

## **ΒΑΪΑ ΠΛΙΑΚΑ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ - ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.  
ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ  
ΑΝΤΙΓΡΑΦΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΪΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

#### **Παναγιώτης Μαρκουλάτος (Επιβλέπων)**

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

#### **Ζήσης Μαμούρης**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών πληθυσμών

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

#### **Σταματίνα Λεβειδιώτου-Στεφάνου**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στην παρούσα διατριβή, 13 δείγματα τα οποία απομονώθηκαν από υγιή εμβολιασμένα άτομα και άτομα με εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP) κατά την χρονική περίοδο 1978-2001, μελετήθηκαν για την παρουσία μεταλλάξεων σε ένα τμήμα της 5'-NCR περιοχής και σε ολόκληρη τη VP1 περιοχή. Ο γενότυπος των 13 κλινικών στελεχών προσδιορίστηκε ως Sabin 1 για δυο από αυτά και ως Sabin 2 για έντεκα από αυτά μέσω RFLP ανάλυσης στην 5'-NCR περιοχή. Επιπλέον όλα τα ιϊκά στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως OPV-like ιοί καθώς εμφάνισαν < 1 % ποσοστό απόκλισης στην VP1 περιοχή από τα αντίστοιχα πρότυπα εμβολιακά στελέχη. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δείχνουν ότι η αλληλούχιση των 5'-NCR και VP1 περιοχών είναι σημαντική για την μοριακή διάγνωση των πολιοϊών. Η ανάλυση αυτών των περιοχών δείχνει ότι εμβολιοσυνδεόμενοι πολιοϊοί είναι δυνατόν να εξελιχθούν σε μεταδόσιμα και μολυσματικά παθογόνα μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων τόσο σε δομικά στοιχεία της VP1 (αντιγονικές θέσεις, περιοχή πρόσδεσης του κυτταρικού υποδοχέα) όσο και σε καθοριστές της εξασθένησης των Sabin εμβολιακών στελεχών στις 5'-NCR και VP1 περιοχές. Επιπλέον, συμπεραίνεται ότι δεν είναι σημαντικό μόνο το ποσοστό απόκλισης στην VP1 περιοχή αλλά κυρίως οι θέσεις όπου εντοπίζονται οι μεταλλάξεις. Ο

χαρακτηρισμός εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών που βασίζεται στις 5'-NCR και VP1 αλληλουχίες θα μπορούσε να δώσει επιπλέον πληροφορίες όσον αφορά την εξέλιξη των στελεχών αυτών.

Επιπλέον, επιχειρήθηκε η συσχέτιση μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών με την κινητική ανάπτυξης εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν 14 ιικά στελέχη εκ των οποίων 6 ιικά στελέχη έφεραν απλούς ανασυνδυασμούς, 6 ιικά στελέχη έφεραν διπλούς ανασυνδυασμούς και δύο ιικά στελέχη τα οποία δεν έφεραν ανασυνδυασμό. Ο φαινότυπος ανάπτυξης των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών προσδιορίστηκε σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C και 40°C) χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικές μεθόδους και συγκρίθηκε με την ανάπτυξη των αντίστοιχων πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3). Συγκεκριμένα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: i) το RCT τεστ (Reproductive Capacity at different Temperatures) το οποίο ορίζεται ως η διαφορά, μετά από επώαση 5 ημερών, ανάμεσα στο  $\log_{10}$  του ιικού τίτλου που εκφράζεται σε TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infective dose) ανά ml, στην ευνοϊκή (37°C) και στη μη ευνοϊκή θερμοκρασία (40°C) για την ιική αναπαραγωγή και ii) η καμπύλη ανάπτυξης ενός σταδίου (one-step growth curve test) η οποία παρουσιάζει την ιική ανάπτυξη κατά την διάρκεια των πρώτων 12 ωρών στους 37°C και 40°C μετά την μόλυνση κυττάρων με 10 MOI (Multiplicity Of Infection) ή 10 TCID<sub>50</sub>/cell. Συμπερασματικά, στα Sabin 2 εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη με απλό ανασυνδυασμό τύπου S2/S1, η μετάλλαξη στο κατάλοιπο 143 της VP1 πρωτεΐνης ευνοεί σημαντικά την ιική ανάπτυξη και πιθανόν την αναστροφή προς την νευρομολυσματικότητα. Η μετάλλαξη αυτή έχει συχνά παρατηρηθεί σε Sabin 2 εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη που απομονώθηκαν από άτομα με VAPP. Στα Sabin 3 εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη, ο ανασυνδυασμός του Sabin 3 εμβολιακού στελέχους με τα στελέχη Sabin 1 ή Sabin 2 και η απόκτηση γενωμικής δομής S3/S1 ή S3/S2 ευνοεί την ιική ανάπτυξη και πιθανόν την αναστροφή προς την νευρομολυσματικότητα. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι S3/SX ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν συχνά απομονωθεί από άτομα με VAPP. Επιπλέον, η παρουσία του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους στο 3' άκρο διπλά ανασυνδυασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών (S3/S2/S1) ευνοεί την ιική ανάπτυξη και την αναστροφή τους προς νευρομολυσματικά. Αυτό συμφωνεί με το γεγονός ότι Sabin 2 και Sabin 3 ανασυνδυασμένα στελέχη έχουν απομονωθεί συχνά από άτομα με VAPP ενώ κανένα από τα Sabin 1 στελέχη που απομονώθηκαν από άτομα με VAPP δεν βρέθηκαν ανασυνδυασμένα. Το γεγονός αυτό πιθανόν σχετίζεται με την αυξημένη αρμοστικότητα των SX/S1 ανασυνδυασμένων στελεχών έναντι των S1/SX στελεχών. Αντίθετα τα διπλά ανασυνδυασμένα στελέχη S3/S2/S3 και S1/S3/S2 εμφάνισαν

παρόμοια κινητική ανάπτυξης με τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη. Ο έλεγχος της θερμοευαισθησίας και η κινητική μελέτη των εμβολιοσυνδεόμενων στελεχών πολιοϊών (με απλούς και με διπλούς ανασυνδυασμούς) έδειξε ότι τόσο οι μεταλλάξεις όσο και ο ανασυνδυασμός μπορούν να επηρεάσουν τις φαινοτυπικές τους ιδιότητες και να οδηγήσουν στην αναστροφή προς νευρομολυσματικά στελέχη. Επιπλέον, ο ανασυνδυασμός επιτρέπει είτε την συσσώρευση αναστροφών σε θέσεις καθοριστές της εξασθένησης και της θερμοευαισθησίας σε ένα ιϊκό γένωμα είτε την εξάλειψη κάποιων καθοριστών εξασθένησης και θερμοευαισθησίας από ένα ιϊκό γένωμα.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε έλεγχος του επιπέδου ανοσίας ατόμων ηλικίας 1-40 ετών έναντι των πρότυπων εμβολιακών στελεχών (Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3) και μιας συλλογής 15 ανασυνδυασμένων και 4 μη-ανασυνδυασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών με τη μέθοδο της οροεξουδετέρωσης. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στους τίτλους των αντισωμάτων της ηλικιακής ομάδας 1-40 έναντι των εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών σε σύγκριση με τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη. Εξαιρέση αποτέλεσαν δυο Sabin 1 εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη με το πρώτο να φέρει ανασυνδυασμό τύπου S1/S3/S2 και το δεύτερο να είναι μη-ανασυνδυασμένο. Και στους τρεις οροτύπους πολιοϊών, οι υψηλότεροι τίτλοι αντισωμάτων παρατηρήθηκαν στην ηλικιακή ομάδα 1-10 ενώ ο χαμηλότερος τίτλος αντισωμάτων παρατηρήθηκε στην ηλικιακή ομάδα 21-30 έναντι των πολιοϊών οροτύπου 3. Γενικά η ορολογική κατάσταση του πληθυσμού είναι καλύτερη για τους πολιοϊούς τύπων 1 και 2 από ότι για τους πολιοϊούς τύπου 3. Η παρουσία του χαμηλότερου τίτλου αντισωμάτων στην ηλικιακή ομάδα 21-30 έναντι των πολιοϊών τύπου 3 δείχνει την αναγκαιότητα για μια ενισχυτική δόση με το μονοσθενές Sabin 3 εμβολιακό στέλεχος ώστε να διασφαλιστεί η ατομική και η συλλογική ανοσία.

Η ανάπτυξη μιας multiplex RT-PCR μεθόδου για την ταυτοποίηση των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών επιτεύχθηκε επίσης στην παρούσα διατριβή. Δύο multiplex PCR αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού S3/SX (SX: S2 ή S1) και S2/SX (SX: S3 ή S1) στις 2C και 3D, αντίστοιχα, γενωμικές περιοχές εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Έντεκα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών με ανασυνδυασμούς στις 2C ή/και 3D γενωμικές περιοχές τους χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες για την αξιολόγηση των multiplex PCR αντιδράσεων. Επιπλέον οι multiplex PCR αντιδράσεις εφαρμόστηκαν σε τρία εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών τα οποία απομονώθηκαν από το περιβάλλον, για τον έλεγχο της παρουσίας ανασυνδυασμών στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές τους. Οι multiplex PCR αντιδράσεις επιβεβαίωσαν όλους τους τύπους ανασυνδυασμού S3/SX και S2/SX στις 2C και 3D,

αντίστοιχα, περιοχές των θετικών μαρτύρων. Επιπλέον, έδειξαν την παρουσία ανασυνδυασμού τύπου S3/S2 στην 2C περιοχή σε δυο από τα περιβαλλοντικά στελέχη καθώς και την παρουσία ανασυνδυασμού τύπου S2/S1 στην 3D περιοχή ενός στελέχους. Η αλληλούχιση της 2C-3'NCR γενωμικής περιοχής των τριών περιβαλλοντικών στελεχών επιβεβαίωσε τους ανασυνδυασμούς που ταυτοποιήθηκαν μέσω των multiplex PCR αντιδράσεων και έδειξε την παρουσία ενός επιπλέον ανασυνδυασμού στην 2A, 3C ή 3D περιοχή τους. Επιπλέον ο έλεγχος της ευαισθησίας των multiplex PCR αντιδράσεων έφτασε στο επίπεδο του 1 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml. Η ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών κρίνεται σημαντική σε μια εποχή εκρίζωσης των πολιοϊών αγρίου τύπου και αντικατάστασης του OPV (Oral Poliovirus Vaccine) από το IPV εμβόλιο (Inactivated Poliovirus Vaccine).

Τέλος, επιχειρήθηκε η ανίχνευση νοροϊών, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για >90% των επιδημιών γαστρεντερίτιδας μη-βακτηριακής προέλευσης, σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Η ανίχνευση θετικών για νοροϊούς κλινικών δειγμάτων (δυο από τα 8 συνολικά δείγματα) επέτρεψε την αλληλούχιση περιοχών του γονιδιώματος τους και την μετέπειτα χρήση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης για τον σχεδιασμό νέων εκκινητικών μορίων προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Τελικά επιτεύχθηκε η αλληλούχιση μιας περιοχής η οποία περιλαμβάνει το 3' άκρο του OR1, ολόκληρο το ORF2 και το 5' άκρο του ORF3 ενός στελέχους (A6) το οποίο απομονώθηκε από τα κόπρανα ατόμου με γαστρεντερίτιδα. Επιπλέον, από τα 8 περιβαλλοντικά δείγματα που αναλύθηκαν, τρία προέκυψαν θετικά για την παρουσία νοροϊών με προέλευση τους βιολογικούς καθαρισμούς της Λάρισας, των Τρικάλων και των Ιωαννίνων. Επιπλέον, παρά την εφαρμογή όλων των εκκινητικών μορίων (νέων και ήδη υπαρχόντων από την βιβλιογραφία) τελικά επιτεύχθηκε η αλληλούχιση μιας μόνο μικρής γενωμικής περιοχής (280-700 bp) σε κάθε ένα από τα τρία περιβαλλοντικά δείγματα και στο δεύτερο θετικό κλινικό δείγμα. Ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση του κλινικού στελέχους A6. Κατασκευάστηκαν τρία φυλογενετικά δέντρα, ένα για κάθε αναγνωστικό πλαίσιο (ORF1, ORF2, ORF3) του γενώματος. Και στα τρία φυλογενετικά δέντρα το στέλεχος A6 ομαδοποιείται με στέλεχη από την GeneBank τα οποία ανήκουν στην γενετική ομάδα GI1 ενώ είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το στέλεχος A6 σχηματίζει υποομάδα με διαφορετικά στελέχη στα φυλογενετικά των ORF1 και ORF2. Συγκεκριμένα, στο δέντρο του ORF1 σχηματίζει υποομάδα με ένα στέλεχος που απομονώθηκε από την περιοχή της δυτικής Σουηδίας ενώ στο δέντρο του ORF2 σχηματίζει υποομάδα με ένα στέλεχος από την περιοχή της Ιαπωνίας. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ανασυνδυασμού στην περιοχή ένωσης μεταξύ των

ORF1 και ORF2 γεγονός που συμφωνεί με την παρατήρηση ότι οι νοροϊοί ανασυνδυάζονται σε αυτή την περιοχή. Η μικρή περιοχή αλληλούχισης των υπόλοιπων στελεχών δεν επέτρεψε την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων. Η αλληλούχιση όσο το δυνατόν περισσότερων γενωμικών περιοχών των νοροϊκών στελεχών που απομονώνονται κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να είναι εφικτές φυλογενετικές και επιδημιολογικές μελέτες.