Virology* **184**: 645-654.
2. **Berlin, L. E., M. L. Rorabaugh, F. Heldrich, K. Roberts, T. Doran, and J. F. Modlin.** 1993. Aseptic meningitis in infants <2 years of age: diagnosis and etiology. *J. Inf. Dis.* **168**:888-892.
3. **Bodian, D., I. M. Morgan, and H. A. Howe.** 1949. Differentiation of types of poliomyelitis viruses. *Am. J. Hyg.* **49**:234-245.
4. **Delpeyroux, F.** Personal communication.
5. **Furione, M., S. Guillot, D. Otelea, J. Balanant, A. Candrea, and R. Crainic.** 1993. Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology* **196**:199-208.
6. **Georgescu, M. M., F. Delpeyroux, M. Tardy-Panit, J. Balanant, M. Combiescu, A. A. Combiescu, S. Guillot, and R. Crainic.** 1994. High diversity of poliovirus strains isolated from the central nervous system from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* **68**:8089-8101.
7. **Georgescu, M. M., J. Balanant, A. Macadam, D. Otelea, M. Combiescu, A. Combiescu, R. Crainic, and F. Delpeyroux.** 1997. Evolution of the Sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* **71**:7758-7768.

8. **Georgopoulou, A., P. Markoulatos, N. Spyrou, and N.C. Vamvakopoulos.**
Unpublished data.
9. **Guillot, S., D. Otelea, F. Delpeyroux, and R. Crainic.** 1994. Point mutations involved in the attenuation/neurovirulence alternation in type 1 and 2 oral polio vaccine strains detected by site-specific polymerase chain reaction. *Vaccine* **12(6):503-507.**
10. **Hofmann, K., and M. Baron.** Boxshade 3.21. Pretty Printing and Shading of Multiple-Alignment files. Kay Hofmann ISREC Bioinformatics group. Chemin des Boveresses 155. CH-1066 Epalignes s/Lausanne. Switzerland. E-mail: khofmann@isrec-sun1.unil.ch.
11. **Kilpatrick, D. R., B. Nottay, C. F. Yang, S. J. Yang, E. da Silva, and S. Penaranda.** 1998. Serotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residue at positions of codon degeneracy. *J. Clin. Microbiol.* **36(2): 352-357.**
12. **Kitamura, N., B. L. Semler, P. G. Rothberg, G. R. Larsen, C. J. Adler, A. J. Dormer, E. A. Emini, R. Hanecak, J. J. Lee, S. van der Werf, C. W. Anderson, and E. Wimmer.** 1981. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* **291:547-553.**
13. **Li, J., L. B. Zhang, T. Yoneyama, H. Yoshida, H. Shimizu, K. Yoshii, M. Hara, T. Nomura, H. Yoshikura, T. Miyamura, and A. Hagiwara.** 1996. Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients. *Arch. Virol.* **141:1047-1054.**
14. **Markoulatos, P., E. Avgerinos, D.V. Tsantzas, and N. C. Vamvakopoulos.** 1998. Mapping Interleukin Enhancer binding factor 3 gene

- (ILF3) to human chromosome 19 (19q11-qter and 19p11-p13.1) by polymerase chain reaction amplification of human-rodent somatic cell hybrid DNA templates. *J. Interferon and Cytokine Res.* **18**: 351-355.
15. **Melnick, J. L.** 1990. Enteroviruses, p. 549-605. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe et al (ed.), *Virology – 1990*. New York: Raven Press.
16. **Mendelsohn, C.L., E. Wimmer, and V.R. Racaniello.** 1989. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequencing, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell.* **56(5)**:855-865.
17. **Muir, P., U. Kämmerer, K. Korn, M. Mulders, T. Pöyry, B. Weissbrich, R. Kandolf, G. Cleator, and A. van Loon.** 1998. Molecular typing of Enteroviruses: current status and future requirements. *Clin. Microbiol. Rev.* **11(1)**:202-227.
18. **Mulders, M. N., J. H. J. Reimerink, M. Stenvik, I. Alaeddinoglou, H. G. A. M. van der Avoort, T. Hovi, and M. P. G. Koopmans.** 1999. A Sabin vaccine-derived field isolate of poliovirus type 1 displaying aberrant phenotypic and genetic features, including a deletion in antigenic site 1. *J. Gen. Virol.* **80**:907-916.
19. **National Institute of Public Health and the Environment.** 1998. Rabbit serum for typing of polioviruses (batch 1998). RIVM, Bilthoven, The Netherlands.
20. **Nomoto, A., T. Omata, H. Toyoda, S. Kuge, H. Horie, Y. Kataoka, Y. Genba, Y. Nakano, and N. Imura.** 1982. Complete nucleotide sequence of

the attenuated poliovirus Sabin 1 strain genome. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:5793-5797.

21. **Oberste, M. S., K. Maher, D. R. Kilpatrick, and M. A. Pallansch.** 1999. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* **73(3)**:1941-1948.
22. **Oberste, M. S., K. Maher, D. R. Kilpatrick, M. R. Flemister, B. A. Brown, and M. A. Pallansch.** 1999. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* **37(5)**:1288-1293.
23. **Pöyry, T., L. Kinnunen, T. Hyypia, B. Brown, C. Horsnell, T. Hovi, and G. Stanway.** 1996. Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *J. Gen. Virol.* **77**:1699-1717.
24. **Richardson, O. C., and E. Ehrenfeld.** 1990. Poliovirus RNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **161**:89-119.
25. **Rueckert, R. R.** 1990. Picornaviridae and their replication, p. 507-548. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe et al (ed.), *Virology – 1990*. New York: Raven Press.
26. **Sabin, A. B., and L. R. Boulger.** 1973. History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *J. Biol. Stand.* **1**:115-118.
27. **Sabin, A. B.** 1985. Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *J. Infect. Dis.* **151**:420-436.
28. **Salk, J., and D. Salk.** 1987. Control of influenza and poliomyelitis with killed virus vaccines. *Science* **195**:834-847.
29. **Santti, J., T. Hyypia, L. Kinnunen, and M. Salminen.** 1999. Evidence of recombination among enteroviruses. *J. Virol.* **73(10)**:8741-8749.

30. **Skinner, M. A., V. R. Racaniello, G. Dunn, J. Cooper, P. D. Minor, and J. W. Almond.** 1989. New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J. Mol. Biol.* **207**:379-392.
31. **Sonnenberg, N.** 1990. Poliovirus translation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **161**:23-47.
32. **Stanway, G.** 1990. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* **71**:2483-2501.
33. **Van der Avoort, H. G. A. M., B. P. Hull, T. Hovi, M. A. Pallansch, O. M. Kew, R. Crainic, D. J. Wood, M. N. Mulders and A. M. van Loon.** 1995. Comparative study of five methods for intratypic differentiation of polioviruses. *J. Clin. Microbiol.* **33(10)**:2562-2566.
34. **Wimmer, E., C. U. T. Hellen, and X. M. Cao.** 1993. Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* **27**:353-436.
35. **World Health Organization.** 1997. Manual for the virological investigation of poliomyelitis. WHO, Geneva, Switzerland.
36. **Yang, C. F., L. De, B. P. Holloway, M. A. Pallansch, and O. M. Kew.** 1991. Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction. *Virus Res.* **20(2)**:159-179.
37. **Zoll, G. J., W. J. G. Melchers, H. Kopecka, G. Jambroes, H. J. A. van der Poel, and J. M. D. Galama.** 1992. General primer-mediated polymerase chain reaction for the detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *J. Clin. Microbiol.* **30**:160-165.

FIGURE LEGENDS

Figure 1:

RT-PCR/RFLP analysis of two representative reference poliovirus strains of Table 1, with restriction endonucleases *HaeIII*, *DdeI*, *HpaII*, *NcoI*, *StyI* and *AvaI*.

Panel A: Sabin 1; Panel B: Mahoney;

Lane M contains the *HaeIII* digest of Φ X174 DNA used to calculate the apparent size in bp of the various fragments indicated in Table 1 and lane 1 contains the uncut RT-PCR product. Lanes 2-7 contain the restriction fragments produced by digestion with *HaeIII*, *DdeI*, *HpaII*, *NcoI*, *StyI* and *AvaI* respectively.

Figure 2:

RT-PCR/RFLP analysis of two representative clinical poliovirus samples of Table 2, with restriction endonucleases *HaeIII*, *DdeI*, *HpaII*, *NcoI*, *StyI* and *AvaI*.

Panel A: clinical sample with patient code number 6902, genotyped as Sabin 1

Panel B: clinical sample with patient code number 1085, genotyped as Mahoney

In all panels, lane M contains the *HaeIII* digest of Φ X174 DNA used to calculate the apparent size in bp of the various fragments indicated in Table 2 and lane 1 contains the uncut RT-PCR product. Lanes 2-6 contain the restriction fragments produced by digestion with *HaeIII*, *DdeI*, *HpaII*, *NcoI* and *StyI*, respectively. In panels A and B, lane 7 contains the restriction fragments produced by digestion with *AvaI*.

Figure 1

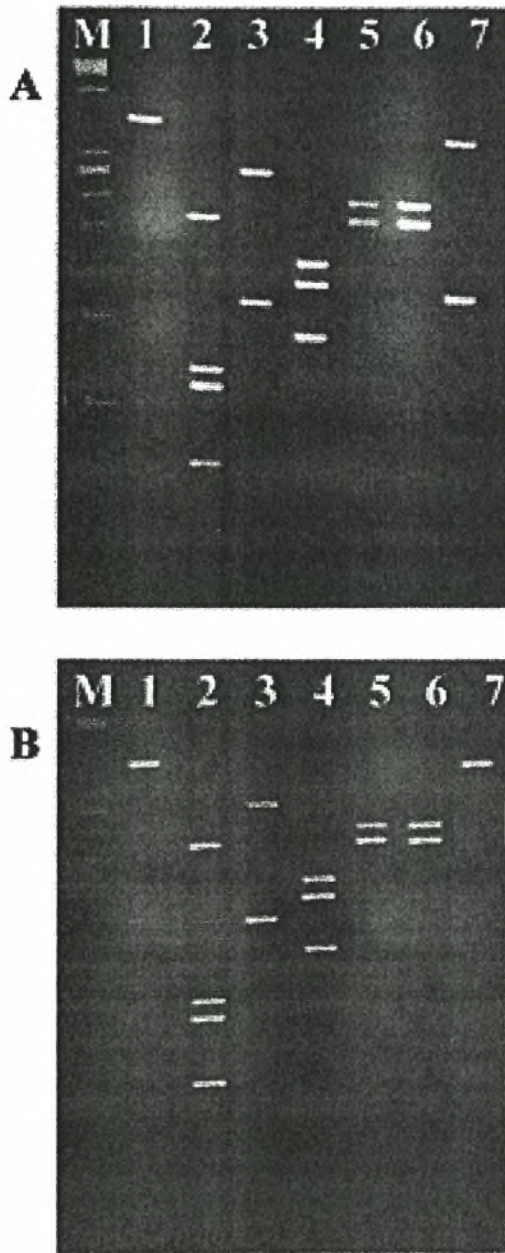


Figure 2

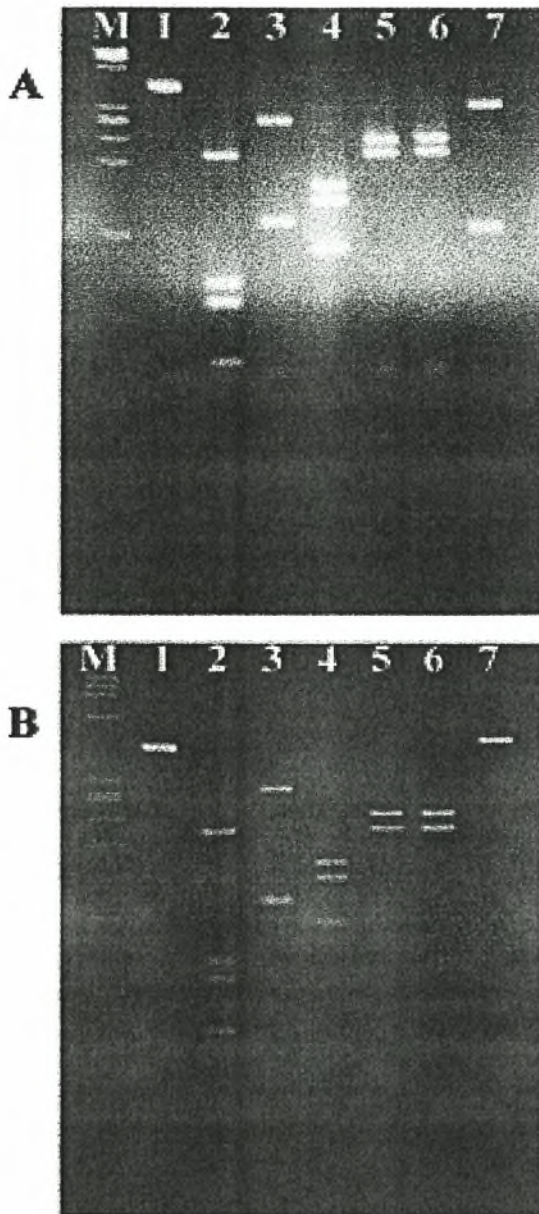


Figure 3: Diagnostic enzymatic combinations. The proposed enzyme replacements are shown in boldface and italics.

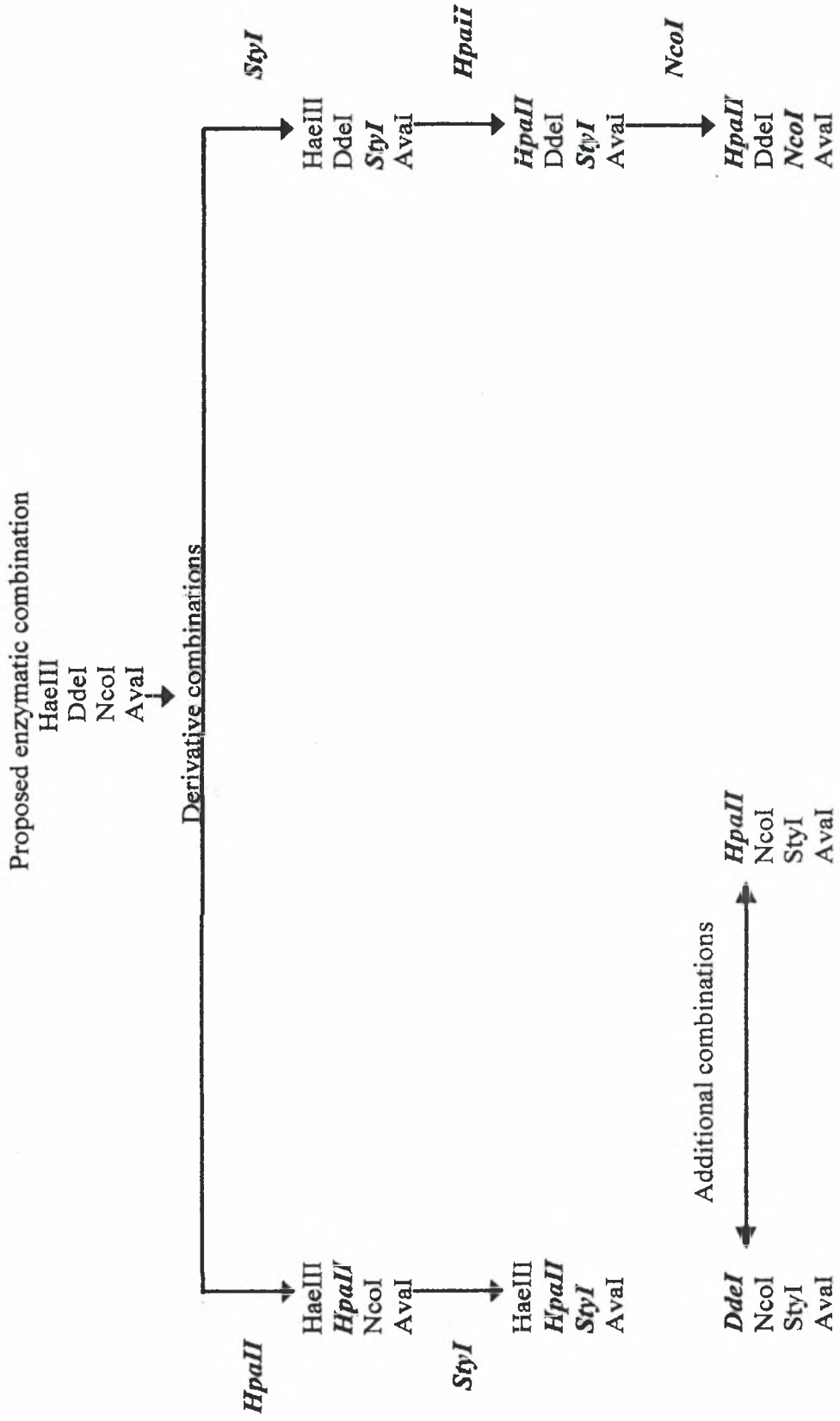


TABLE 1. RFLP analysis of reference poliovirus strains

Serotypes	Strain	Origin ^a	Fragment size (bp) by RFLP analysis of RT-PCR-generated products ^b						
			<i>Hae</i> III	<i>Dde</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Nco</i> I	<i>Sst</i> I	<i>Ava</i> I	<i>Bst</i> OI
Poliovirus type 1									
Sabin type 1	LS-c, 2ab	RIVM	209, 90, 80, 55	284, 129	162, 150, 109	232, 210	233, 207	315, 121	249, 209 ^c
Mahoney	Mahoney	IPP	208, 87, 79, 53	275, 128	164, 149, 108	229, 205	230, 209	No cut	251, 210
Poliovirus type 2									
Sabin type 2	P712, Ch, 2ab	RIVM	210, 149, 80	286, 128	150, 121, 108	No cut	332, 101	ND ^d	ND
MEF type	MEF	HPI	213, 146, 78	163, 156, 139	169, 153, 110	No cut	336, 103	ND	ND
Poliovirus type 3									
Sabin type 3	Leon, 12a, b	RIVM	146, 130, 70, 53	308, 123	148 (+148), ^e 121	315, 120	314, 119	ND	ND
Saukett	Saukett	HPI	205, 88, 80, 54	279, 125	161, 146, 107	No cut	No cut	ND	ND

^a RIVM, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands; IPP, Institut Pasteur de Paris, Epidemiologie Molculaire des Enterovirus, Paris, France; HPI, Hellenic Pasteur Institute, Laboratory of Virology, Athens, Greece.

^b Experimentally derived, computer-calculated fragment sizes.

^c Unexpected restriction of Sabin type 1 with *Bst*OI.

^d ND, not digested.

^e Two bands of identical size.

TABLE 2. RFLP analysis of clinical samples

Patient code no.	Poliovirus type by seroneutralization	Fragment size (bp) by RFLP analysis of RT-PCR-generated products ^a						Genotyping result
		<i>Hae</i> III	<i>Dde</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Nco</i> I	<i>Syl</i> I	<i>Ava</i> I	
1085	1	209, 89, 80, 55	283, 125	162, 150, 109	229, 209	230, 204	No cut	Mahoney
6899	1	208, 91, 81, 55	281, 128	162, 149, 110	231, 208	232, 209	No cut	Mahoney
7062	1	208, 90, 79, 55	285, 128	164, 151, 111	232, 210	232, 210	No cut	Mahoney
6902	1	210, 88, 78, 52	281, 129	161, 149, 108	228, 208	230, 208	314, 122	Sabin type 1
7060	1	209, 90, 80, 53	286, 128	160, 150, 109	232, 210	230, 208	315, 123	Sabin type 1
6097	1	209, 90, 79, 54	285, 128	164, 149, 108	230, 209	229, 209	313, 121	Sabin type 1
8001	2	210, 146, 78	284, 128	149, 121, 108	No cut	333, 103	ND ^b	Sabin type 2
38423	2	209, 146, 77	283, 125	151, 122, 109	No cut	335, 101	ND	Sabin type 2
6579	2	210, 144, 78	282, 128	149, 119, 110	No cut	331, 103	ND	Sabin type 2
6624	2	211, 147, 76	286, 126	151, 120, 111	No cut	332, 105	ND	Sabin type 2
6189	2	208, 146, 79	283, 127	149, 119, 109	No cut	335, 104	ND	Sabin type 2
6646	2	210, 145, 75	286, 129	151, 121, 110	No cut	336, 103	ND	Sabin type 2
5749	2	209, 147, 78	286, 128	151, 123, 108	No cut	333, 103	ND	Sabin type 2
6650	2	211, 146, 79	285, 127	149, 118, 108	No cut	332, 101	ND	Sabin type 2
6901	2	208, 145, 76	283, 129	152, 120, 110	No cut	332, 100	ND	Sabin type 2
73917	2	209, 144, 76	284, 126	150, 121, 108	No cut	334, 103	ND	Sabin type 2
73824	2	209, 145, 75	285, 124	148, 120, 108	No cut	335, 105	ND	Sabin type 2
8029	3	146, 129, 70, 55	308, 123	149 (+149), ^c 120	314, 121	314, 120	ND	Sabin type 3
6423	3	144, 130, 69, 53	310, 122	150 (+150), ^c 120	316, 123	316, 123	ND	Sabin type 3
6976	3	145, 131, 70, 54	308, 122	149 (+149), ^c 121	316, 122	315, 121	ND	Sabin type 3
6835	3	146, 131, 70, 55	309, 123	148 (+148), ^c 123	315, 120	314, 119	ND	Sabin type 3

^a Experimentally derived, computer-calculated fragment sizes.

^b ND, not digested.

^c Two bands of identical size.

**HIGH SEQUENCE DIVERGENCE IN THE 5' NON CODING REGION OF
REFERENCE COXSACKIE B AND ECHO VIRAL STRAINS AND
CLINICAL ISOLATES REVEALED BY RESTRICTION FRAGMENT
LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS.**

**Amalia Georgopoulou^{1, 4}, Panayotis Markoulatos*¹, Niki Spyrou¹, Nicholas
Vakalis², Thalia A. Bei³ and Nicholas C. Vamvakopoulos⁴**

- 1: Department of Virology, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias Ave.,
Athens 11521, Greece.
- 2: Department of Parasitology, Entomology and Tropical Diseases, National
School of Public Health, 196 Alexandras Ave., Athens 11521, Greece.
- 3 & 4: Department of Biochemistry and Department of Biology & Genetics,
University of Thessalia Medical School, 22 Papakyriazi St., Larisa 412 22,
Greece.

Running title: RFLP analysis of Coxsackie B and ECHO viruses

* Corresponding author: Dr. P. Markoulatos
Department of Virology
Hellenic Pasteur Institute
127 Vas. Sofias Ave
115 21 Athens, Greece.
Tel. 30-1-64 78 800
Fax. 30-1-64 23 498
e-mail: markoulatos@mail.pasteur.gr

ABSTRACT

We report the restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of a 440 bp long 5' non coding region (5'NCR) amplification target, of all thirty-four reference Coxsackie B and ECHO enterovirus strains and a total of forty-two serotypically preassigned clinical isolates, in order to afford meaningful comparisons among themselves and those of polioviruses. The RFLP patterns of reference Coxsackie B strains differed from one another and from those of polio and ECHO reference enteroviruses except from Coxsackie B1 and B2, which although differed among themselves, they had identical RFLP patterns with ECHO 17 and 13, respectively. The twenty-eight ECHO reference strains formed a more variable viral group including strains with RFLP patterns distinct from one another and from those of polio and Coxsackie B enteroviruses, and others with RFLP pattern identities common to other ECHO viruses and Coxsackie B1 and B2 but not polioviruses. The RFLP patterns of the clinical isolates and their corresponding serotypically assigned reference Coxsackie B and ECHO strains presented the most notable variations. The observed differences between serotype and genotype-dependent assignments within the 440 bp long 5'NCR target sequence of Coxsackie B and ECHO enteroviruses, were in sharp contrast to the analogous situation with polioviruses. These findings support the specificity of the described method for clinical diagnostic genotyping of polioviruses and demonstrate that the 440 bp long target sequence follows different evolutionary process in polio and non-polio enteroviruses that is particularly prominent between reference non-polio strains and their serotypically assigned clinical isolates.

Keywords: ECHO viruses, Coxsackie B viruses, RT-PCR/RFLP analysis

INTRODUCTION

Human enteroviruses (family *Picornaviridae*) contain more than 60 serotypes including polioviruses, Coxsackie A and B viruses, ECHO viruses and the undesignated enteroviruses 68-71 (1, 2, 3, 4, 5). The enterovirus genome consists of a positive single stranded RNA molecule about 7500 nucleotides long, that contains an approximately 750 nt long 5' non coding region (5'NCR), a single open reading frame and a short 3' non coding region (3'NCR). A small, basic protein (VPg) is covalently attached to the 5' end of the genome, while the 3' end is modified by polyadenylation. Enterovirus 5'NCRs appear to play vital roles in viral translation, virulence and possibly encapsidation (6, 7, 8, 9, 10, 11), also supported by the fact that the generic enterovirus primer pair UC₅₃/UG₅₂ amplifies a 440 bp long 5'NCR fragment from all enterovirus reference strains and all the clinical isolates so far studied. Considering these important functional and structural properties and the intertypic alignments of reference enterovirus strains in the 5'NCR, many investigators proposed that this region of the enterovirus genome may contain highly conserved elements vital to viral biology (9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18).

Enteroviruses are important human pathogens. They can either cause illness of varying severity or remain asymptomatic. They are distributed worldwide and in temperate climates their circulation increases during the summer and early fall. Some enterovirus serotypes have been associated with specific clinical patterns. Poliovirus types 1-3 are associated with paralytic poliomyelitis and undifferentiated febrile illness particularly during the summer. Coxsackie B viruses are associated with pleurodynia (types 1-5), aseptic meningitis (types 1-6) and rarely with paralysis (types

2-5). They also cause severe systemic infection in infants such as meningoencephalitis (types 1-5), pericarditis and myocarditis (types 1-5), upper respiratory illness and pneumonia (types 4,5), rash (type 5), hepatitis (type 5), undifferentiated febrile illness (types 1-6) and postviral fatigue syndrome (19). Certain Coxsackie B and poliovirus serotypes (20) are implicated in most cases of enteroviral meningitis, whereas most cases of viral myocarditis are associated with Coxsackie B viruses. The most notable clinical manifestations of certain Coxsackie A serotypes are herpangina, meningitis and encephalitis (21). ECHO (Enteric Cytopathic Human Orphan) viruses are common causes of gastro-intestinal infections. Originally, they were not linked to any other important human disease (hence "orphan"), although subsequent findings documented their implication in certain human pathologies including aseptic meningitis, encephalitis, neonatal sepsis-like disease and other (22).

Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification combined with restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, provided new alternatives to enterovirus detection and typing that may provisionally overperform the specificity of conventional diagnostic serotyping procedures. A recently developed RT-PCR/RFLP genotyping clinical diagnostic method allowed complete inter- and intratypic differentiation of polioviruses (23). Given the provisional differentiation of additional reference enterovirus strains, for which sequence information is available, by this method, we undertook to investigate its potential applicability to the inter- and intratypic diagnostic genotyping of Coxsackie B and ECHO viruses.

We report here the RFLP patterns of the six Coxsackie B and the twenty-eight ECHO reference strains along with sixteen and twenty-six clinical isolates serotypically assigned as Coxsackie B and ECHO, respectively. These and previous data from polioviruses allowed intertypic-intergroup (i.e. comparison of RFLP patterns of all poliovirus, Coxsackie B and ECHO reference strains among themselves), intertypic-intragroup (i.e. comparison of RFLP patterns of all reference Coxsackie B among themselves, as well as of all reference ECHO, respectively), as well as intratypic (i.e. comparison of RFLP patterns of all serotypically assigned clinical isolates to their respective reference strains) comparisons, demonstrating that the 440 bp long 5'NCR enterovirus segments follow different evolutionary patterns in polio and non-polio enteroviruses.

MATERIALS AND METHODS

Virus stocks, their propagation in cell lines and viral RNA extraction. Table 1 summarizes the type and origin of Coxsackie B reference strains and their serotypically assigned clinical isolates along with their detailed RFLP patterns and Table 2 presents analogous classification of ECHO viruses. The origins of the reference strains used in this study were as follows: American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA), Institut Pasteur de Paris (IPP, Epidemiologie Moleculaire des Enterovirus, Institut Pasteur Paris), National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, The Netherlands) and Division of Virology, "Bela Johan" National Center of Epidemiology (BJ), Budapest, Hungary. Appropriate clinical specimens were obtained from the collection of the National Reference Center for Enteroviruses, Cantacuzino Institute (NRCE), Bucharest, Romania and of the Department of Virology of Hellenic Pasteur Institute (HPI), Athens, Greece. Only older clinical samples preserved at -80 °C for several years, which were originally typed by seroneutralization with the no longer available Lim Benyesh-Melnick antibody pools (A-H, WHO, Collaborating center for virus reference and research - Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) (19), were used in this study. All the clinical samples used in this study were subjected to confirmatory retyping with the rabbit polyclonal antibodies distributed by the National Institute for Public Health and the Environment, RIVM, The Netherlands, prior to genotyping. These antisera allow only intertypic but not intratypic differentiation of Coxsackie B reference viruses. Of the ECHO viruses, only ECHO 1 - ECHO 7, ECHO 9, ECHO 11 - ECHO 14, ECHO 20, ECHO 21, ECHO 25, ECHO

27, ECHO 29, ECHO 30 and ECHO 33 reference strains can be typed by these antisera. Viral propagation was performed by reinoculation of viral stocks in RD (human embryonal rhabdomyosarcoma cells) grown in round-bottomed plastic tubes that were further processed for viral RNA extraction, as previously described (23). To account for potential false positive results, negative controls were routinely included in all experimental procedures.

Oligonucleotide primers. The modified generic enterovirus primers UC53: 5'-TTGTCACCATAACCAGCCA-3' and UG52: 5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3', (23) were used for all the RT-PCR amplifications performed in this study. Primers were synthesized by Genosys (Europe, Cambridge, U.K.), adjusted to a concentration of 7 nmol/ μ l in sterile distilled water and stored at -20 °C.

Reverse transcription, PCR and RFLP analysis of PCR products. cDNA synthesis, PCR amplification, restriction enzymatic digestions using *HaeIII*, *HpaII*, *NcoI* and *StyI* (Promega Corporation, Madison, USA) and *DdeI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) and agarose gel electrophoretic analysis of the products were performed as previously described (23). The experimentally derived RFLP patterns of all reference viral strains with published sequence information in the 5'NCR, were in agreement to the theoretically predicted patterns from their sequences.

Computer analysis. The RFLP patterns were analyzed and fragment sizes were calculated using the Gel Pro Analyzer program (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). The fragment sizes reported were calculated relative to the known fragment sizes of the *HaeIII* digest of phage Φ X174 DNA (GIBCO BRL, Life Technologies, Maryland, USA), that was included as a marker in all electrophoretic runs. The size fluctuations between repetitive runs were almost undetectable.

RESULTS

RT-PCR amplification of Coxsackie B and ECHO enterovirus 5'NCR

targets: RT-PCR amplification of all Coxsackie B and ECHO reference viral strains and their respective serotypically assigned clinical isolates by the UC53/UG52 primer pair (see Materials & Methods and Tables 1 & 2), generated the expected enterovirus-specific 440 bp long product. A representative collection of such data is shown in the uncut (no enzyme added) lane 1 of Figure 1 (panels A, B and C).

RFLP analysis of Coxsackie B viral group: By analogy to the genotypic analysis of polioviruses (23), the 440 bp long RT-PCR products of the six Coxsackie B (B1 - B6) reference and the sixteen serotypically preassigned clinical viral strains, were digested singly by *HaeIII*, *DdeI*, *HpaII*, *NcoI* and *StyI*. The products were analyzed by agarose gel electrophoresis and the complete list of computer-calculated fragment sizes per RFLP pattern for the entire Coxsackie B viral group, is shown in Table 1. Apparently, the six reference Coxsackie B viral strains generated distinct and characteristic RFLP patterns (in italics) allowing their complete intertypic-intragroup differentiation. Further intratypic comparison of every reference RFLP pattern to the clinical isolates of the same serotype indicated by the patient codes in the rows immediately following each reference strain in Table 1, also revealed an almost complete intratypic differentiation indicated by bold type letters. Of the 16 clinical isolates only clinical isolate 3 (designated cl.is. 3) gave an identical RFLP pattern to its Coxsackie B2 reference strain (Figure 1, panels A1 & A2). These findings suggest that a potentially similar to the intertypically seen divergence, also persists intratypically in the 440 bp long 5'NCR target sequence of this viral group and that

the intratypic evolutionary features of Coxsackie B viral group differ drastically from those of the poliovirus group.

RFLP analysis of ECHO viral group: The 440 bp long RT-PCR products of the twenty-eight ECHO {ECHO 1 along with ECHO 8 [recently reclassified as ECHO 1 variant, (24)], ECHO 2 - ECHO 7, ECHO 9, ECHO 11 - ECHO 21, ECHO 24 - ECHO 27, ECHO 29 - ECHO 33} reference strains and the twenty-six serotypically preassigned clinical isolates, were also digested singly by *HaeIII*, *DdeI*, *HpaII*, *NcoI* and *StyI*, as previously described, for comparative purposes. The restriction fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis and the complete list of computer-calculated fragment sizes per RFLP pattern for the entire ECHO viral group, is shown in Table 2. By analogy to Coxsackie B reference strains, only fifteen ECHO reference strains (ECHO 1 along with ECHO 8, ECHO 3, ECHO 4, ECHO 6, ECHO 11, ECHO 12, ECHO 13, ECHO 15, ECHO 17, ECHO 21, ECHO 26, ECHO 29, ECHO 30 & ECHO 32) generated distinct and characteristic RFLP patterns, allowing their complete intertypic-intragroup differentiation. The RFLP patterns of the fourteen remaining ECHO reference strains while differing distinctly from those of the previously mentioned fifteen ECHO reference strains, presented certain intertypic-intragroup identities, which allowed their classification into six groups, as indicated in Table 3A. Further pattern comparison between each reference strain and the respective clinical isolates of the same serotype, revealed lack of identity between their RFLP patterns. Of the twenty-six clinical isolates only clinical isolate 18 (designated cl.is.18), which was serotypically assigned as ECHO 2, gave an identical RFLP pattern to its ECHO 2 reference strain, which also had an identical pattern with ECHO 5 reference strain (Figure 1, panels B1, B2 & C1). In contrast however, the

RFLP patterns of the two clinical isolates of Table 2 (designated cli.is. 23 and cl.is. 24), which were serotypically assigned as ECHO 5 differed distinctly between themselves and their respective reference strains (Figure 1, panel C2).

These findings indicate that in contrast to the comparative intra- and intertypically divergent RFLP patterns of the Coxsackie B viral group, the analogous RFLP patterns of the ECHO viral group present greater intra- relative to intertypic divergence, in this 440 bp long 5'NCR target sequence.

Comparison of Coxsackie B and ECHO reference RFLP patterns: Further comparison of the RFLP patterns of each Coxsackie B reference strain to the entire group of ECHO reference strains, revealed intertypic-intergroup differences as expected, as well as the specific intertypic-intergroup identities indicated in Table 3B.

DISCUSSION

The advantages of enterovirus detection and differentiation by RT-PCR/RFLP analysis have been demonstrated by many investigators in numerous systems (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31). We have recently described an RFLP-based protocol to type the 440 bp 5'NCR RT-PCR product generated by the generic enterovirus primer pair UC₅₃/UG₅₂ for the rapid and specific genotyping of vaccine and wild-type poliovirus strains (23). To reinforce the specificity of the method for poliovirus detection and typing and potentially extend its clinical diagnostic capacities to other strains of this viral group, we have analyzed additional members of the enterovirus genus and compared their type-specific RFLP patterns. We report here the RFLP patterns of the six reference Coxsackie B strains along with a total of sixteen serotypically assigned clinical isolates and the twenty-eight reference ECHO strains along with a total of twenty-six serotypically assigned clinical isolates, respectively. The data reported so far, support the specificity of the described poliovirus genotyping method and reveal originally unexpected intratypic RFLP differences between reference non-polio enteroviruses and their respective clinical isolates in the 440 bp long 5'NCR target sequence.

Comparison of Coxsackie B reference RFLP patterns indicated complete intertypic-intragroup differentiation (Table 1). The analogous ECHO reference RFLP pattern comparison however, revealed certain strains with intertypic-intragroup identity (Table 3A), while the remaining showed intertypic-intragroup differentiation. Further pairwise comparison of the RFLP patterns between Coxsackie B and ECHO reference strains revealed intertypic-intergroup differentiation, although certain

intertypic-intergroup identities were also observed (Table 3B). These comparisons confirmed the theoretically expected intertypic (inter- and intragroup) RFLP pattern variabilities for the eighteen strains with GenBank submitted sequences and extended our knowledge to RFLP information for seventeen additional ECHO strains, for which published sequence information is unavailable. The level of intertypic-intragroup differentiation revealed by this type of analysis was initially considered encouraging and prompted the analysis of the RFLP patterns of clinical isolates, which revealed however, the unexpectedly high intratypic differentiation reported in Tables 1 & 2.

The RFLP patterns of all reference strains and clinical samples analyzed in this study differed drastically, as indicated by the plain and bold type patterns denoting identity and differentiation respectively, compared to their respective reference RFLPs in italics, in Tables 1 & 2. This finding was in sharp contrast to our previous experience with the analogous RFLP patterns of clinical poliovirus isolates. This sharp difference between polio and non-polio enteroviruses may potentially be explained by the timely and widespread vaccination of human populations for polioviruses in contrast to the respective lack of analogous vaccination for all other enteroviruses. According to this hypothesis, the observed genotypic identities of polioviruses may be maintained by the constant and persistent infusion of vaccine poliovirus sequences in human populations through mandatory vaccination programs. Thus, the lack of analogous systematic infusion of non-polio enterovirus reference sequences in human populations may be responsible for the drastic differences observed in the RFLP patterns of their more contemporary clinical isolates relative to the much older original reference strains (the vast majority of Coxsackie B and ECHO

reference strains have been isolated and characterized during the late 40's and the 50's). Furthermore, poliovaccination may also generate greater variability in the sequences encoding the immunogenic capsid proteins of polioviruses, protecting the virus from host immune response, relative to the 5'NCR, which sustains no analogous evolutionary pressure (32). Analogous evolutionary considerations may apply to additional enterovirus genomic segments, like the 5'NCRs. These segments contain signals for the initiation of viral protein synthesis (30). In addition, enterovirus translation appears to be influenced by cellular proteins interacting with specific areas in viral 5'NCRs (33, 34). Thus, potentially different tropisms of polio and non-polio enteroviruses for different cellular environments, may also contribute to the observed differences in their RFLP patterns.

From the overall analysis of all available RFLP patterns including polio and the presently reported non-polio enterovirus strains, it appears that the former are relatively more conserved in their 440 bp long 5'NCR compared to the latter. The practical consequence of this difference is that although the latter cannot be typed accurately by the present RFLP method, their RFLP patterns are distinct and differ widely from those of poliovirus strains. Therefore polioviruses are sufficiently different intertypically to be differentiated accurately by the present RT-PCR/RFLP method and highly conserved intratypically, as demonstrated by the RFLP identities between poliovirus reference strains and their respective clinical isolates, to allow specific genotypic assignment of unassigned clinical samples (23). Our findings suggest that the present genotypic method can be used to accurately type polioviruses in the absence of any potential cross-reactivities by Coxsackie B and ECHO enteroviruses. Furthermore, they document the presence of a high degree of

evolutionary divergence in the 440 bp long 5'NCR target sequence between polio and non-polio enteroviruses that appears to be particularly prominent between reference non-polio strains and their serotypically assigned clinical isolates.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Radu Crainic, Epidemiologie Moléculaire des Enterovirus, Institut Pasteur Paris for helpful discussions and encouragement during the course of this study. We would also like to thank the staff of the Hellenic Pasteur Institute for collection and storage of clinical samples and the National Institute of Public Health and the Environment in Netherlands for kind donation of reference viral strains, used in this study. The work was supported in part by research grants from the European Union-Copernicus CIPA-CT94-0123, the "Délégation Générale au Réseau International des Instituts Pasteur et Instituts associés" (AC 98 Enterovirus) and the Greek Ministry of Health to P.M. and N.S., and the Research Commission and research proceeds (code no 2094) of the Laboratory of Biology & Genetics, University of Thessalia Medical School, to prof. N.C.V.

REFERENCES

1. Oberste, M. S., Maher K., Kilpatrick D. R. & Pallansch M. A. (1999). Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *Journal of Virology* **73(3)**:1941-1948.
2. Oberste, M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Flemister M. R., Brown B. A. & Pallansch M. A. (1999). Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *Journal of Clinical Microbiology* **37(5)**:1288-1293.
3. Pöyry, T., Kinnunen L., Hyypia T., et al. 1996. Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *Journal of General Virology* **77**:1699-1717.
4. Rueckert, R. R. (1990). Picornaviridae and their replication. In *Virology* (Fields B. N., Knipe D. M. et al eds). Pp. 507-548. New York: Raven Press.
5. Stanway, G. (1990). Structure, function and evolution of picornaviruses. *Journal of General Virology* **71**:2483-2501.
6. Guillot, S., Otelea D., Delpeyroux F. & Crainic R. (1994). Point mutations involved in the attenuation/neurovirulence alternation in type 1 and 2 oral polio vaccine strains detected by site-specific polymerase chain reaction. *Vaccine* **12(6)**:503-507.
7. Kitamura, N., Semler B. L., Rothberg P. G., et al. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* **291**:547-553.
8. Richardson, O. C. & Ehrenfeld E. (1990). Poliovirus RNA replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **161**:89-119.

9. Skinner, M. A., Racaniello V. R., Dunn G., Cooper J., Minor P. D. & Almond J. W. (1989). New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *Journal of Molecular Biology* **207**:379-392.
10. Sonenberg, N. (1990). Poliovirus translation. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **161**:23-47.
11. Wimmer, E., Hellen C. U. T. & Cao X. M. (1993). Genetics of poliovirus. *Annual Review of Genetics* **27**:353-436.
12. Andino, R., Rieckhof, G. E. & Baltimore D. (1990). A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell* **63**:369-380.
13. Andino, R., Rieckhof, G. E., Achacoso, P. L. & Baltimore D. (1993). Poliovirus RNA synthesis utilizes a RNP complex formed around the 5' end of viral RNA. *EMBO Journal* **12**:3587-3589.
14. Dahllund, L., Nissinen L., Pulli T., Huttunen V. P., Stanway G. & Hyypia T. (1995). The genome of echovirus 11. *Virus Research* **35**:215-222.
15. Huttunen, P., Santti J., Pulli T. & Hyypia T. (1996). The major echovirus group is genetically coherent and related to coxsackie B viruses. *Journal of General Virology* **77**:715-725.
16. Pilipenko, E. V., Blinov V. M., Romanova L. I., Sinyakov A. N., Maslova S. V. & Agol V. I. (1989). Conserved structural domains in the 5' untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence. *Virology* **168**:201-209.

17. Rivera, V. M., Welsh J. D. & Maizel J. V. (1988). Comparative sequence analysis of the 5' noncoding region of the enteroviruses and rhinoviruses. *Virology* **165**:42-50.
18. Romero, J. R. & Rotbart H. A.. (1995). Sequence analysis of the downstream nontranslated region of seven echoviruses with different neurovirulence phenotypes. *Journal of Virology* **69**:1370-1375.
19. Melnick, J.L. (1990). Enteroviruses. In *Virology*. (Fields, B.N., Knipe D.M. et al eds) Pp. 549-605. New York: Raven Press.
20. Berlin, L.E., Rorabaugh, M.L., Heldrich, F., Roberts, K., Doran, T. & Modlin J.F. (1993). Aseptic meningitis in infants <2 years of age: diagnosis and etiology. *Journal of Infectious Diseases* **168**:888-892.
21. Melnick, J.L. (1996). Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In *Virology*. (Fields, B.N., Knipe D.M. et al eds) Pp. 655-712. Philadelphia: Raven Press.
22. Grist, N. R., Bell E. J. & Assaad F. (1978). Enteroviruses in human disease. *Progress in Medical Virology* **24**:114-157.
23. Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N. & Vamvakopoulos N. C. (2000). Improved genotyping of vaccine and wild type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(12):4337-42.
24. King, A. M. Q., Brown F., Christian P., et al. (2000). Picornaviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. (Van Regenmortel M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., et al eds), Pp. 657-673. Academic Press, New-York, San Diego.

25. Fujioka, S., Koide H., Kitaura Y., Degushi H., Kawamura K. & Hirai K. (1996). Molecular detection and differentiation of enteroviruses in endomyocardial biopsies and pericardial effusions from dilated cardiomyopathy and myocarditis. *American Heart Journal* **131**:760-765.
26. Kammerer, U., Kunkel B. & Korn K. (1994). Nested PCR for specific and rapid identification of human picornaviruses. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:285-291.
27. Leparc, I., Aymard M., & Fuchs F. (1994). Acute, chronic and persistent enterovirus and poliovirus infections: detection of viral genome by seminested amplification in culture-negative samples. *Molecular Cellular Probes* **8**:487-495.
28. Muir, P., Kämmerer U., Korn K., et al. (1998). Molecular typing of Enteroviruses: current status and future requirements. *Clinical Microbiology Reviews* **11**(1):202-227.
29. Nicholson, F., Meeto G., Aiyar S., Banatvala J. & Muir P. (1994). Detection of enterovirus RNA in clinical samples by nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of enterovirus infection. *Journal of Virological Methods* **48**:155-166.
30. Severini, G. M., Mestroni L., Falaschi A., Camerini F. & Giacca M. (1993). Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *Journal of Clinical Microbiology* **31**:1345-1349.
31. Zoll, G.J., Melchers W. J. G., Kopecka H., Jambroes G., van der Poel H. J. A. & Galama J. M. D. (1992). General primer-mediated polymerase chain

reaction for the detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *Journal of Clinical Microbiology*. **30**:160-165.

32. Van der Avoort, H. G. A. M., Hull B. P., Hovi T., et al. (1995). Comparative study of five methods for intratypic differentiation of polioviruses. *Journal of Clinical Microbiology* **33**(10):2562-2566.
33. Gebhard, J. R. & Ehrenfeld E. (1992). Specific interactions of HeLa cell proteins with proposed translation domains of the poliovirus 5' noncoding region. *Journal of Virology* **66**:3101-3109.
34. Haller, A. A. & Semler B. L. 1995. Stem-loop structure synergy in binding cellular proteins to the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *Virology* **206**:923-934.

FIGURE 1

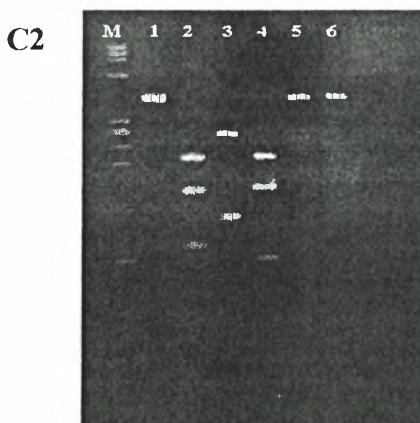
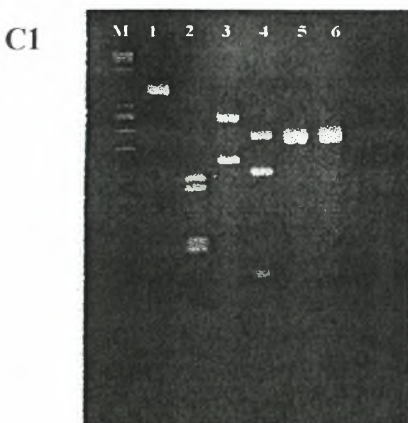
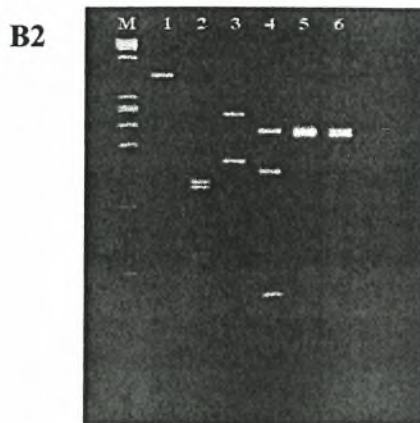
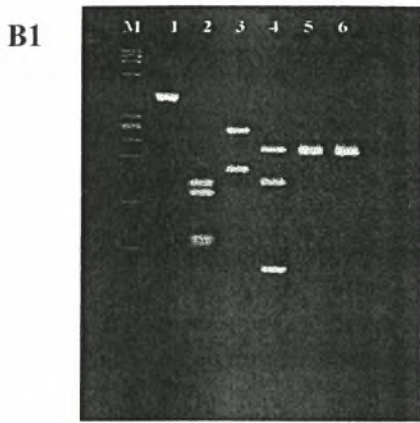
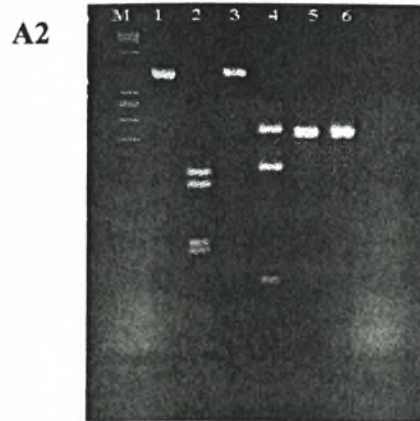
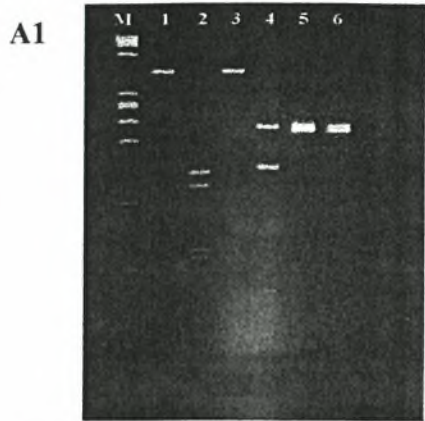


FIGURE LEGENDS

Figure 1:

RT-PCR/RFLP analysis of six representative Coxsackie B and ECHO reference strains and clinical isolates of Tables 1 & 2, with restriction endonucleases *HaeIII*, *DdeI*, *HpaII*, *NcoI* and *StyI*.

Panel A1: reference Coxsackie B2; Panel A2: clinical isolate 3 (cl.is. 3);

Panel B1: reference ECHO 2; Panel B2: clinical isolate 18 (cl.is. 18);

Panel C1: reference ECHO 5; Panel C2: clinical isolate 23 (cl.is. 23)

Lane M contains the *HaeIII* digest of Φ X174 DNA used to calculate the apparent size in bp of the various fragments indicated in Tables 1 & 2 and lane 1 contains the uncut (no enzyme added) RT-PCR product. Lanes 2-6 contain the restriction fragments produced by digestion with *HaeIII*, *DdeI*, *HpaII*, *NcoI* and *StyI*.

TABLE 1: RFLP analysis of Coxsackie B reference strains and clinical isolates

SEROYPES	STRAIN	GenBank Accession No	ORIGIN	RFLP analysis of RT-PCR generated fragments					
				<i>Hae III</i> ¹	<i>Dde I</i> ¹	<i>Hpa II</i> ¹	<i>Nco I</i> ¹	<i>Spy I</i> ¹	
Coxsackie B1	Japan	M16560	ATCC ²	<i>145/132/81/74</i>	307/104	213/149/53	330/105	331/104	
cl.is. 1	—	—	NRCE ³	<i>146/80/81/77/52</i>	307/105	216/149/55	211/118/105	213/114/106	
cl.is. 2	—	—	NRCE	<i>145/80/81/77/53</i>	308/101	215/149/57	214/116/109	218/119/110	
Coxsackie B2	Ohio	AF085363	ATCC	<i>147/132/82/75</i>	<i>no cut</i>	<i>215/149/55</i>	215/208	214/208	
cl.is. 3	—	—	HPI ⁴	146/133/83/77	<i>no cut</i>	215/150/54	214/207	213/206	
cl.is. 4	—	—	HPI	145/133/81/74	<i>no cut</i>	213/148/55	208/111/107	209/112/106	
cl.is. 5	—	—	HPI	146/134/82/75	<i>no cut</i>	214/149/53	<i>no cut</i>	209/115/109	
cl.is. 6	—	—	NRCE	143/83/80/79/50	<i>no cut</i>	218/149/55	209/108/100	211/113/102	
cl.is. 7	—	—	NRCE	141/84/80/78/53	<i>no cut</i>	219/150/56	209/108/100	208/111/102	
Coxsackie B3	Nancy	M88483	ATCC	<i>146/133/81/76</i>	310/104	212/149/55	214/209	216/210	
cl.is. 8	—	—	NRCE	145/132/82/77	312/108	216/148/56	214/110/105	209/113/110	
cl.is. 9	—	—	NRCE	149/135/83/75	<i>no cut</i>	217/149/53	217/210	215/209	
Coxsackie B4	JVB	X05690	ATCC	<i>145/132/81/75</i>	306/105	213/148/54	<i>No cut</i>	414/21 ⁵	
cl.is. 10	—	—	NRCE	211/146/80	309/105	218/150/56	<i>No cut</i>	412	
cl.is. 11	—	—	NRCE	213/149/79	311/105	219/147/54	<i>No cut</i>	413	
Coxsackie B5	Faulkner	AF114383	ATCC	208/145/80	306/105	268/149	208/110/104	210/111/105	
cl.is. 12	—	—	HPI	207/144/80	305/104	270/148	<i>No cut</i>	<i>no cut</i>	
cl.is. 13	—	—	HPI	208/143/81	307/106	271/149	<i>No cut</i>	<i>no cut</i>	
cl.is. 14	—	—	NRCE	210/145/80	<i>no cut</i>	273/149	213/208	218/203	
Coxsackie B6	Schmitt	AF039205	ATCC	<i>145/134/82/76</i>	412/20	214/148/56	214/207	215/208	
cl.is. 15	—	—	NRCE	215/146/81	311/109	218/151/58	<i>No cut</i>	<i>no cut</i>	
cl.is. 16	—	—	NRCE	211/145/80	309/105	213/149/55	<i>No cut</i>	<i>no cut</i>	

¹: Experimentally derived, computer calculated fragment sizes in base pairs.

(reference RFLP patterns are shown in *italics*, plain type letters indicate identity of RFLP patterns between clinical isolates and the respective reference strain, while bold type letters indicate differentiation).

²: American Tissue Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.

³: National Reference Center for Enteroviruses, Cantacuzino Institute, Bucharest, Romania.

⁴: Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece.

⁵: Small type numbers indicate the presence of fragment sizes smaller than 50 bp that may not be detectable by electrophoresis.

TABLE 2: RFLP analysis of ECHO reference strains and clinical isolates

SEROTYPES	STRAIN	GenBank Accession No	ORIGIN	RFLP analysis of RT-PCR generated fragments					
				Hae III ¹	Dde I ¹	Hpa II ¹	Nco I ¹	Sty I ¹	
ECHO 1	Farouk	X89531	ATCC ²	133/132/81/76	307/106	214/148/56	215/208	214/207	
cl.is. 17	—	—	NRCE ³	137/133/82/78	309/105	215/149/55	209/109/103	208/110/103	
ECHO 2	Cornelis	X88532	BJ ⁶	147/133/82/77	270/168	212/148/54	212/208	213/209	
cl.is. 18	—	—	NRCE	146/134/79/75	268/167	214/150/55	214/210	213/209	
ECHO 3	Morrisey	X89533	IPP ⁷	155/147/82/54	309/129	270/150	no cut	no cut	
cl.is. 19	—	—	NRCE	145/85/80/74/54	no cut	150/55	211/109/104	211/110/105	
cl.is. 20	—	—	NRCE	145/133	no cut	214/149/55	215/210	214/209	
ECHO 4	Pesacek	X89534	IPP	144/81/79/76/53	309/129	214/150/56	no cut	no cut	
cl.is. 21	—	—	NRCE	146/133/81/75	no cut	213/149/55	no cut	no cut	
cl.is. 22	—	—	NRCE	145/132/81/76	no cut	215/149/54	no cut	no cut	
ECHO 5	Noyce	X89535	BJ	147/133/82/77	269/170	214/149/56	215/210	214/208	
cl.is. 23	—	—	NRCE	209/143/82	270/105	213/148/54	no cut	no cut	
cl.is. 24	—	—	NRCE	146/133/82/76	271/107	212/149/54	209/111/106	215/208	
ECHO 6	D'Amori	U16283	BJ	210/92/83/56	no cut	213/150/54	216/209	217/210	
cl.is. 25	—	—	NRCE	150/139/81/53	307/105	214/150/55	no cut	no cut	
ECHO 7	Wallace	n.s.	ATCC	146/133/81/76	307/106	214/150/56	332/105	231/104/103	
cl.is. 26	—	—	NRCE	209/143/80	270/130	213/149/55	332/105	333/106	
cl.is. 27	—	—	NRCE	144/132/82/77	no cut	214/150/55	213/208	213/207	
ECHO 8 (ECHO 1 variant)	Bryson	X89539	IPP	210/146/82	410/25 ⁵	212/150/54	no cut	no cut	
cl.is. 28	—	—	NRCE	120/93/80/72/50	245/169	214/149/54	214/208	214/207	
cl.is. 29	—	—	NRCE	145/136/80/75	270/160	148/55/30	209/105/101	208/105/100	
ECHO 9	Hill	X84981	IPP	208/145/80	506/128	213/150/57	no cut	334/101	
cl.is. 30	—	—	NRCE	146/131/81/76	no cut	213/149/55	214/208	215/208	
cl.is. 31	—	—	NRCE	145/133/82/75	no cut	214/149/54	207/108/104	206/109/105	
ECHO 11	Gregory	U11705	IPP	208/147/82	no cut	270/150	no cut	336/103	
cl.is. 32	—	—	NRCE	209/146/82	no cut	271/150	213/206	214/205	
cl.is. 33	—	—	NRCE	146/135/82/73	no cut	212/150/54	214/208	213/208	
ECHO 12	Travis	X79047	BJ	210/147/82	245/168	270/152	215/210	214/206	
cl.is. 34	—	—	NRCE	144/132/83/76	no cut	145/133/83/75	215/209	211/115/104	

TABLE 2 (continued)

SEROTYPES	STRAIN	GenBank Accession No	ORIGIN	RFLP analysis of RT-PCR generated fragments						
				Hae III ¹	Dde I ¹	Hpa II ¹	Nco I ¹	Sty I ¹		
ECHO 13	Del Carmen	n.s. ⁶	ATCC ²	149/131/82/76	no cut	213/151/56	214/209	214/206		
cl.is. 35	—	—	NRCE ³	145/83/80/76/50	no cut	214/151/55	209/111/105	209/112/105		
cl.is. 36	—	—	NRCE	149/132/82/75	no cut	215/149/56	no cut	no cut		
ECHO 14	Tow	n.s.	ATCC	148/132/83/76	305/104	213/150/54	331/103	230/104/100		
cl.is. 37	—	—	NRCE	208/143/82	no cut	214/149/55	210/118/107	211/115/106		
cl.is. 38	—	—	NRCE	148/136/82/75	no cut	212/146/53	no cut	no cut		
ECHO 15	Charleston	n.s.	ATCC	207/145/82	no cut	270/150	330/103	330/102		
cl.is. 39	—	—	NRCE	143/84/80/75/50	no cut	212/150/54	214/208	213/208		
cl.is. 40	—	—	NRCE	142/83/79/75/50	no cut	214/149/55	213/208	213/207		
ECHO 16	Harrington	n.s.	ATCC	145/132/81/74	308/127	215/147/55	331/102	333/104		
ECHO 17	CHHE-29	n.s.	ATCC	146/131/80/75	304/103	215/148/55	332/104	331/102		
ECHO 18	Metcalf	n.s.	ATCC	146/131/81/76	309/131	215/148/55	330/104	331/105		
cl.is. 41	—	—	NRCE	146/133/83/77	no cut	214/148/55	209/115/105	208/114/104		
ECHO 19	Burke	n.s.	IPP ⁷	207/147/79	309/130	215/150/54	no cut	330/100		
ECHO 20	JV-1	n.s.	BJ ⁸	145/133/81/77	307/104	214/148/55	no cut	no cut		
ECHO 21	Farina	n.s.	ATCC	145/133/81/77	no cut	212/149/56	230/209	226/208		
ECHO 24	DeCamp	n.s.	ATCC	209/147/81	308/130	211/148/54	no cut	no cut		
ECHO 25	JV-4	X90722	IPP	208/146/82	306/128	213/148/55	no cut	no cut		
cl.is. 42	—	—	NRCE	149/135/81/75	no cut	214/149/55	208/105/100	209/106/103		
ECHO 26	Coronel	n.s.	IPP	210/149/81	304/105	270/150	215/209	213/210		
ECHO 27	Bacon	n.s.	ATCC	209/147/81	309/130	213/150/55	no cut	no cut		
ECHO 29	JV-10	n.s.	ATCC	146/133/81/76	305/104	215/148/54	231/105/100	230/106/101		
ECHO 30	Bastianni	AF162711	ATCC	208/146/80	305/104	211/149/55	214/206	214/207		
ECHO 31	Caldwell	n.s.	ATCC	147/133/81/76	307/106	213/149/55	no cut	no cut		
ECHO 32	PR-10	n.s.	IPP	208/145/81	306/105	215/148/55	330/104	230/104/100		
ECHO 33	Toluca-3	n.s.	ATCC	147/132/81/72	308/132	216/148/54	330/104	331/104		

1-3 & 5: See footnote to Table 1

6: Not sequenced in the 5' non coding region.

7: Institut Pasteur de Paris, Epidemiologie Moleculaire des Enterovirus, Paris, France.

8: Division of Virology, "Bela Johan" National Center of Epidemiology, Budapest, Hungary.

TABLE 3: Intertypal inter- and intragroup identities of reference Coxsackie B and ECHO strains

A: Intertypal-intragroup identities of reference ECHO strains			RFLP analysis of RT-PCR generated fragments					
SEROTYPES	STRAIN	GenBank Accession No	ORIGIN	Hae III ¹	Dde I ¹	Hpa II ¹	Nco I ¹	Sty I ¹
ECHO 2	Cornelis	X88532	BJ ⁸	147/133/82/77	270/168	212/148/54	212/208	213/209
ECHO 5	Noyce	X89535	BJ	147/133/82/77	269/170	214/149/56	215/210	214/208
ECHO 7	Wallace	n.s. ⁶	ATCC ²	146/133/81/76	307/106	214/150/56	332/105	231/104/103
ECHO 14	Tow	n.s.	ATCC	148/132/83/76	305/104	213/150/54	331/103	230/104/100
ECHO 9	Hill	X84981	IPP ⁷	208/145/80	306/128	213/150/57	no cut	334/101
ECHO 19	Burke	n.s.	IPP	207/147/79	309/130	215/150/54	no cut	330/100
ECHO 20	JV-1	n.s.	BJ	145/133/81/77	307/104	214/148/55	no cut	no cut
ECHO 31	Caldwell	n.s.	ATCC	147/133/81/76	307/106	213/149/55	no cut	no cut
ECHO 16	Harrington	n.s.	ATCC	145/132/81/74	308/127	215/147/55	331/102	333/104
ECHO 18	Metcalf	n.s.	ATCC	146/131/81/76	309/131	215/148/55	330/104	331/105
ECHO 33	Toluca-3	n.s.	ATCC	147/132/81/72	308/132	216/148/54	330/104	331/104
ECHO 24	DeCamp	n.s.	ATCC	209/147/81	308/130	211/148/54	no cut	no cut
ECHO 25	JV-4	X90722	IPP	208/146/82	306/128	213/148/55	no cut	no cut
ECHO 27	Bacon	n.s.	ATCC	209/147/81	309/130	213/150/55	no cut	no cut

B: Intertypal-intergroup identities of reference Coxsackie B and ECHO strains			RFLP analysis of RT-PCR generated fragments					
SEROTYPES	STRAIN	GenBank Accession No	ORIGIN	Hae III	Dde I	Hpa II	Nco I	Sty I
Coxsackie B1	Japan	M16560	ATCC	145/132/81/74	307/104	213/149/53	330/105	331/104
ECHO 17	CHHE-29	n.s.	ATCC	146/131/80/75	304/103	215/148/55	332/104	331/102
Coxsackie B2	Ohio	AF085363	ATCC	147/132/82/75	no cut	215/149/55	215/208	214/208
ECHO 13	Del Carmen	n.s.	ATCC	149/131/82/76	no cut	213/151/56	214/209	214/206

1, 2, 6, 7 & 8: See footnotes to Tables 1 and 2.

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γενική συζήτηση.

Η ανάπτυξη των τεχνικών της μοριακής βιολογίας και η εφαρμογή τους στην ανίχνευση και την ταυτοποίηση διαφόρων ιών, συνεισφέρει σε πολύ μεγάλο βαθμό στην εμπειριστατωμένη μελέτη της παθογένειας τους, στην πλήρη αποκρυπτογράφηση της δομής και της λειτουργίας τους, αλλά και στην ενσωμάτωση των γνώσεων αυτών στο πλαίσιο της σύγχρονης επιδημιολογικής πρακτικής. Επιπρόσθετα, η ταχεία και ακριβής ταυτοποίηση των ιών σε ένα κλινικό δείγμα είναι απαραίτητη για την έγκαιρη και κυρίως αποτελεσματική επίβλεψη των ιώσεων.

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί ενδείκνυνται για τέτοιου είδους μελέτες, καθώς οι λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτή την ομάδα των παθογόνων μικροοργανισμών μπορεί να αποβούν έως και μοιραίες για τον άνθρωπο. Στο πλαίσιο αυτής της λογικής, θεωρείται αναγκαίο να βρεθεί ένας αξιόπιστος τρόπος ελέγχου της κυκλοφορίας και παρακολούθησης της διάδοσης των εντεροϊώσεων. Δεδομένου μάλιστα του μεγάλου αριθμού των εντεροϊών που προσβάλλουν τον άνθρωπο (μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 64 ορότυποι) οι κλασικές μέθοδοι διάγνωσης των ιώσεων καθίστανται ιδιαίτερα δύσκολες και χρονοβόρες στην εφαρμογή τους. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ενός ύποπτου για εντεροϊό κλινικού δείγματος με καλλιέργεια σε κατάλληλες κυτταρικές σειρές και οροεξουδετέρωση με αντίστοιχες δεξαμενές αντισωμάτων, χρειάζονται δύο με τρεις εβδομάδες. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να χάνεται πολύτιμος χρόνος τόσο για τον ασθενή, όσο και για τον κλινικό γιατρό.

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από εντεροϊούς παρουσιάζουν μεγάλη συχνότητα ακόμη και στις σύγχρονες κοινωνίες όπου τηρούνται οι κανόνες υγιεινής, και αρκετές φορές προκαλούν επιδημίες κυρίως σε νεογνά και σε άτομα με μειωμένη ικανότητα ανοσολογικής ανταπόκρισης. Οι ασθένειες αυτές μπορεί να είναι έως και θανατηφόρες, με κυρίαρχη στο επίπεδο αυτό την πολιομυελίτιδα.

Η σοβαρότατη αυτή λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος αποτελούσε πραγματική μάστιγα μέχρι πριν από μερικές δεκαετίες, αλλά ακόμα και σήμερα δεν έχει ακόμα πλήρως εξαλειφθεί από αρκετές περιοχές του πλανήτη, παρά τους μαζικούς εμβολιασμούς που έχουν επιβληθεί παγκοσμίως από τις υγειονομικές αρχές εδώ και περίπου σαράντα χρόνια. Σε πολλά σημεία της αφρικανικής κυρίως ηπείρου και εξαιτίας των δυσμενών κοινωνικών, πολιτικών και οικονομικών συνθηκών που επικρατούν στις περιοχές αυτές, το επιβεβλημένο από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ.) πρόγραμμα εμβολιασμών είναι αδύνατον να εφαρμοστεί. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την έλλειψη επαρκών κανόνων υγιεινής, έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο την εμφάνιση πολλών κρουσμάτων πολιομυελίτιδας στις περιοχές αυτές, αλλά και την εξάπλωση και διάδοση των πολιοϊών και σε άλλα σημεία του πλανήτη.

Βάσει των προαναφερθέντων, θεωρείται αναγκαία η ανάπτυξη μίας μεθόδου εργαστηριακής ταυτοποίησης των εντεροϊών, η οποία θα παρέχει και τη δυνατότητα της άμεσης και ασφαλούς διαφοροποίησης των πολιοϊών από τους υπόλοιπους εντεροϊούς, σε κλινικά δείγματα από περιστατικά ύποπτα για πολιομυελίτιδα.

Το κύριο σημείο της παρούσας μελέτης ήταν η αναζήτηση ενός πρωτοκόλλου ανίχνευσης των εντεροϊών σε κλινικά δείγματα, βασισμένου στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) και η επακόλουθη

ταυτοποίηση τους με τη μέθοδο της ανάλυσης πολυμορφισμών μήκους μετά από επώαση των προϊόντων της PCR με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Restriction Fragment Length Polymorphism analysis – RFLP ανάλυση). Η γενωμική περιοχή – “στόχος” που επιλέχθηκε για την αντίδραση PCR, ήταν η 5’ μη κωδική περιοχή του γενώματος (5’ NCR) των εντεροϊών, η οποία είναι εξαιρετικά συντηρημένη και προσφέρεται για τέτοιου είδους αναλύσεις.

Με το κατάλληλο ζεύγος των εκκινητικών μορίων UC₅₃/UG₅₂ επιτεύχθηκε η ανίχνευση όλων των οροτύπων των εντεροϊών που μελετήθηκαν (δηλαδή των 3 πολιοϊών, των 6 Coxsackie B ιών και των 28 ECHO ιών).

Πέραν των πρότυπων στελεχών των εντεροϊών με αυτό το ζεύγος των εκκινητικών μορίων κατέστη δυνατή η ανίχνευση και όλων των κλινικών δειγμάτων που μελετήθηκαν (δηλαδή των 21 κλινικών δειγμάτων των πολιοϊών, των 16 κλινικών δειγμάτων των Coxsackie B ιών, και των 26 κλινικών δειγμάτων των ECHO ιών).

Η ταυτοποίηση τόσο των πρότυπων στελεχών των μελετηθέντων εντεροϊών, όσο και των αντίστοιχων κλινικών δειγμάτων επιχειρήθηκε με τη μέθοδο της ανάλυσης των πολυμορφισμών μήκους (RFLP ανάλυση) με την επιλογή κατάλληλων περιοριστικών ενδονουκλεασών. Το κριτήριο επιλογής των ενζύμων αυτών ήταν η ικανότητα τους να διαφοροποιούν σε όσο το δυνατό μεγαλύτερο βαθμό τα πρότυπα στελέχη των εντεροϊών για τα οποία υπάρχουν ήδη δημοσιευμένες οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της 5’ μη κωδικής περιοχής. Τα περιοριστικά ένζυμα που τελικά επιλέχθηκαν με το κριτήριο αυτό ήταν τα ακόλουθα: HaeIII, DdeI, HpaII, NcoI, StyI και AvaI.

Τα πειραματικά δεδομένα της ανάλυσης των πολιοϊών, τόσο σε επίπεδο πρότυπων στελεχών, όσο και σε επίπεδο κλινικών δειγμάτων, ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικά.

Ένας ελάχιστος αριθμός τεσσάρων περιοριστικών ενδονουκλεασών (των HaeIII, DdeI, NcoI και AuaI) αποδείχθηκε ικανοποιητικός για την πλήρη ταυτοποίηση των πρότυπων στελεχών των πολιοϊών μεταξύ τους. Με τα τέσσερα αυτά περιοριστικά ένζυμα κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός των τριών οροτύπων που αποτελούν την ομάδα των πολιοϊών, καθώς επίσης και ο διαχωρισμός του κάθε οροτύπου σε στελέχη εμβολίου και άγρια στελέχη.

Η ανάλυση και μοριακή μελέτη των κλινικών δειγμάτων των πολιοϊών κρίθηκε εξίσου ικανοποιητική. Τα εικοσιένα κλινικά δείγματα ταυτοποιήθηκαν στο σύνολο τους με απόλυτη επιτυχία και χωρίς καθόλου αποκλίσεις από τα δεδομένα της RFLP ανάλυσης των αντίστοιχων πρότυπων στελεχών.

Η χρήση των δύο επιπλέον περιοριστικών ενζύμων (HpaII και StyI) κρίθηκε απαραίτητη για την παροχή συμπληρωματικών δεδομένων, στην περίπτωση που κάποιο κλινικό δείγμα θα παρουσίαζε αποκλίσεις από το αντίστοιχο πρότυπο στέλεχος κατά την ανάλυση του με τα αρχικά τέσσερα ένζυμα (HaeIII, DdeI, NcoI και AuaI). Το μόνο περιοριστικό ένζυμο που κρίθηκε αναντικατάστατο ήταν το AuaI και αυτό γιατί αποδείχθηκε ότι είναι το μοναδικό ένζυμο το οποίο έχει την ικανότητα να διαχωρίσει το στέλεχος εμβολίου του πολιοϊού τύπου I, από το αντίστοιχο άγριο στέλεχος.

Οι υπόλοιποι εντεροϊοί που μελετήθηκαν ήταν οι Coxsackie B ιοί και οι ECHO ιοί (συνολικά 34 πρότυπα στελέχη: 6 Coxsackie B και 28 ECHO ορότυποι), με τα

αντίστοιχα κλινικά τους δείγματα (συνολικά 42 κλινικά δείγματα: 16 Coxsackie B και 26 ECHO δείγματα). Η μοριακή μελέτη των εντεροϊών αυτών αποκάλυψε μεγάλες γενετικές διαφορές μεταξύ των πολιοϊών και των υπόλοιπων εντεροϊών, στην 5' μη κωδική περιοχή του γενώματος. Η ανίχνευση τέτοιων διαφορών ήταν ένα αναπάντεχο εύρημα, δεδομένου του εξαιρετικά συντηρητικού χαρακτήρα της περιοχής αυτής.

Πιο αναλυτικά, η σύγκριση των αποτελεσμάτων από την RFLP ανάλυση των πρότυπων στελεχών των Coxsackie B ιών μεταξύ τους, με τη χρήση πέντε διαφορετικών περιοριστικών ενδονουκλεασών (HaeIII, DdeI, HpaII, NcoI και StyI), κατέστησε εφικτή την ταυτοποίηση και τον πλήρη διαχωρισμό των έξι οροτύπων των ιών αυτών μεταξύ τους.

Εντούτοις, η σύγκριση των αντίστοιχων αποτελεσμάτων των πρότυπων στελεχών των ECHO ιών μεταξύ τους, απέδειξε ότι αρκετά από τα στελέχη αυτά παρουσίαζαν πανομοιότυπη εικόνα των πολυμορφισμών μήκους στην RFLP ανάλυση, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η διαφοροποίησή τους. Η χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης AnaI κρίθηκε ως μη απαραίτητη, καθώς δεν παρουσίασε διαχωριστική ικανότητα στις δύο αυτές ομάδες των εντεροϊών, και κυρίως στους ECHO ιούς.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των κλινικών δειγμάτων και στις δύο αυτές ομάδες των εντεροϊών παρουσίασαν την έντονη διαφοροποίηση των πολυμορφισμών μήκους των κλινικών δειγμάτων, από τα αντίστοιχα πρότυπα στελέχη.

Συγκεκριμένα, από τα 16 κλινικά δείγματα των Coxsackie B ιών που μελετήθηκαν, μόνο ένα ταυτοποιήθηκε πλήρως και ήταν σε συμφωνία με το

αντίστοιχο πρότυπο στέλεχος. Επιπρόσθετα, από τα 26 κλινικά δείγματα των ECHO ιών και πάλι μόνο ένα ταυτοποιήθηκε πλήρως και σε αρμονία με τον αντίστοιχο πρότυπο ECHO ιό.

Η συνολική εκτίμηση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση των πολυμορφισμών μήκους μετά την επώαση με τις προαναφερθείσες περιοριστικές ενδονουκλεάσες για όλα τα πρότυπα στελέχη των εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, παρείχε ιδιαίτερα χρήσιμες πληροφορίες για τη γενετική και τη βιολογία των ιών αυτών.

Συγκεκριμένα, κατέστη δυνατή η πλήρης διαφοροποίηση και ταυτοποίηση των πρότυπων στελεχών των πολιοϊών τόσο μεταξύ τους, όσο και σε σύγκριση με όλους τους υπόλοιπους εντεροϊούς. Αντίθετα, τα πρότυπα στελέχη των Coxsackie B ιών διαφοροποιήθηκαν μεν μεταξύ τους και με τους πολιοϊούς, αλλά όχι και με όλους τους ECHO ιούς. Συνολικά λοιπόν, η μόνη ομάδα των εντεροϊών που διαφοροποιείται πλήρως είναι οι πολιοϊοί, ενώ αρκετά πρότυπα στελέχη των Coxsackie B ιών και των ECHO ιών παρουσιάζουν αλληλοεπικαλυπτόμενα μοτίβα στην RFLP ανάλυση, ανεξαρτήτως του περιοριστικού ενζύμου που χρησιμοποιείται.

Επιπρόσθετα, η εργαστηριακή ταυτοποίηση των κλινικών δειγμάτων των εντεροϊών με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών και την ανάλυση των μοριακών αυτών δεδομένων, αποδεικνύεται εφικτή μόνο για τα κλινικά δείγματα των πολιοϊών, τα αποτελέσματα των οποίων βρίσκονται σε πλήρη αρμονία με τα αποτελέσματα των αντίστοιχων πρότυπων δειγμάτων.

Αυτή η έντονη διαφορά που παρουσιάζεται μεταξύ των πολιοϊών και των υπόλοιπων εντεροϊών, μπορεί κατά μία έννοια να αποδοθεί στα προγράμματα

μαζικών εμβολιασμών κατά της πολιομυελίτιδας, εδώ και τέσσερις δεκαετίες περίπου, στις περισσότερες περιοχές του πλανήτη, σε αντίθεση με την έλλειψη αντίστοιχων εμβολιασμών έναντι των υπόλοιπων εντεροϊών.

Το εμβόλιο αυτό, δηλαδή το εμβόλιο Sabin, παροχετεύεται στον ανθρώπινο οργανισμό από το στόμα και περιέχει και τους τρεις ορότυπους των πολιοϊών σε εξασθενημένη μορφή (με τη διαδικασία της θέρμανσης των ιϊκών αυτών στελεχών). Τα εξασθενημένα στελέχη του εμβολίου που εισάγονται στον οργανισμό μέσω του στόματος, αναπαράγονται στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπου, όπως ακριβώς και τα αντίστοιχα άγρια στελέχη. Η διαφορά όμως, είναι ότι τα στελέχη εμβολίου δεν είναι ικανά να προκαλέσουν την ασθένεια της πολιομυελίτιδας, αλλά μόνο την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος του εμβολιασμένου ατόμου και την ενεργητική παραγωγή αντισωμάτων. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ανοσία του ατόμου έναντι των άγριων στελεχών των πολιοϊών, με τους οποίους ενδέχεται να έρθει σε επαφή.

Οι μαζικοί λοιπόν, και μακροχρόνιοι εμβολιασμοί μεγάλων πληθυσμιακών ομάδων έναντι της πολιομυελίτιδας είχαν στην ουσία ως αποτέλεσμα, τη συνεχή “διοχέτευση” των γενωμικών αλληλουχιών των στελεχών εμβολίου των πολιοϊών μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Κατά συνέπεια, θεωρείται ιδιαίτερα πιθανό οι ιοί αυτοί να υπέστησαν περισσότερη και εντονότερη εξελικτική πίεση στις περιοχές του γενώματος τους, οι οποίες καθορίζουν τα αντιγονικά χαρακτηριστικά του κάθε ορότυπου, όπως η περιοχή ORF, παρά σε περιοχές όπως η 5' μη κωδική, της οποίας η λειτουργικότητα είναι τελείως διαφορετική.

Σε αντίθεση με τους πολιοϊούς, για τους οποίους έχει ανακαλυφθεί εμβόλιο και μάλιστα εδώ και αρκετές δεκαετίες, οι υπόλοιποι εντεροϊοί (έναντι των οποίων δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα ανάλογο εμβόλιο) έχουν εξελιχθεί κάτω από τελείως διαφορετικές συνθήκες εντός των κυττάρων-ξενιστών τους. Το γεγονός αυτό εξηγεί και τη μεγάλη εξελικτική απόκλιση που παρουσιάζεται μεταξύ των ιών αυτών.

Η 5' μη κωδική περιοχή των εντεροϊών περιέχει αλληλουχίες που λειτουργούν ως “σήματα” για την έναρξη της ιϊκής πρωτεϊνοσύνθεσης εντός του κυτταρικού περιβάλλοντος του ξενιστή. Επιπλέον, η μετάφραση του γενώματος των ιών αυτών επηρεάζεται και από συγκεκριμένες κυτταρικές πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις δευτεροταγείς δομές που αναπτύσσονται στην 5' μη κωδική περιοχή των εντεροϊών. Κατά συνέπεια, εξαιτίας του διαφορετικού κυτταρικού τροπισμού που παρουσιάζουν οι πολιοϊοί σε σχέση με τους υπόλοιπους εντεροϊούς, ενδέχεται να επηρεάζεται και να εξελίσσεται με διαφορετικό τρόπο και αυτή η περιοχή του γενώματος τους.

Συνοψίζοντας, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η εμπειριστατωμένη μοριακή μελέτη των εντεροϊών, αυτής της μεγάλης και σημαντικής ομάδας ιών, συμβάλλει ιδιαίτερα στην κατανόηση και την πλήρη διαλεύκανση όλων των βιολογικών μηχανισμών βάσει των οποίων λειτουργούν αυτοί οι επικίνδυνοι για τον άνθρωπο παθογόνοι μικροοργανισμοί.

Παράγοντες που εξαρτώνται από τους ίδιους τους ιούς, όπως οι γρήγοροι εξελικτικοί ρυθμοί, αλλά και παράγοντες που συνδέονται με την περιβαλλοντική υποβάθμιση, τις οικολογικές διαταραχές και την έλλειψη στοιχειωδών κανόνων υγιεινής σε πολυάριθμες πληθυσμιακές κοινότητες στον πλανήτη μας, επηρεάζουν τη

συμπεριφορά και την κυκλοφορία διαφόρων ιικών στελεχών και οδηγούν άλλοτε στην εμφάνιση νέων ιών και άλλοτε στην επανεμφάνιση ιώσεων, οι οποίες είχαν εξαλειφθεί. Η σωστή επιδημιολογική παρακολούθηση προϋποθέτει την ικανότητα ταχείας, ακριβούς και αξιόπιστης αναγνώρισης και ταυτοποίησης των ιών που κυκλοφορούν κάθε φορά στο περιβάλλον, είναι όμως απαραίτητη για τον έλεγχο και την επίβλεψη των λοιμωδών νοσημάτων.

Η πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην επιστήμη μοριακής ιολογίας με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) ανοίγει νέες προοπτικές στον δύσκολο αγώνα της εξερεύνησης του μικρόκοσμου των ιών.

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους, στο διάστημα των πέντε περίπου τελευταίων χρόνων, με την ηθική και προσωπική τους συμπαράσταση στάθηκαν κοντά μου και συνέβαλαν στην επίτευξη των στόχων μου.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Νικόλαο Βαμβακόπουλο αφενός για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διατριβή μου σε ένα εξαιρετικά απαιτητικό επιστημονικό πεδίο και αφετέρου για την πολύτιμη επιστημονική του καθοδήγηση.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον ερευνητή Δρ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο, ο οποίος με την πολύωρη απασχόληση του στο εργαστήριο, όχι μόνο με καθοδήγησε με τις πολύτιμες συμβουλές του στα πρώτα μου βήματα στον ερευνητικό χώρο και μοιράστηκε τη μακροχρόνια πείρα του και τις γνώσεις του μαζί μου, αλλά επιπλέον μου επέτρεψε να συζητώ μαζί του και να τον συμβουλευόμαι σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αγαπημένο μου σύζυγο Σταύρο για την προσωπική του συμπαράσταση και υποστήριξη, σε στιγμές που η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής έμοιαζε να είναι ανέφικτη.

Διδακτορική διατριβή της Αμαλίας Γεωργοπούλου

Θέμα: “Ανίχνευση και ταυτοποίηση των εντεροϊών του ανθρώπου (Πολιοϊών, Coxsackie B και ECHO ιών) με τεχνικές μοριακής βιολογίας”. 2001, Τμήμα Βιολογίας και Γενετικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περίληψη

Το γένος των εντεροϊών αποτελείται από 64 μη ελυτροφόρους, μικρούς RNA ιούς, που ανήκουν στην οικογένεια *Picornaviridae*. Στο γένος αυτό συμπεριλαμβάνονται οι πολιοϊοί, οι ιοί Coxsackie A και B, οι ECHO ιοί και οι εντεροϊοί 68-71. Οι εντεροϊοί προκαλούν στον άνθρωπο ασθένειες ποικίλουςας σοβαρότητας, μπορεί όμως και να παραμείνουν ασυμπτωματικοί επί μακρόν. Η κατανομή τους είναι παγκόσμια και σε ήπια κλίματα η κυκλοφορία τους αυξάνεται στη διάρκεια του καλοκαιριού και στις αρχές του φθινοπώρου. Οι πολιοϊοί δύνανται να προκαλέσουν από παραλυτική πολιομυελίτιδα έως και αδιαφοροποίητη εμπύρετο νόσο, κυρίως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Οι Coxsackie B ιοί, αντίστοιχα συνδέονται με πλευροδυνία, περικαρδίτιδα και μυοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα κλπ. Οι ECHO ιοί είναι οι λιγότερο παθογόνοι από τους εντεροϊούς μπορεί όμως να προκαλέσουν εντερικές λοιμώξεις, μηνιγγίτιδα κλπ.

Με στόχο την μοριακή διαφοροποίηση των προτύπων στελεχών των πολιοϊών, των Coxsackie B ιών και των ECHO ιών εφαρμόστηκε η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR), σε συνδυασμό με πολυμορφισμούς μήκους μετά από επάση με περιοριστικά ένζυμα (RFLP). Για την αξιολόγηση της μεθόδου σε κλινικό επίπεδο έγινε εφαρμογή της σε ένα συνολικό αριθμό 63 κλινικών δειγμάτων.

Για την PCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των κοινών, για τους εντεροϊούς, εκκνητικών μορίων UC₅₃/UG₅₂, τα οποία επεκτείνουν αλληλουχίες στην συντηρητική 5' μη κωδική περιοχή του γενώματος των εντεροϊών. Για την RFLP ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα HaeIII, DdeI, NcoI, HpaII, StyI και AvaI. Σε αντίθεση με τους Coxsackie B και τους ECHO ιούς, οι πολιοϊοί διαφοροποιήθηκαν πλήρως τόσο μεταξύ τους, όσο και με τους υπόλοιπους εντεροϊούς. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν την τελείως διαφορετική πορεία που ακολούθησαν οι διάφορες ομάδες των εντεροϊών, εξαιτίας των διαφορετικών εξελικτικών πιέσεων που ασκήθηκαν με την πάροδο του χρόνου στους ιούς αυτούς.

Ph.D. thesis of Amalia Georgopoulou

Title: "Detection and differentiation of human enteroviruses (Polioviruses, ECHO viruses and Cocksackie B viruses) following enzymatic amplification (RT-PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis". 2001, Department of Biology & Genetics, University of Thessaly Medical School.

Abstract

Enteroviruses are non-enveloped RNA viruses belonging to the *Picornaviridae* family. Human enteroviruses are subgrouped into Polioviruses, ECHO viruses, the more recently discovered Enteroviruses types 68 to 71 and Coxsackie viruses type A and type B. Enteroviruses can either cause illness of varying severity or remain asymptomatic. Poliovirus types 1-3 have been associated with paralytic poliomyelitis and undifferentiated febrile illness particularly during the summer. Coxsackie B viruses have been associated with pleurodynia, aseptic meningitis, meningoencephalitis, myocarditis, pericarditis etc. Echoviruses, although they are less pathogenic, they can cause intestinal infections, meningitis etc.

This study addresses the genotyping issue of Polioviruses, Coxsackie B viruses and ECHO viruses by introducing a combination of RT-PCR and RFLP analysis. The potential clinical diagnostic applications of the method are also being assessed with relevant infected clinical samples. Reference Polio, Coxsackie B and Echo enteroviruses have been genotyped by reverse transcriptase polymerase chain reaction amplification using a common consensus enteroviral primer pair designated UC53/UG52, followed by restriction endonuclease digestion of the generated amplicons with HaeIII, DdeI, HpaII, NcoI, StyI and Aval and electrophoretic analysis of the resulting products.

The Poliovirus reference strains have been completely differentiated, while the Coxsackie B and ECHO virus reference strains formed a much more variable viral group. These findings support the specificity of the described method for clinical diagnostic genotyping of polioviruses and demonstrate that the 440 bp long target sequence in the 5' NCR follows different evolutionary process in polio and non-polio enteroviruses that is particularly prominent between reference non-polio strains and their serotypically assigned clinical isolates.

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΚΑΙ COXSACKIE B ΙΩΝ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

A. Γεωργοπούλου ^(1,2), N. Σιαφάκας ⁽¹⁾, Π. Μαρκουλάτος ⁽¹⁾, N. Σπύρου ⁽¹⁾, N. Βαμβακόπουλος⁽²⁾

1. Τμήμα Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Βασ. Σοφίας 127, Αθήνα, 115 21.

2. Τμήμα Βιολογίας και Γενετικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ιατρική Σχολή, Παπακυριαζή 22, Λάρισα, 412 22

GENOTYPING POLIO AND COXSACKIE B ENTEROVIRUSES: POTENTIAL CLINICAL DIAGNOSTIC IMPLICATIONS.

A. Georgopoulou ^(1,2), N. Sifakas ⁽¹⁾, P. Markoulatos ⁽¹⁾, N. Spyrou ⁽¹⁾, N. C. Vamvakopoulos ⁽²⁾

1. Department of Virology, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias Ave., 115 21, Athens, Greece.

2. Department of Biology & Genetics, University of Thessaly, Medical School, 22 Papakyriazi str., Larisa 412 22, Greece.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ: Με στόχο την μοριακή διαφοροποίηση των προτύπων στελεχών των πολιοϊών και των Coxsackie B ιών εφαρμόσθηκε η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR), σε συνδυασμό με πολυμορφισμούς μήκους μετά από επώαση με περιοριστικά ένζυμα (RFLP).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ Για την PCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των κοινών, για τους εντεροϊούς, εκκινητικών μορίων UC₅₃/UC₅₂, τα οποία επεκτείνουν αλληλουχίες στην συντηρητική 5' μη κωδική περιοχή. Για την RFLP ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα HaeIII, DdeI και NcoI.

ΕΥΡΗΜΑΤΑ: Για την διαφοροποίηση των στελεχών Coxsackie B2, Coxsackie B6 και του αγρίου στελεχούς του πολιοϊού τύπου 2 (MEF) χρειάστηκε το μοτίβο του DdeI μόνο. Αντίστοιχα, για το στέλεχος εμβολίου του πολιοϊού τύπου 3 (Sabin 3) χρειάστηκε το μοτίβο του HaeIII ή του NcoI μόνο, και για το στέλεχος Coxsackie B1 το μοτίβο του NcoI μόνο. Περαιτέρω σύγκριση των μοτίβων και των τριών ενζύμων οδήγησε σε διαφοροποίηση δέκα εκ των δώδεκα προτύπων στελεχών που εξετάσθηκαν, με την εξαίρεση των στελεχών του πολιοϊού τύπου 1 (Sabin 1-στέλεχος εμβολίου και Mahoney-άγριο στέλεχος). Ταυτόχρονα με τα πρότυπα στελέχη μελετήθηκαν και δέκα κλινικά δείγματα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Προκειμένου να διευκολυνθεί η ταυτοποίηση των δειγμάτων αυτών, τα αποτελέσματα από την ανάλυση των προτύπων στελεχών διαμορφώθηκαν σε Πίνακες σύγκρισης και ομαδοποίησης των μοτίβων των τριών περιοριστικών ενζύμων. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν μία ταχεία, ακριβή και ευαίσθητη μέθοδο διάγνωσης των ηοιμώξεων από πολιοϊούς και Coxsackie B ιούς.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΠΕΡΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΣΤΗΝ 5' ΜΗ ΚΩΔΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΑΓΡΙΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ ΙΩΝ COXSACKIE B ΚΑΙ ECHO ΜΕ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ ΜΗΚΟΥΣ.

*A. Γεωργοπούλου^{1,3}, Π. Μαρκουλάτος *¹, Ν. Σπύρου¹, Ν. Βακάλης², Ν. Βαμβακόπουλος³.*

¹Τμήμα Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Βασ. Σοφίας 127, Αθήνα 115 21.

²Τμήμα Παρασιτολογίας, Τομέας Εντομολογίας και Τροπικών Ασθενειών, Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Λεωφ. Αλεξάνδρας 196, Αθήνα 115 21.

³Τμήμα Βιολογίας και Γενετικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Παπακυριαζή 22, Λάρισα 412 22.

HIGH SEQUENCE DIVERGENCE IN THE 5' NON CODING REGION OF REFERENCE COXSACKIE B AND ECHO VIRAL STRAINS AND CLINICAL ISOLATES REVEALED BY RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS.

*A. Georgopoulou^{1,3}, P. Markoulatos *¹, N. Spyrou¹, N. Vakalis ², N. Vamvakopoulos³.*

¹Department of Virology, Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias Ave., Athens 11521, Greece.

²Department of Parasitology, Entomology and Tropical Diseases, National School of Public Health, 196 Alexandras Ave., Athens 11521, Greece.

³Department of Biology & Genetics, University of Thessalia Medical School, 22 Papakyriazi St., Larisa 412 22, Greece.

Σκοπός της μελέτης: Στην παρούσα εργασία επιδιώκεται η ανάλυση με πολυμορφισμούς μήκους μετά από επώαση με περιοριστικά ένζυμα ενός τμήματος στην 5' μη κωδική περιοχή του γενώματος των πρότυπων στελεχών και κλινικών δειγμάτων των Cocksackie B και ECHO ιών, ώστε να μελετηθεί η μεταβλητότητα της συγκεκριμένης περιοχής τόσο μεταξύ των συγκεκριμένων ιών, όσο και σε σύγκριση με τους πολιοϊούς.

Υλικά και μέθοδοι: Ένα τμήμα μήκους 440 βάσεων εντός της 5' μη κωδικής περιοχής του γενώματος των 34 πρότυπων στελεχών των Cocksackie B και ECHO ιών και ενός συνόλου 42 κλινικών δειγμάτων, το οποίο πολλαπλασιάστηκε με την μέθοδο της PCR, υπέστη ανάλυση πολυμορφισμών μήκους μετά από επώαση με 5 περιοριστικά ένζυμα: HaellI, DdeI, HpaI, NcoI, StyI (RFLP ανάλυση).

Ευρήματα: Τα πρότυπα στελέχη των Cocksackie B ιών παρουσίασαν πλήρη διαφοροποίηση, με μόνη εξαίρεση τα στελέχη CoxB1 και CoxB2 που ήταν πανομοιότυπα με τα στελέχη ECHO17 και ECHO13, αντίστοιχα. Από τα πρότυπα στελέχη των ECHO ιών, άλλα διαφοροποιήθηκαν και άλλα ήταν πανομοιότυπα είτε μεταξύ τους, είτε με τους Cocksackie B ιούς, αλλά όχι με τους πολιοϊούς. Επιπρόσθετα, τα κλινικά δείγματα παρουσίασαν πολύ μεγάλη ποικιλομορφία στην συγκεκριμένη περιοχή.

Αποτελέσματα: Τα ευρήματα αυτά αποδεικνύουν την μεγάλη ειδικότητα της RFLP ανάλυσης όσον αφορά την ταυτοποίηση κλινικών δειγμάτων πολιοϊών σε αντίθεση με τους υπόλοιπους εντεροϊούς και υποστηρίζουν ότι η 5' μη κωδική περιοχή είναι πολύ πιο μεταβλητή, λόγω εξελικτικών πιέσεων, στους μη-πόλιο εντεροϊούς απ' ότι στους πολιοϊούς.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΙΟΛΟΓΙΑΣ