

Uji Sensitivitas Sel Punca Mesenkimal dari Sumsum Tulang Mencit (*Mus Musculus*) Terhadap Poliovirus Tipe-1

Ariyani Noviantari, Asri Febriyani

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes, Kemenkes RI

email: ariyani_16@yahoo.com

Abstract

A diagnostic technique of Polioviruses based on WHO guidelines still utilized RD and L20B cell lines, yet has limitations regarding simultaneous use of both cell line. Previous studies showed that Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from chicken lungs and bone marrow from chicken, pig and human were prone to viral replication. Research was conducted at Stem Cell Laboratory and Polio Laboratory, Center for Biomedical and Basic Technology of Health, NIHRD, MoH, from March to October 2013. This research was a preliminary study of developing MSCs line from bone marrow of femur and tibia of mice as a cellular model for diagnosing poliovirus. Tissue Culture Infective Dose 50% (TCID₅₀) was used to measure titration of poliovirus serotype 1 performed on MSCs, RD and L20B cell line. The result showed, on day 7, CPEs was observed in RD and L20B cell, but not in mice MSCs. TCID₅₀ in 6th passage on RD cell line was $8,19 \pm 0,19$ and on L20B was $7,44 \pm 0,09$ TCID₅₀/ml. Mice MSCs were not susceptible to polioviruses since they do not have the same poliovirus receptors as humans have (hPVR, CD155). Need further testing to determine the ability of susceptibility MSC derived from primates or humans.

Keywords : *Mice mesenchymal stem cell, Susceptibility, Poliovirus*

Abstrak

Metode diagnostik Poliovirus rekomendasi WHO menggunakan sel RD dan L20B. Namun, teknik ini masih memiliki keterbatasan karena harus menggunakan 2 *cell line* secara bersamaan. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa Sel Punca Mesenkimal (SPM) dari paru-paru ayam dan sumsum tulang dari ayam, babi serta manusia memiliki potensi untuk replikasi virus. Penelitian dilakukan di Laboratorium Sel Punca dan Laboratorium Polio PBTDK dari bulan Maret – Oktober 2013 sebagai studi awal pengembangan SPM dari sumsum tulang mencit sebagai alternatif untuk diagnosis Poliovirus. Uji sensitivitas dilakukan pada 3 *cell line* (RD, L20B dan SPM mencit) terhadap Poliovirus tipe 1. Nilai 50% *Tissue Culture Infectious Disease* (TCID₅₀) diperoleh berdasarkan kerusakan sel akibat infeksi virus (*cytopathic effects* – CPE). Pada hari ketujuh, sel RD dan L20B menunjukkan CPE sedangkan SPM mencit belum menunjukkan CPE. TCID₅₀ pada sel RD adalah $8,19 \pm 0,19$ dan sel L20B adalah $7,44 \pm 0,09$ TCID₅₀/ml. SPM dari sumsum tulang mencit tidak *susceptible* terhadap Poliovirus karena tidak memiliki reseptor Poliovirus manusia (hPVR, CD155). Perlu dilakukan uji sensitivitas SPM yang bersumber dari primata atau manusia terhadap Poliovirus.

Kata Kunci : *Sel Punca Mesenkimal (SPM) mencit, Susceptibility, Poliovirus*

Pendahuluan

Metode diagnostik Poliovirus yang direkomendasikan WHO adalah dengan menggunakan *cell line*. Hal ini disebabkan karena *cell line* sensitif terhadap infeksi virus dan dapat menghasilkan CPE (*cytopathic effect*). *Cell line* yang digunakan adalah sel RD dan L20B secara bersamaan untuk meminimalisasi hasil isolasi Poliovirus yang bersifat *false-negative*.^{1,2,3,4}

Sel RD berasal dari *rhabdomyosarcoma* manusia yang lebih sensitif dan sangat rentan terhadap Poliovirus, Echovirus dan beberapa Enterovirus lainnya yang menghasilkan kerusakan sel (CPE). Sedangkan sel L20B berasal dari mencit (sel L) yang secara genetic direayasa untuk mengekspresikan reseptor virus polio manusia (CD155) yang selektif terhadap poliovirus. Kombinasi *cell line* tersebut memberikan sensitivitas dan spesifisitas tinggi dalam mendeteksi Poliovirus dengan mempertahankan kemampuan untuk mendeteksi beberapa enterovirus. Metode diagnostik ini masih memiliki keterbatasan karena harus menggunakan 2 *cell line* secara bersamaan.^{5,6}

Sel Punca Mesenkimal (SPM) merupakan *stem cell* (sel punca) dewasa yang dapat diisolasi dari darah perifer, darah tali pusat, *bone marrow* (sumsum tulang) dan jaringan lemak. Salah satu sifat sel punca adalah dapat berdiferensiasi menjadi sel lain seperti osteoblast, adiposit dan kondroblast multipoten. Faktor yang diduga dapat menyebabkan diferensiasi sel punca adalah faktor pertumbuhan dan kondisi lingkungan di sekitar sel.^{7,8,9}

SPM memiliki potensi untuk replikasi virus. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa SPM dari sumsum tulang ayam memiliki *susceptibility* yang tinggi untuk replikasi *Infectious Bursal Disease Virus* (IBDV), *very virulent Infectious Bursal Disease Virus* (vvIBDV) dan *Infectious Bronchitis Virus* (IBV).^{10,11,12} MSC dari paru-paru ayam

juga dapat diinfeksi oleh virus Avian Influenza (H1N1 dan H9N5) dan menghasilkan sel yang lisis serta memproduksi sitokin dan termokin.¹³ MSC dari sumsum tulang babi dapat diinfeksi oleh *Bovine Herpes Virus-4* (BoHV-4).¹⁴ Virus Hepatitis B, *Cytomegalovirus* (CMV) dan *Herpes Simplex Virus type-1* (HSV-1) juga dapat bereplikasi pada MSC dari sumsum tulang manusia.^{15,16}

Karena kemampuan MSC dalam replikasi virus tersebut, maka penelitian ini merupakan studi awal bagi pengembangan Sel Punca Mesenkimal (SPM) mencit sebagai alternatif diagnostik untuk deteksi Poliovirus

Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Sel Punca dan Laboratorium Polio Nasional, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kemenkes RI pada bulan Maret - Oktober 2013.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mencit strain Swiss Webster berumur 6-7 minggu dengan berat badan 25-30 g yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba, PBTDK, Badan Litbangkes, sel RD dan sel L20B dari PT. Biofarma, Bandung yang dikirim dari *Centers for Disease Control* (CDC), NaCl fisiologis, *Phosphate Buffered Saline* (PBS; Gibco), *Dulbecco Modified Eagle Medium High Glucose* (DMEM HG; Sigma), *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM; Sigma), FBS (*Fetal Bovine Serum*; Sigma) dan Penstrep 10.000 unit/ml (Sigma), Trypsin EDTA (Sigma), alkohol 70% dan isolat Poliovirus yaitu Sabin Poliovirus *Reference Strains* yang merupakan standar *in house reference* Laboratorium Polio yang didapatkan dari *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) yaitu : Sabin 1 NIBSC Reference Number 01/528.

Peralatan yang digunakan antara lain *surgical blade*, pinset, petridish, flask TC 25cm² (Nunclon), pipet serologis 1 mL dan 10 mL, *syringe* 1 mL, pintip 100 µL(ART), well96-plate (Nunclon), *filter unit*, *syringe filter*, *Reagent Reservoir* 50 mL (Corning), masker tali, dan sarung tangan *Vinyl non Powder*.

Mencit strain Swiss Webster berumur 6-7 minggu dikorbkan nyawanya terlebih dahulu dengan *cervical dislocation* yang telah mendapatkan persetujuan etik penelitian dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan dengan No.LB.02.01/5.2/KE.067/2013. Kemudian mencit dibedah dan diambil femur dan tibianya, dimasukkan dalam *tube* yang berisi medium transport (NaCl fisiologis) dan dibawa ke Laboratorium Sel Punca PBTDK.

Femur dan tibia kemudian direndam dalam alkohol 70% selama dua menit sambil membersihkan lemak yang melekat kemudian direndam dalam PBS. *Flushing* dilakukan dari lubang atas sumsum dengan menggunakan *syringe* 1 ml berisi medium DMEM HG yang mengandung FBS 20% dan Penstrep ditambah dengan *Conditioned Medium* (CM) sel RD dan sel L20B dengan perbandingan 1:1. Ujung *syringe* ditahan di bagian atas lubang sumsum agar bagian sumsum dapat terbilas sebanyak mungkin.

Tetes *flushing* yang keluar dari lubang bawah sumsum dimasukkan dalam flask. Kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan 5% CO₂ dan 37°C sampai membentuk monolayer dengan 90% konfluen. SPM memiliki kemampuan melekat lebih cepat dari sel-sel lainnya. Oleh sebab itu, setelah dikultur 24 jam, dilakukan penggantian medium untuk membuang sel-sel yang tidak melekat. Setiap 2-3 hari sekali dilakukan penggantian medium untuk mencukupi nutrisi pada kultur sampai sel monolayer. Pasase dilakukan dengan mendisosiasi SPM yang sudah mono layer

menggunakan trypsin EDTA 0,05% selama 2-5 menit. Kemudian tambahkan medium yang telah mengandung 20% FBS untuk menghentikan tripsinasi. Lakukan tirturasi untuk menghomogenkan suspense sel. Jumlah SPM dihitung menggunakan hemositometer *Improved Neubauer*.

Uji Sensitivitas Poliovirus pada MSC

Berdasarkan WHO (2004) dan Mohammed (2012), cara kerja uji sensitivitas Poliovirus untuk MSC adalah dengan menghitung TCID₅₀ yang dideskripsikan oleh Reed dan Muench (1938).^{1,11} 10 seri pengenceran Poliovirus disiapkan dalam dari 10⁻¹ to 10⁻¹⁰. Siapkan suspensi sel RD, sel L20B dan SPM mencit dengan jumlah 1,5 x 10⁵. Kemudian masukkan 100 µl suspensi sel ke dalam 96-well-plate, tambahkan 100 µl pengenceran virus pada masing-masing well dengan kontrol negatif adalah well yang tidak ditambahkan virus. Plate diinkubasi pada suhu 37°C, diamati selama 5-7 hari dan dihitung jumlah well yang positif CPE berdasarkan masing-masing pengenceran serta sensitivitas sel dihitung berdasarkan formula Karber:

$$\text{Log TCID}_{50} = L - d (E - 0.5)$$

Keterangan :

L: Pengenceran terendah yang digunakan

d: Perbedaan log pengenceran (1)

E:Jumlah CPE Positif

Pembahasan

Isolasi, Kultur *In Vitro* dan Pasase MSC dari Sumsum Tulang Mencit

SPM yang diisolasi dari sumsum tulang mencit dengan metode *flushing* memperlihatkan sel yang berbentuk bulat, terlihat menyebar, masih heterogen dan terdapat eritrosit. Pada hari ketiga terlihat kultur primer SPM mencit berbentuk *spindel* seperti sel fibroblas dan masih

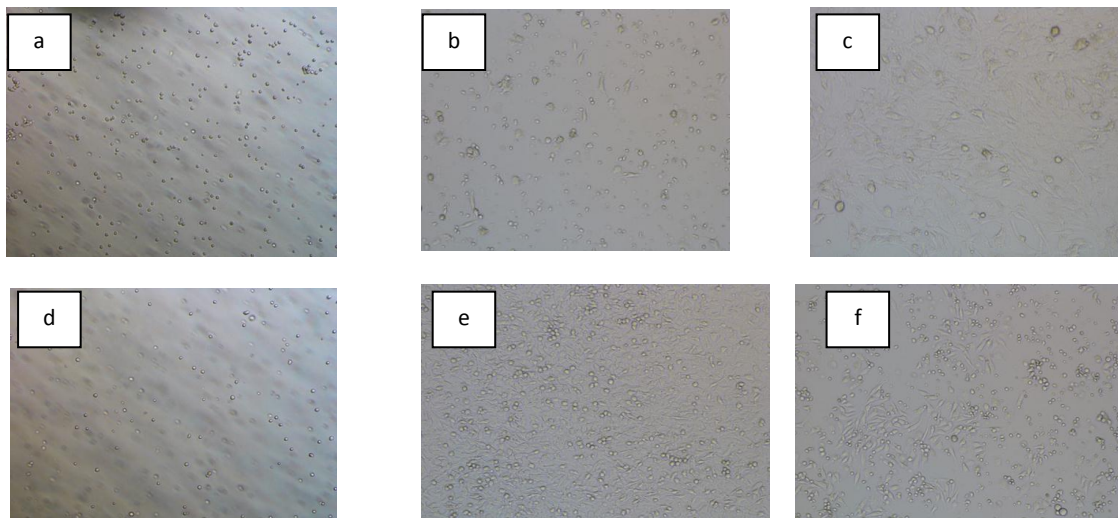
heterogen. Namun setelah hari ke-7, SPM mencit mencapai monolayer dan konfluen 70-90% (Gambar 1).

Uji Sensitivitas sel RD, L20B dan MSC terhadap Poliovirus

Pada uji sensitivitas sel terhadap Poliovirus tipe 1, sel RD menggunakan pengenceran Poliovirus -7,-8,-9 dan -10 dan sel L20B menggunakan pengenceran Poliovirus dari -6,-7,-8 dan -9. Pada SPM, pengenceran Poliovirus yang digunakan adalah -1,-2,-3 dan -4 karena pada optimasi uji sensitivitas sebelumnya, dengan pengenceran virus yang sama dengan sel RD dan sel L20B SPM belum menunjukkan CPE.

Setelah inkubasi sampai hari ketujuh, ternyata SPM mencit juga tidak

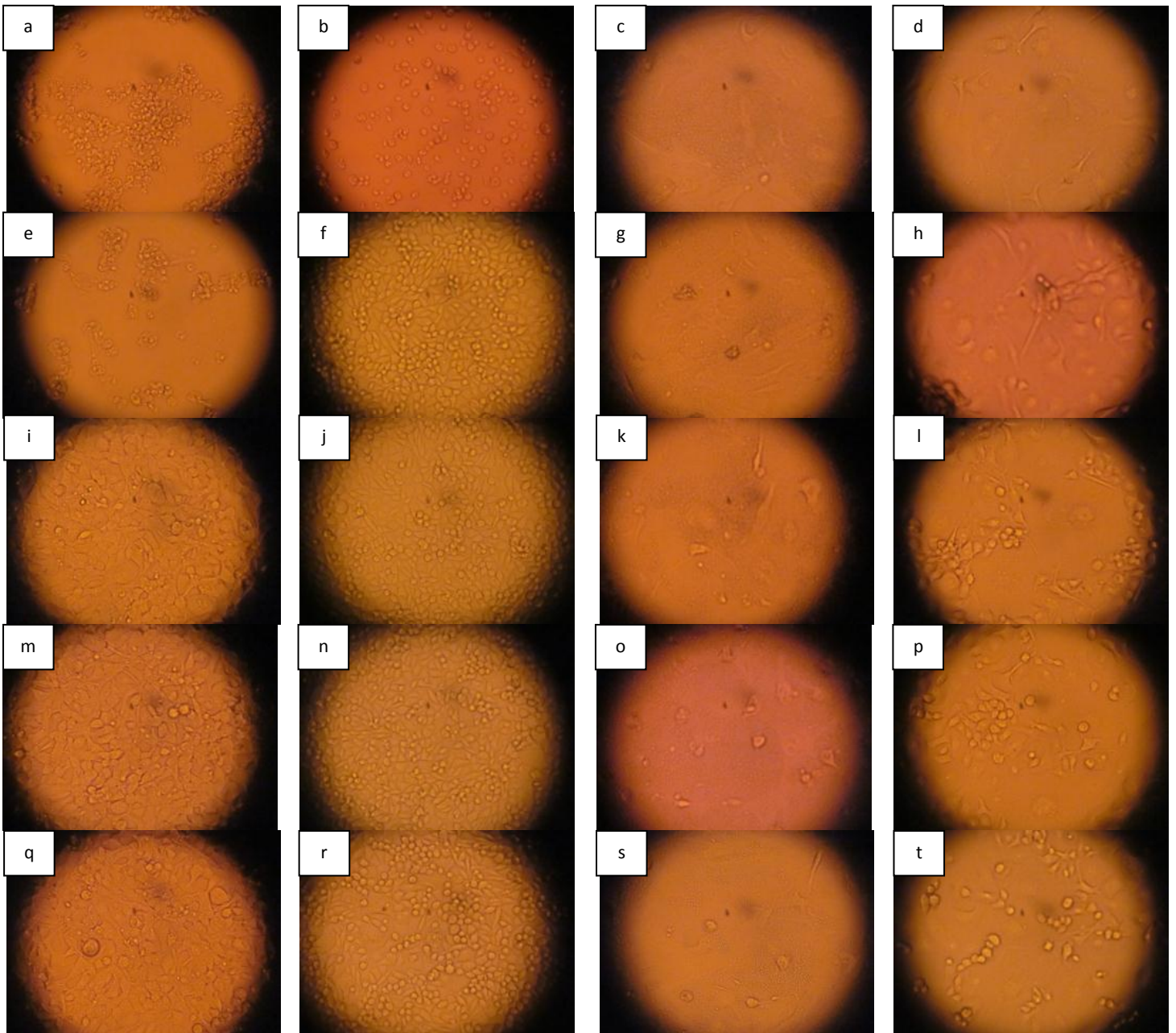
menunjukkan *cytophatic effect* (CPE). Sedangkan pada sel RD dan sel L20B yang menjadi *golden standard* dalam uji sensitivitas terhadap Poliovirus, memperlihatkan adanya CPE dan dapat dihitung 50% *Tissue Culture Infective Dose* (TCID₅₀) (Gambar 2). Standar titer Poliovirus tipe I terhadap sel RD dan sel L20B di Laboratorium Polio, PBTDK adalah $8,53 \pm 0,5$ untuk sel RD dan $7,52 \pm 0,5$ untuk sel L20B. Nilai rata-rata TCID₅₀ sel RD terhadap Poliovirus tipe I pada penelitian ini adalah $8,19 \pm 0,19$ sedangkan untuk sel L20B adalah $7,44 \pm 0,09$ (Gambar 3). Kisaran titer tersebut menunjukkan bahwa sel RD dan sel L20B yang dipakai di Laboratorium Polio masih sensitif terhadap Poliovirus.



Keterangan :

- a,b,c : SPM mencit dengan medium DMEM HG ditambah *Conditioned Medium* (CM) sel RD hari ke-0, 3 dan 7
- d,e,f : SPM mencit dengan medium DMEM HG ditambah *Conditioned Medium* (CM) sel L20B hari ke-0, 3 dan 7

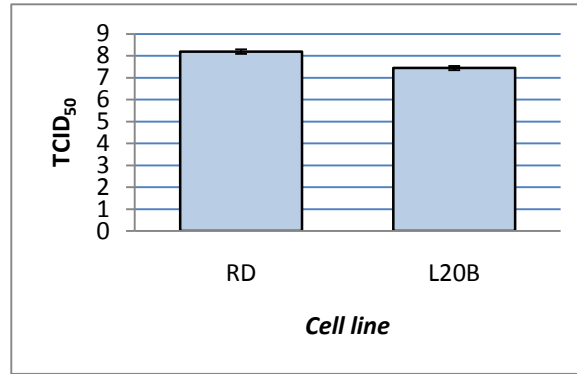
Gambar 1. Morfologi SPM Hasil Isolasi dari Sumsum Tulang Mencit (Perbesaran 100x)



Keterangan :

- a,e,i,m Sel RD dengan Poliovirus tipe I (PV1) pengenceran -7, -8, -9, -10
- b,f,j,n Sel L20B dengan Poliovirus tipe I (PV1) pengenceran -6, -7, -8, -9
- c,g,k,o SPM dalam medium DMEM HG-CM RD dengan Poliovirus tipe I (PV1) pengenceran -1, -2, -3, -4
- d,h,l,p SPM dalam medium DMEM HG-CM L20B dengan Poliovirus tipe I (PV1) pengenceran -1, -2, -3, -4
- q,r,s,t Sel RD, L20B dan SPM kontrol tanpa Poliovirus

Gambar 2. Morfologis RD, Sel L20B dan SPM Mencit pada Hari Ketujuh Setelah Uji Sensitivitas Terhadap Poliovirus Tipe I (Perbesaran 100x)



Gambar 3. Nilai TCID₅₀ Sel RD dan L20B Terhadap *Poliovirus Tipe-1*

Isolasi, Kultur *In Vitro* dan Pasase SPM dari Sumsum Tulang Mencit

Pada isolasi SPM dari sumsum tulang mencit terlihat bahwa pada hari pertama kultur, SPM masih heterogen dengan eritrosit. Setelah sel dicuci dengan PBS dan diganti mediumnya, eritrosit akan terbang karena sel tersebut tidak menempel pada dasar flask/well/dish. Kemudian SPM yang sudah *attach* melakukan proliferasi sehingga pada hari ke-7, SPM sudah terlihat monolayer dan konfluen. Morfologi SPM yang terlihat adalah *fibroblast-like*.

Penggunaan *conditioned medium* (CM) sel RD dan sel L20B adalah agar hasil sekresi yang dihasilkan oleh sel RD dan sel L20B berupa faktor-faktor pertumbuhan (*growth factor*) dapat mempengaruhi pertumbuhan SPM mencit sehingga memiliki sifat seperti sel-sel tersebut. Beberapa peneliti mengemukakan bahwa CM mengandung sejumlah faktor yang dapat menginduksi diferensiasi *Embryonic Stem Cell* (ESC). Menurut Bentz (2006) dan Levenstein (2006), CM dari mencit dan fibroblas fetus manusia mensekresikan faktor pertumbuhan seperti FGF1/bFGF/IGF2 (*Fibroblast Growth Factor*), *Insulin like Growth Factor* (IGF1) dan *Transforming Growth Factor β1* (TGF-β1). Faktor-faktor pertumbuhan

tersebut berperan dalam pluripotensi, pertumbuhan dan diferensiasi ESC.^{17,18}

Uji Sensitivitas sel RD, L20B dan SPM mencit terhadap Poliovirus

Penelitian ini merupakan studi awal bagi pengembangan SPM mencit sebagai alternatif diagnostik Poliovirus. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa setelah hari ketujuh, CPE tidak terbentuk pada SPM mencit. Hal ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa SPM yang berasal dari sumsum tulang ayam, sumsum tulang babi, paru-paru ayam dan sumsum tulang manusia dapat digunakan untuk replikasi beberapa jenis virus antara lain *Infectious Bronchitis Virus* (IBV), *very virulent Infectious Bronchitis Virus* (vvIBDV), virus Hepatitis B, virus avian influenza H1N1, H9N5, Cytomegalovirus (CMV) dan virus Herpes Simplex tipe 1 (HSV-1).¹⁰⁻¹⁶

CPE Poliovirus terbentuk pada sel RD dan sel L20B karena sel RD merupakan *cell line* dari sel *Rhabdomyosarcoma* manusia yang sensitif terhadap Poliovirus dan Enterovirus lain, sedangkan sel L20B merupakan *cell line* dari *transgenic mouse* yang mengekspresikan reseptor Poliovirus manusia pada permukaannya (CD155). Ekspresi reseptor pada permukaan sel menyebabkan sel L20B *susceptible*

terhadap infeksi Poliovirus. Selanjutnya karena reseptor CD155 tidak dimiliki enterovirus lain, sehingga membuat sel L20B memiliki spesifitas yang tinggi untuk isolasi Poliovirus.¹⁹

Menurut Jesus (2007), mekanisme poliovirus masuk ke dalam sel diawali dengan pengikatan virus terhadap protein membran plasma spesifik yaitu reseptor poliovirus (PVR; CD155) yang merupakan anggota superfamili imunoglobulin protein. Pengikatan pada reseptor memicu perubahan konformasi pada struktur kapsid kemudian virion akan masuk melalui endositosis dan viral RNA terlepas ke sitoplasma (*uncoating*) sehingga viral RNA virus dapat terekspresikan dan terfungisikan. Selanjutnya viral RNA mengikat ribosom dan terjadi translasi viral RNA, lalu terjadi replikasi viral RNA dan terbentuklah partikel-partikel virus baru dan akhirnya keluar dari sel (*release*).^{20,21}

Tidak adanya CPE pada SPM dari sumsum tulang mencit disebabkan Poliovirus tidak dapat masuk ke dalam membran sel punca mesenkimal mencit karena mencit tidak memiliki *human Poliovirus Reseptor* (hPVR). Menurut Blondel (1998) dan Jesus (2007), hPVR atau CD155 merupakan reseptor pada permukaan sel yang dapat mengenali Poliovirus dan hanya ditemukan pada sel primata.^{20,21} Karena ketiadaan *human Poliovirus Reseptor* inilah yang menyebabkan Poliovirus tidak dapat tumbuh dan bereplikasi pada SPM yang bersumber dari sumsum tulang mencit.

Ketiadaan reseptor Poliovirus yang menyebabkan SPM mencit tidak dapat diinfeksi Poliovirus ini sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan Sundin (2006). Menurut Sundin (2006), SPM dari sumsum tulang manusia dapat diinfeksi oleh Cytomegalovirus (CMV) dan virus Herpes Simplex type 1 (HSV-1) tapi tidak dapat diinfeksi virus Epstein-Barr (EBV). Hal tersebut disebabkan SPM dari sumsum tulang manusia menunjukkan ekspresi

CD13 (penanda molekul HPV dan reseptor CMV) serta hanya sedikit populasi MSC yang mengekspresikan CD21 (penanda molekul sebagai mediasi *uptake* EBV) sehingga SPM dari sumsum tulang manusia *susceptible* terhadap CMV dan HSV-1 tapi tidak *susceptible* terhadap Virus Epstein-Barr (EBV).¹⁶

Kesimpulan

Pada uji sensitivitas SPM mencit terhadap Poliovirus sampai hari ke-7, sel belum menunjukkan CPE sehingga tidak bisa dihitung nilai TCID₅₀ sehingga SPM dari sumsum tulang mencit tidak *susceptible* untuk pertumbuhan poliovirus.

Saran

Perlu dilakukan uji sensitivitas Poliovirus terhadap SPM yang bersumber dari primata atau manusia.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Dr. dr. Trihono, sebagai Kepala Badan Litbangkes, Prof. Dr. Emiliana Tjitra dan Dr. Vivi Lisdawati sebagai pembina penelitian Risbinkes 2013, tim teknis dan sekretariat Risbinkes 2013 atas pemberian dana penelitian, masukan dan saran selama penelitian. Terimakasih kami ucapkan juga kepada teman-teman di Laboratorium Sel Punca, Laboratorium Polio dan Laboratorium Hewan Coba, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Ratih Rinendyaputri, M.Bio-med, Rulina Novianti S.Si, dr. Frans Dany, Nike Susanti, S.Si dan Anggy Arris Faisal yang telah memberikan saran dan membantu berjalannya penelitian.

Daftar Rujukan

1. World Health Organization. Polio laboratory manual. 4th ed. Geneva: World Health Organization;2004.
2. Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL. Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988;26(12):2576-80.

3. Dias APM, Tavares FN, Costa EV, daSilva EE. Evaluation of a protocol for rapid diagnosis of enteroviruses associated with acute flaccid paralysis cases. *Journal of Clinical Virology*. 2009;46:337-40.
4. Shoja ZO, Tabatabai H, Sarijloo M, Shahmahmoodi S, Azad TM, Nategh R. Detection of enteroviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in cell culture negative stool specimens of patients with acute flaccid paralysis. *Journal of Virological Methods*. 2007;142:95-97.
5. Kargar M, Sadeghipour S, Mahmoudabadi BZ, Nategh R. Comparison of integrated cell culture – RT PCR & cell culture methods. *Iranian J Publ Health*. 2009;38(3):90-6.
6. Johnston SLG & Siegel CS. Presumptive identification of enteroviruses with rd, hep-2, and rmk cell lines. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1990;28(5):1049-50.
7. Saputra V. Dasar-dasar stem cell dan potensi/aplikasinya dalam ilmu kedokteran. *CDK*. 2006;153(Stem Cell):21-5.
8. Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. Use and application of stem cells in toxicology. *Proceeding the 42nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Salt Lake City, Utah, March 2003. Toxicol. Sci.* 2004; 79(2): 214-23.
9. Halim D, Murti H, Sandra F, Boediono A, Djuwantono T, Setiawan B. *Stem cell – dasar teori & aplikasi klinis*. Jakarta : Penerbit Erlangga. 2010:33-5
10. Khatri M, Sharma JM. Susceptibility of chicken mesenchymal stem cells to infectious bursal disease virus (Short Communication). *Journal of Virological Methods*. 2009;160:197–9.
11. Mohammed MH, Hair-Bejo M, Omar AR, Aini I. Replication of very virulent infectious bursal disease virus in the chicken mesenchymal stem cells. *Journal of Advanced Medical Research*. 2012;2:1-7.
12. Mohammed MH, Hair-Bejo M, Omar AR, Hasoon MF, Alazawy A, Abdul Ahad EA, Aini I. Replication of infectious bronchitis virus in the chicken mesenchymal stem cells. *J. World's Poult. Res.* 2012;2(2):33-6.
13. Khatri M, O'Brien TD, Goyal SM, Sharma JM. Isolation and characterization of chicken lung mesenchymal stromal cells and their susceptibility to avian influenza virus. *Developmental and Comparative Immunology*. 2010;34:474-9.
14. Donofrio G, Colleoni S, Galli C, Lazzari G, Cavirani S, Flammini CF. Susceptibility of bovine mesenchymal stem cells to bovine herpesvirus 4. *Journal of Virological Methods*. 2005;127:168–70.
15. Ma, R, Xing Q, Shao L, Wang D, Hao Q, Li X, *et al.* Hepatitis B virus infection and replication in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Virology Journal*. 2011;8:1-8.
16. Sundin M, Orvell C, Rasmusson I, Sundberg B, Ringde'n O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone Marrow Transplantation*. 2006;37:1051–9.
17. Bentz K, Molcanyi M, Heß S, Schneider A, Hescheler J, Neugebauer E, Schaefer U. Neural differentiation of embryonic stem cells is induced by signalling from non-neural niche cells. *Cell Physiol Biochem* 2006;18:275-86.
18. Levenstein ME, Ludwig TE, Xu R, Llanas RA, Vandenheuvel-Kramer K, Manning D, Thomson JA. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stemcells*. 2006;24:568–74.
19. Perez LS, Lago PM, Puentes RP, Diaz LM, Quintana MF, Aguirre SR. Evidence for nonpoliovirus enterovirus multiplication in L20B cells. *Rev Cubana Med Trop*. 2007;59(2).
20. Blondel B, G Duncan, T Couderc, F Delpyroux, N Pavio, FC Garapin. Molecular aspect of Poliovirus Biology with a special focus on the interaction with nerve cells. *Journal of NeuroVirology*. 1998;4:1-26.
21. Jesus NHD. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virology Journal*. 2007;4:70.