

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ- ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

Όνοματεπώνυμο Μεταπτυχιακού Φοιτητή

Ωρολογά Χρυσαιγή

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**Ανίχνευση Νοροϊών σε πόσιμο νερό. Είναι απαραίτητη η αναζήτηση
ιών στον μικροβιολογικό έλεγχο του νερού;**



ΛΑΡΙΣΑ 2010

**Ανίχνευση Νοροϊών σε πόσιμο νερό. Είναι απαραίτητη η αναζήτηση
ιών στον μικροβιολογικό έλεγχο του νερού;**

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Καθηγητής, Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Κομιώτης Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση
Βιοδραστικών Μορίων
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μόσιαλος Δημήτριος

Λέκτορας, Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>Τίτλος</u>	<u>Σελίδα</u>
Περίληψη.....	6
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Ποιότητα πόσιμου Νερού.....	7
1.2 Εισαγωγή στους ιούς.....	9
1.3 Ιοί εντερικής προέλευσης στο υδάτινο περιβάλλον.....	10
1.4 Ιοί Noro.....	12
1.5 Ίική Δομή νοροϊών.....	15
1.6 Ίικές πρωτεΐνες.....	18
1.7 Αντιγραφή του RNA των νοροϊών.....	19
1.8 Ταξινόμηση Νοροϊών.....	20
1.9 Επιδημιολογία των Νοροϊών.....	22
1.10 Κλινική εικόνα που προκαλούν οι Νοροϊοί.....	25
1.11 Σκοπός της εργασίας.....	26
2. Υλικά & Μέθοδοι.....	27
2.1 Δειγματοληψία.....	27
2.2 Μέθοδος Προσρόφησης έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα.....	28
2.3 Εκχύλιση RNA.....	29
2.4 Αντίστροφη μεταγραφή.....	30
2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	31
2.6 Semಿನested-Autonested PCR.....	34
2.7 Ηλεκτροφόρηση.....	35

Τίτλος	Σελίδα
2.8 Κλωνοποίηση.....	36
2.8.1 Καθαρισμός PCR προϊόντων.....	36
2.8.2 Autonested GoTaq PCR.....	36
2.8.3 Αντίδραση της Λιγάσης.....	37
2.8.4 Παραγωγή Δεκτικών Κυττάρων με χλωριούχο ασβέστιο (CaCl ₂).....	38
2.8.5 Μετασχηματισμός Δεκτικών κυττάρων.....	39
2.8.6 Πέψη με EcoRI.....	41
2.8.7 Αλληλούχιση κλωνοποιημένων προϊόντων.....	41
2.8.8 Αναζήτηση Ομόλογης Αλληλουχίας.....	41
2.8.9 Κατασκευή Φυλογενετικών Δέντρων.....	42
3. Αποτελέσματα.....	43
3.1 Αποτελέσματα Autonested- Semಿನested PCR.....	43
3.2 Αποτελέσματα GoTaq PCR.....	45
3.3 Αποτελέσματα Μοριακής Κλωνοποίησης- Αλληλούχισης.....	46
4.Συζήτηση.....	49
5.Βιβλιογραφία.....	57

Περίληψη

Οι νοροϊοί είναι ιοί RNA που ανήκουν στην οικογένεια των Caliciviridae και προκαλούν το 90% των κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας παγκοσμίως. Δεδομένου ότι οι άνθρωποι αποτελούν την κύρια πηγή των ιών που εντοπίζονται σε τρόφιμα, η μετάδοσή τους γίνεται μέσω αυτών.

Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των στελεχών των νοροϊών πραγματοποιείται με τη χρήση μοριακών τεχνικών συμπεριλαμβανομένης της εύρεσης της αλληλουχίας του RNA.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δέκα δείγματα πόσιμου νερού που προήρχοντο από γεωτρήσεις σε διαφορετικούς δήμους του Νομού Λάρισας. Για την ανίχνευση των Νοροϊών χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μέθοδοι: RT PCR, PCR, autonested PCR και Semಿನested PCR. Για τη συγκέντρωση του δείγματος από την ποσότητα νερού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσρόφησης και έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα. Μετά την ανίχνευση των ιών επετεύχθη η κλωνοποίηση και η αλληλούχιση της γενωμικής περιοχής ORF1 ενός στελέχους νοροϊού.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ποιότητα Πόσιμου νερού

Το νερό είναι βασικό και απαραίτητο στοιχείο για τη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη μας. Ποσοστό περίπου 0,5% από την ολική ποσότητά του στη φύση προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση. Τόσο το υπόγειο όσο και το επιφανειακό νερό (λίμνες, ποτάμια) χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση.

Με τον όρο «νερό ανθρώπινης κατανάλωσης» εννοούμε:

1. Νερό που προορίζεται για πόση, μαγείρεμα, προπαρασκευή τροφής ή άλλες οικιακές χρήσεις, είτε στη φυσική του κατάσταση είτε μετά από επεξεργασία, ανεξάρτητα από την προέλευση του και το αν παρέχεται από δίκτυο διανομής, από γεώτρηση, από βυτίο ή σε φιάλες.
2. Το νερό που χρησιμοποιείται στις επιχειρήσεις παραγωγής τροφίμων για την παρασκευή, επεξεργασία, συντήρηση ή εμπορία προϊόντων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

Πρέπει δε, να είναι από κάθε άποψη αβλαβές για την υγεία των ανθρώπων, οργανοληπτικά άμεμπτο και απολύτως καθαρό, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς και οποιεσδήποτε ουσίες σε αριθμούς και συγκεντρώσεις που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.

Το νερό κατά τον υδρολογικό του κύκλο στο φυσικό του περιβάλλον έρχεται σε επαφή και εμπλουτίζεται με διάφορες διαλυμένες ή αιωρούμενες ουσίες. Παράλληλα, μέσω των λυμάτων, αποβλήτων κ.λ.π. μεταφέρονται στα υπόγεια και επιφανειακά νερά ρυπαντικές ουσίες (στερεά, οργανικά και ανόργανα άλατα, παθογόνα μικρόβια, βαρέα μέταλλα και άλλες τοξικές ουσίες).

Το νερό, για να είναι πόσιμο, πρέπει τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά να κυμαίνονται μεταξύ ορισμένων αποδεκτών ορίων που αποτελούν τα πρότυπα ποιότητας και θεσπίζονται Νομοθετικά.

Τα πρότυπα ποιότητας στην Ελλάδα καθορίζονται από την Κοινή Υπουργική Απόφαση Υ2/2600/2001 σε συμμόρφωση προς την οδηγία 98/83 Ε.Ε.

Η υγιεινή του νερού καθορίζεται με αναφορά σε προδιαγεγραμμένες συγκεντρώσεις ή τιμές ή άλλες απαιτήσεις ειδικές για μικροβιολογικές, χημικές και φυσικές παραμέτρους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Μικροβιολογικές Παράμετροι Πόσιμου νερού σε φιάλες

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΤΙΜΗ
E.coli	0/250ml
Εντερόκοκκοι	0/250ml
Ps. Aeroginosa	0/250ml
Κοινοί μεσόφιλοι 22° C	100/ml
Κοινοί μεσόφιλοι 37° C	20/ml

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Μερικές Χημικές Παράμετροι Πόσιμου νερού

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΤΙΜΗ
Νάτριο	200mg/l
Σίδηρος	200μg/l
Μαγγάνιο	50μg/l
Θειικά άλατα	250μg/l
Αμμώνιο	0.50Mg/l

Στις ανεπτυγμένες χώρες το πόσιμο νερό υποβάλλεται σε κατάλληλη επεξεργασία ώστε να είναι ασφαλές. Παρ' όλα αυτά όμως βλάβη ή παράλειψη στο δίκτυο ύδρευσης ή ανεπαρκής απολύμανση μπορεί να οδηγήσουν σε

μόλυνση του νερού με παθογόνους μικροοργανισμούς και εμφάνιση επιδημιών.

Εάν η επεξεργασία του νερού είναι ανεπαρκής ή ελλιπής, οι μικροοργανισμοί περνούν ελεύθερα στο νερό του καταναλωτή. Ο εντερικός σωλήνας του ανθρώπου, αλλά και των ζώων, είναι η κύρια πηγή για τα περισσότερα βακτήρια, ιούς και πρωτόζωα που μεταφέρονται με το νερό στον άνθρωπο.

1.2 Εισαγωγή στους ιούς

Ο ανθρώπινος γαστρεντερικός σωλήνας φιλοξενεί διάφορους τύπους ιών που μέσω των κοπράνων μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση στο υδάτινο περιβάλλον. Ιοί στο νερό απελευθερώνονται και από όλα τα θερμόαιμα ζώα καθώς και από τα ψάρια. Η ικανότητα επιβίωσής τους στο νερό είναι μεγαλύτερη από αυτή των βακτηρίων (Wheeler D., 1990), καθώς μπορούν να επιβιώσουν σε αυτό από εβδομάδες έως μήνες. Από όλους τους ιούς, ιδιαίτερη σημασία για την Δημόσια Υγεία έχουν οι ιοί εντερικής προέλευσης. Πολλές μελέτες έχουν καθιερώσει τη σημασία των ιών Νορο ως αιτία τροφιμογενών και υδατογενών επιδημιών.

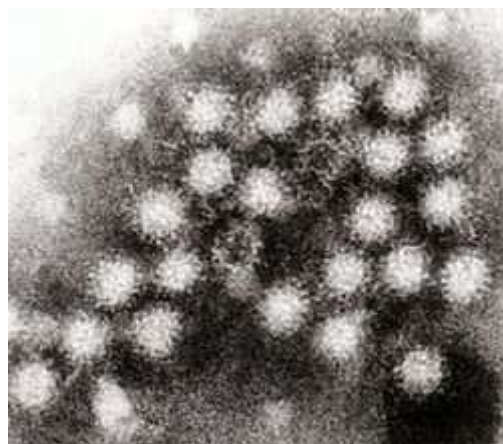
Πολυάριθμοι ιοί μπορούν να βρεθούν στο ανθρώπινο έντερο αλλά μόνο ορισμένοι από αυτούς αναγνωρίζονται συνήθως ως τροφιμογενείς παθογόνοι. Ανάλογα με τον τύπο της ασθένειας που προκαλούν οι παθογόνοι ιοί που μεταδίδονται με τα τρόφιμα ή με το πόσιμο νερό, ταξινομούνται σε τρεις ομάδες, εκ των οποίων οι δυο πρώτες είναι οι πιο κοινές:

- 1) Ιοί που προκαλούν γαστρεντερίτιδα (π.χ. Νορο ιοί)
- 2) Ιοί της ηπατίτιδας
- 3) Ιοί που πολλαπλασιάζονται στο ανθρώπινο έντερο αλλά προκαλούν ασθένεια κατά τη μετανάστευσή τους σε άλλα όργανα, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα (π.χ. Polio ιοί)

Δεδομένου ότι οι άνθρωποι είναι η κύρια πηγή των ιών που εντοπίζονται στα τρόφιμα, η μετάδοσή τους γίνεται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων και νερού, ή από άτομο σε άτομο μέσω σωματικής επαφής ή απελευθέρωσης σταγονιδίων στον αέρα. Σε γενικές γραμμές μόνο μερικά μόρια των ιών που εντοπίζονται στα τρόφιμα απαιτούνται για να προκληθεί ασθένεια, ενώ μεγάλος αριθμός ιικών σωματιδίων απομακρύνονται από τα άτομα που έχουν μολυνθεί είτε με τα κόπρανα είτε με έμετο. Αυτοί οι ιοί είναι αρκετά σταθεροί και ανθεκτικοί έξω από τον ξενιστή, αλλά δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν στα τρόφιμα και στο νερό. Επιπλέον υπάρχει μικρός αριθμός μεθόδων για την ανίχνευσή τους στα τρόφιμα και στο νερό (Seymour and Appleton, 2001). Μετά την είσοδό τους στο ανθρώπινο σώμα, οι ιοί μολύνουν τα κύτταρα του γαστρεντερικού συστήματος ή του ήπατος όπου και πολλαπλασιάζονται (Melnick J.L., 1984).

1.3 Ιοί εντερικής προέλευσης στο υδάτινο περιβάλλον

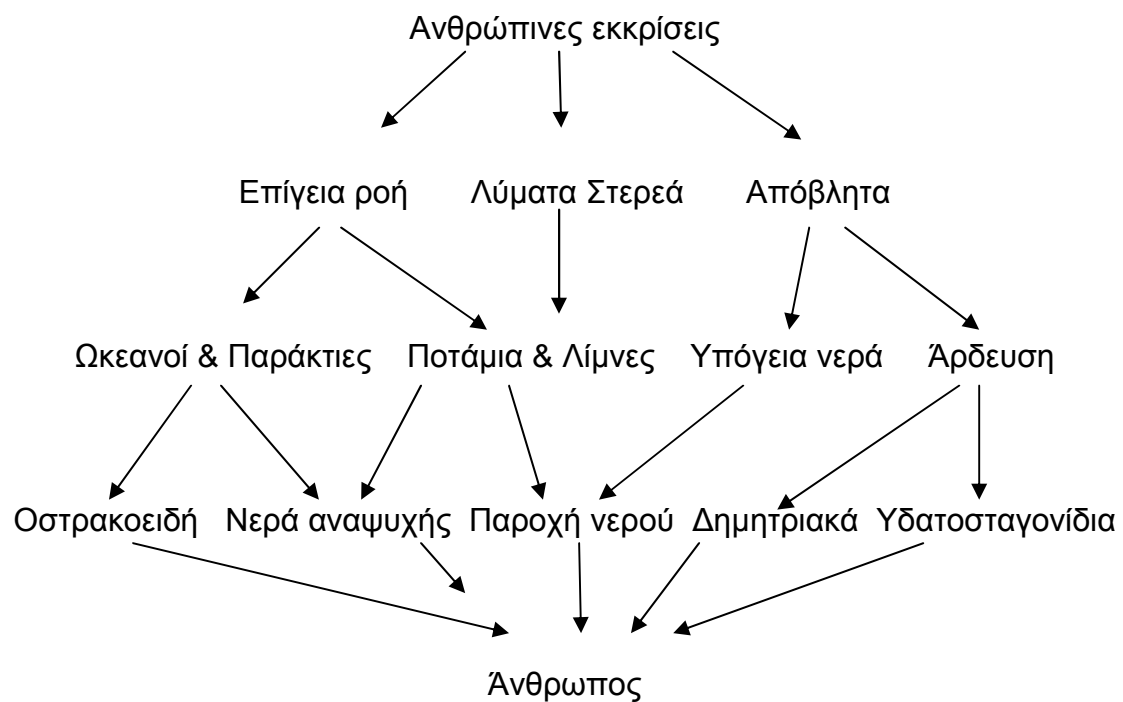
Μεγάλος αριθμός εντερικών μικροοργανισμών μπορούν να εισέλθουν στο υδάτινο περιβάλλον μέσω των κοπράνων των μολυσμένων ατόμων. Όταν μεγάλη ποσότητα λυμάτων μολυσμένων με εντερικούς μικροοργανισμούς αναμιγνύεται με νερό που με ανεπαρκή ή μηδαμινή επεξεργασία καταλήγει στη θάλασσα ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πόσιμο νερό, τότε είναι πιθανό να προκληθεί υδατογενής επιδημία (Gerba et al, 1975).



Εικόνα 1: Ηλεκτρονική μικροσκόπηση σωματιδίων Norovirus στα κόπρανα

Πάνω από 100 διαφορετικοί ιοί που περιέχονται στα ανθρώπινα κόπρανα και ούρα περνούν στα λύματα και τελικά στο υδάτινο περιβάλλον. Σε 1γρ κοπράνων ενός μολυσμένου ατόμου μπορεί να περιέχονται πάνω από 10^6 ιικά σωματίδια. Στα λύματα η συγκέντρωσή τους μπορεί να είναι έως και 10^5 μολυσματικοί ιοί/ λίτρο. Συχνά οι ιοί δεν απενεργοποιούνται εντελώς και δεν απομακρύνονται από τα λύματα στις μονάδες βιολογικού καθαρισμού. Κατά συνέπεια οι μολυσματικοί ιοί καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον (θαλάσσια ύδατα, πόσιμα ύδατα, υπόγεια και επιφανειακά ύδατα) (IAWPCR, 1983).

Η πιο συχνά μελετημένη ομάδα ιών εντερικής προέλευσης που μπορούν να ανιχνευθούν στο υδάτινο περιβάλλον είναι οι πικορναϊοί. Ο ιός της Ηπατίτιδας Α επίσης έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί συχνή αιτία για υδατογενείς λοιμώξεις. Επιπρόσθετα, οι αδενοϊοί που υπάρχουν στα κόπρανα και έχουν ανιχνευθεί στα οικιακά λύματα, έχουν ενοχοποιηθεί για περιπτώσεις οξείας γαστρεντερίτιδας στα παιδιά. Τα υπόγεια ύδατα μπορούν επίσης να μολυνθούν με ιούς, παρότι υπάρχει το εμπόδιο της παρεμβολής του εδαφικού στρώματος (Bitton et al, 1987).



Σχήμα 1: Πορεία ιών εντερικής προέλευσης στο υδάτινο οικοσύστημα (Bosch et al, 1998).

Η πυκνότητα των ιών εντερικής προέλευσης που μπορεί να απομονωθεί από τα επιφανειακά νερά ποικίλει εποχιακά, εξαρτώμενη από τον όγκο των λυμάτων που εισέρχονται σε αυτά και από το τοπικό κλίμα. Οι συγκεντρώσεις των ιών που έχουν απομονωθεί κατά καιρούς ποικίλουν από 0,006 έως 888 PFU σε διάφορες περιοχές. Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι η ελάχιστη μολυσματική δόση ιών που μπορεί να προκαλέσει μόλυνση είναι πολύ χαμηλή (1-10 PFU) και εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως η ηλικία του προσβαλλόμενου, η ανοσολογική και η γενική φυσική κατάσταση του (Griffin et al, 2003).

Η υγειονομική σημασία της ύπαρξης των ιών εντερικής προέλευσης στα επιφανειακά νερά τεκμηριώθηκε από τον Koorman, ο οποίος μελέτησε επιδημία γαστρεντερίτιδας που οφειλόταν σε ιούς Noro και η οποία αποδόθηκε σε κολύμβηση σε νερά αναψυχής που είχαν υποστεί ρύπανση με λύματα (Koorman et al, 1982).

Για τον έλεγχο των υδατογενών λοιμώξεων πολύ μεγάλη σημασία έχει εκτός από τις συνθήκες υγιεινής διαβίωσης, η σωστή επεξεργασία και χλωρίωση του νερού, η σωστή παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας αυτής με συστηματική μέτρηση του υπολειμματικού χλωρίου, ο συστηματικός έλεγχος της ποιότητας του νερού από μικροβιολογική άποψη και η έγκαιρη επέμβαση σε περίπτωση εμφάνισης ακαταλληλότητας του δείγματος.

1.4 Ιοί Noro

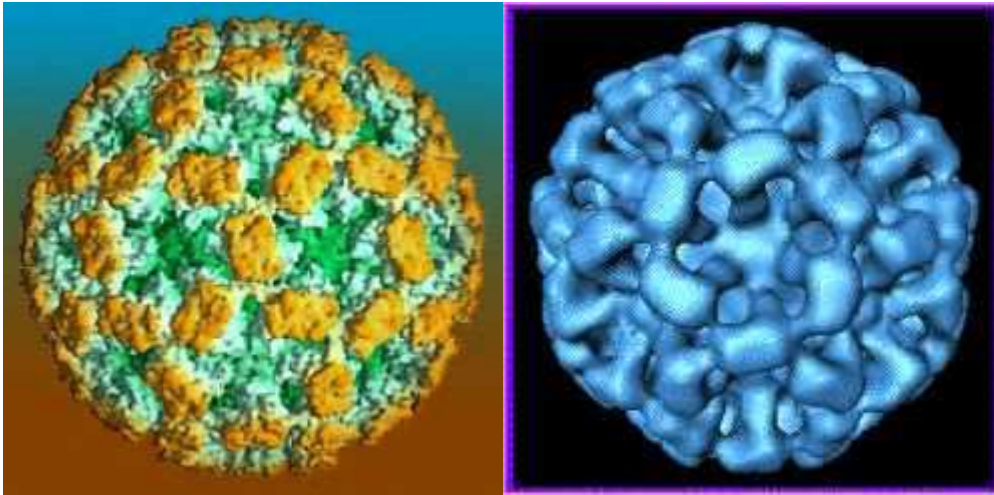
Οι νοροϊοί (NV, παλιότερη ονομασία ιοί Norwalk) ανήκουν στο γένος Norovirus της οικογένειας Caliciviridae. Περιλαμβάνουν μια ομάδα παρόμοιων μορφολογικά αλλά διαφορετικών γενετικά ιών με γενετικό υλικό μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Περιλαμβάνουν πέντε γονοτυπικές ομάδες οι οποίες με τη σειρά τους διαιρούνται σε τουλάχιστον είκοσι μικρότερες ομάδες. Οι ιοί Noro αποτελούν τη σημαντικότερη αιτία μη βακτηριακής γαστρεντερίτιδας παγκοσμίως καθώς σε αυτούς οφείλεται το 80% των

επιδημιών ιϊκής γαστρεντερίτιδας στις βιομηχανικές χώρες και το 90% των μη βακτηριακών κρουσμάτων (Fankhauser et al, 2002). Η περίοδος επώασης των ιών Noro είναι 24-48 ώρες και τα συμπτώματα περιλαμβάνουν έμετο, διάρροια, κοιλιακό πόνο, χαμηλό πυρετό, πονοκέφαλο και μυαλγία (Pato et al, 2004).

Το όνομα Norovirus (για το γένος) εγκρίθηκε πρόσφατα από την Διεθνή Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών το 2002 σαν το επίσημο όνομα για την ομάδα ιών που ονομάζονταν ιοί Norwalk (NLV) (Mayo M.A., 2002). Ταξινομούνται στην ομάδα των καλυκοϊών (caliciviruses) γιατί στην παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εμφανίζουν χαρακτηριστικές καλυκοειδής εμβαθύνσεις στην επιφάνεια του περιβλήματός τους. Εξαιτίας της χαρακτηριστικής μορφολογίας τους αποκαλούνται και «ιοί μικρής κυκλικής δομής» (small round structured viruses SRSVs). Ανακαλύφθηκαν μετά από μια επιδημία γαστρεντερίτιδας που εκδηλώθηκε τον Νοέμβριο του 1968 σε ένα δημοτικό σχολείο (Bronson) στο Norwalk του Οχάιο (Payment et al, 1994).

Το όνομα άλλαξε από Norwalk σε Norovirus αφού εντοπίστηκε σε μια σειρά από κρούσματα σε κρουαζιερόπλοια. Το 1972 το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εντόπισε τον ιό σε αποθηκευμένα δείγματα ανθρώπινων κοπράνων. Από τότε έχουν αναφερθεί πολλά κρούσματα με παρόμοια συμπτώματα. Η κλωνοποίηση και η αλληλούχιση του γονιδιώματος του ιού Norwalk έδειξε ότι αυτοί οι ιοί έχουν μια γονιδιωματική οργάνωση σύμφωνη με τους ιούς που ανήκουν στην οικογένεια Caliciviridae (Karikian AZ, 1996).

Η ταυτοποίηση των νοροϊών ήταν δύσκολη πριν την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών καθώς δεν καλλιεργούνται και παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ποικιλομορφία, παράγοντες που περιορίζουν την εφαρμογή ανοσολογικών τεχνικών καθώς και την ταξινόμηση τους σε οροτύπους. Σήμερα έχουν αναγνωριστεί αρκετά στελέχη ιών Noro που σχετίζονται με επιδημίες γαστρεντερίτιδας, τα οποία έχουν πάρει το όνομά τους από την περιοχή που εκδηλώθηκε η κάθε επιδημία (ιός Norwalk, ιός Mexico, ιός Hawaii).



Εικόνα 2: Σωματίδια ιού Νόρο

Οι ιοί Νορο δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε κυτταροκαλλιέργεια ή σε καλλιέργεια ανθρώπινου εμβρυϊκού εντερικού οργάνου, και δεν υπάρχει κανένα γνωστό ζωικό πρότυπο. Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των στελεχών Νορο πραγματοποιείται με τη χρήση μοριακών τεχνικών, συμπεριλαμβανομένης της εύρεσης της αλληλουχίας του RNA (Καρίκιαν, 1996).

Η επιτυχής ανίχνευση των ιών Νορο με τη χρήση της RT-PCR στηρίζεται:

- 1) Στην αποτελεσματική συγκέντρωση των ιών κατά τη διαδικασία συγκέντρωσης του δείγματος
- 2) Στην αποτελεσματική απομάκρυνση των αναστολέων και
- 3) Στην χρήση αποτελεσματικών εκκινητών PCR για την επιτυχή δημιουργία cDNA των ιών στόχων

Οι ανωτέρω παράγοντες είναι ιδιαίτερα κρίσιμοι για τα υδάτινα δείγματα που μολύνονται με χαμηλά επίπεδα του ιού (Shieh et al, 2003).

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο ιός είναι σταθερός και ανθεκτικός στη θερμότητα, σε οξύ και σε διαλύτες.

Θερμοκρασία: ο ιός διατηρεί τη μολυσματικότητά του μετά από επώαση στους 60° C για 30 λεπτά με συνέπεια η παστερίωση να μην είναι επαρκής για την καταστροφή του ιού. Η ανθεκτικότητά τους φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στα τρόφιμα. Ακόμα και με βρασμό μπορεί να μην αδρανοποιηθούν. Σε συνθήκες ψύξης και κατάψυξης ο ιός παραμένει άθικτος και πιθανώς βιώσιμος για αρκετούς μήνες ενδεχομένως και έτη.

pH: παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα γαστρικά οξέα pH 3-4. Ο ιός διατηρεί τη μολυσματικότητά του μετά από έκθεση σε pH 2,7 για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Θεωρείται ευαίσθητος σε pH>9 κάτι που δεν έχει όμως αποδειχθεί.

Σύμφωνα με τους Himenes και Chiang οι νοροϊοί αδρανοποιούνται εύκολα ύστερα από καθαρισμό με απολυμαντικά χλωρίου ενώ είναι λιγότερο ευαίσθητοι στις αλκοόλες και τα κοινά απορρυπαντικά δεδομένου ότι δεν έχουν λιπιδικό φάκελο (Himenes, Chiang, 2006).

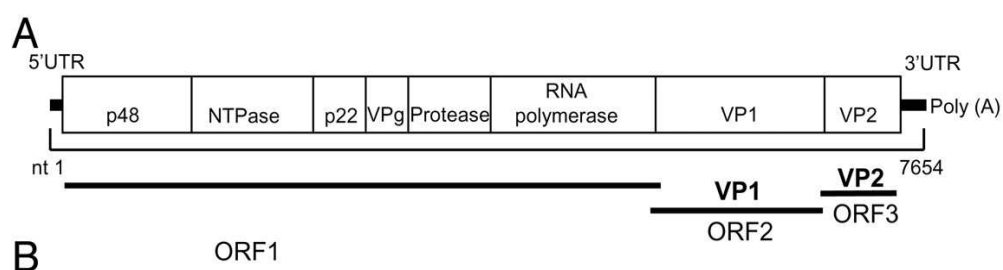
Ξήρανση: εμφανίζεται ανθεκτικός, καθώς επιβιώνει σε επιφάνειες, συμπεριλαμβανομένων των ταπήτων μέχρι και 12 ημέρες μετά από επιδημίες σε ιδρύματα.

1.5 Ίικη Δομή Νοροϊών

Οι νοροϊοί είναι ιοί μονόκλωνου RNA γονιδιώματος περίπου 7,7 κιλοβάσεων, το οποίο προστατεύεται από το περιβάλλον με ένα πρωτεϊνικό καψίδιο χωρίς να περιβάλλεται από φάκελο. Κωδικοποιούν μια σημαντική πρωτεΐνη (VP1) περίπου 58~60 kDa και μια μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη (VP2). Τα σωματίδια του ιού επιδεικνύουν μια άμορφη δομή στην επιφάνεια και γίνονται ορατά με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ 27-38nm (Prasad et al, 2001).

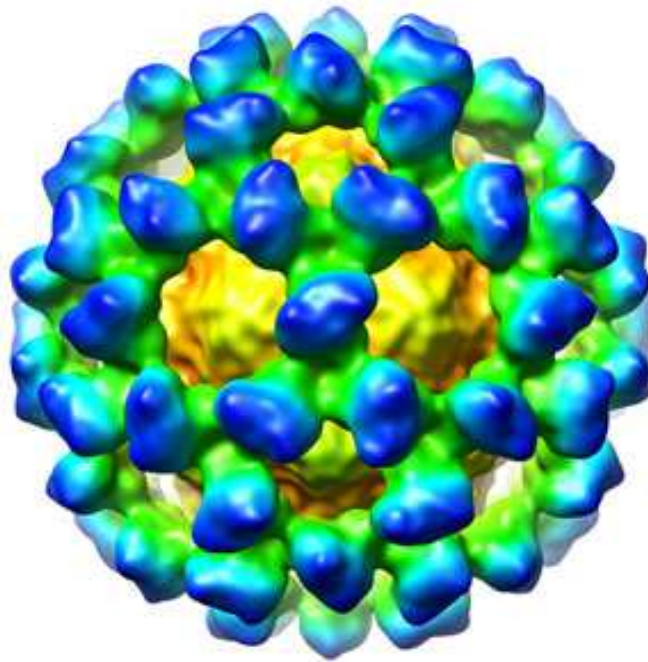
Έχει μια μονόκλωνη γραμμική, θετικής πολικότητας αλυσίδα RNA. Στο 5' άκρο του το γονιδίωμα συνδέεται με την πρωτεΐνη (VPg) ενώ στο 3' άκρο του έχει μια πολύ(A) ουρά.

Το γονιδίωμα βρέθηκε ότι έχει 3 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης. Το πρώτο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF1 (που αποτελείται από 5 Kb και αποτελεί τα δύο τρίτα του γονιδιώματος) κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη (200000 Da) που πρωτελυόμενη οδηγεί στη δημιουργία ώριμων μη δομικών πρωτεϊνών. Το δεύτερο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF2 (1,8Kb) κωδικοποιεί τη μεγαλύτερη δομική πρωτεΐνη του καψιδίου VP1. Το τρίτο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF3 (0,6Kb) κωδικοποιεί μια μικρή δομική πρωτεΐνη VP2.



Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση ολόκληρου του γονιδιώματος του νοροϊού, που υποδεικνύει την θέση των μη δομικών πρωτεϊνών, της ORF1 πολυπρωτεΐνης, των ιϊκών δομικών πρωτεϊνών VP1 και VP2 που κωδικοποιούνται από τα ORF2 και ORF3 αντίστοιχα και τις μη μεταφραζόμενες περιοχές 5' και 3'.

Το καψίδιο του ιού Norwalk είναι κατασκευασμένο από 180 αντίτυπα της ~60 kDa καψιδιακής πρωτεΐνης VP1 και είναι οργανωμένο σε 90 διμερή, ενώ η VP2 αποτελεί το 1%. Η καψιδιακή πρωτεΐνη περιέχει δυο κύριους τομείς που συνδέονται μεταξύ τους με εύκαμπτο δεσμό. Ο τομέας S (domain S) κοντά στο NH₂- άκρο συμμετέχει στη διαμόρφωση του εικοσαεδρικού κελύφους και ο τομέας P (domain P) στο COOH- άκρο διαμορφώνει τις προεξοχές που προέρχονται από το περίβλημα και περιέχει τις διμερείς επαφές. Διαιρείται στους υποτομείς P1 και P2. Ο υποτομέας P1 (αμινοξέα 226-278 και 406-520) ενεργεί ως περιοριστική περιοχή μεταξύ του S και του δεύτερου υποτομέα P2 (αμινοξέα 279-405), ο οποίος αποτελεί την πιο εκτεθειμένη περιοχή της καψιδιακής πρωτεΐνης.



Εικόνα 3: Στην εικονική δομή της καψιδιακής πρωτεΐνης διακρίνονται εμφανώς με κίτρινο χρώμα ο τομέας S, με πράσινο χρώμα ο υποτομέας P1 ενώ με μπλε χρώμα ο υποτομέας P2.

Οι νοροϊοί έχουν ένα συνεχές πρωτεϊνικό περίβλημα με σημαντικές προεξοχές στην επιφάνεια και αφήνουν την εντύπωση σχηματισμού κούπας. Οι προεξοχές αυτές μπορούν να αλληλεπιδρούν με τον κυτταρικό υποδοχέα και διευκολύνουν την ιική πρόσδεση και είσοδο στο κύτταρο.

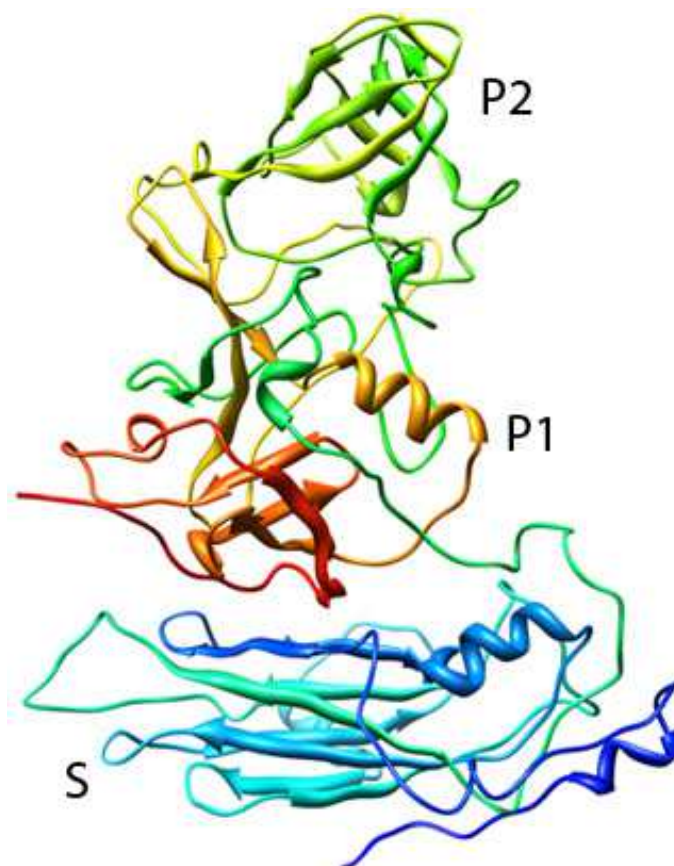
1.6 Ιϊκές πρωτεΐνες

Τρεις πρωτεΐνες βρίσκονται στα ώριμα ιϊκά σωματίδια: η VP1, η VP2 και η VPg.

Η VP1 (~60000 Da) είναι η μεγαλύτερη δομική πρωτεΐνη του ιού. Είναι παρούσα σε 180 αντίγραφα σε κάθε ιϊκό σωματίδιο. Η υπεροχή της στο σχηματισμό της δομής του ιϊκού καψιδίου είναι σύμφωνη με το κρίσιμο ρόλο της στον καθορισμό του αντιγονικού φαινοτύπου και τις αλληλεπιδράσεις του ιού με τα κύτταρα του ξενιστή.

Η VP2 (12000~29000 Da) θεωρείται μικρότερη δομική πρωτεΐνη λόγω της μικρής της παρουσίας στο ιϊκό σωματίδιο (μόνο ένα ή δυο αντίγραφα).

Η VPg είναι μη δομική πρωτεΐνη και βρίσκεται και αυτή σε πολύ μικρό αριθμό αντιγράφων στο ιϊκό σωματίδιο.



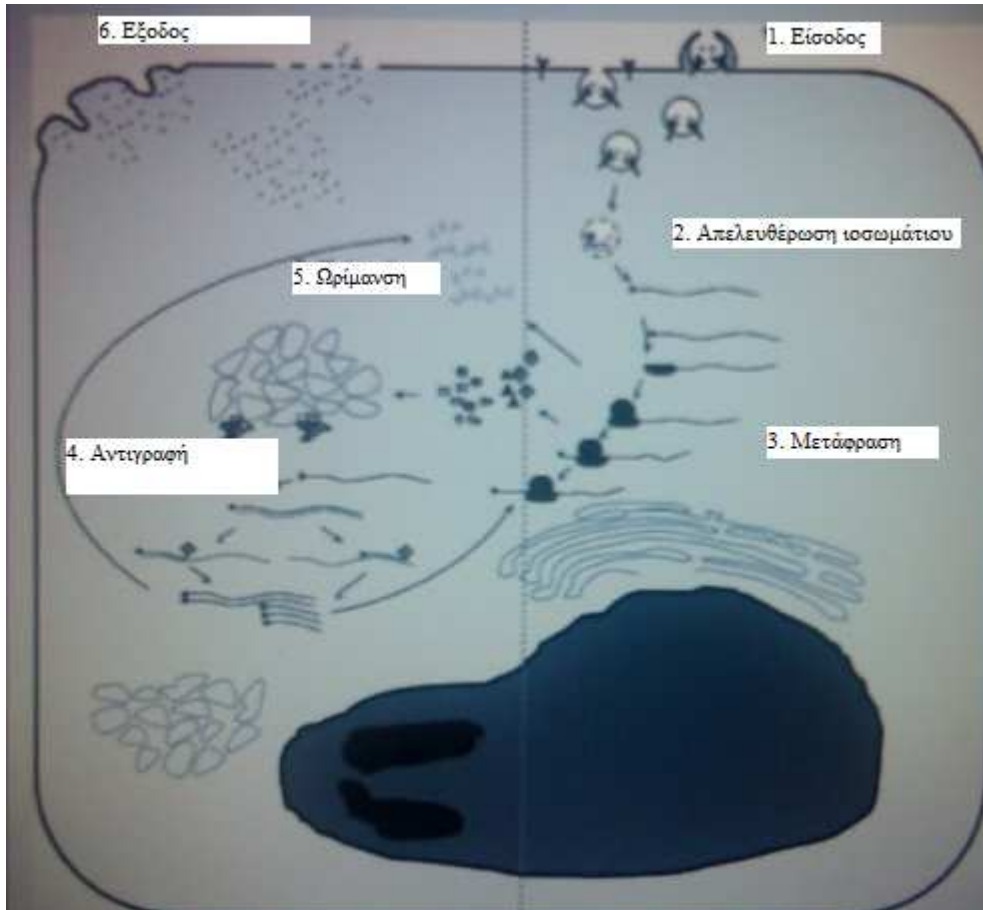
Εικόνα 4: Αναλυτική απεικόνιση της μεγαλύτερης δομικής πρωτεΐνης των νοροϊών VP1. Διακρίνονται εμφανώς οι 3 τομείς. (Fields Virology)

1.7 Αντιγραφή του RNA των νοροϊών

Μέσω ενός εξειδικευμένου ιϊκού υποδοχέα το ιϊκό σωματίο αλληλεπιδρά με το κύτταρο του ξενιστή και εισέρχεται σε αυτό. Έτσι το RNA του απελευθερώνεται μέσα στο κυτόπλασμα. Η έναρξη της μετάφρασης του εισερχόμενου γονιδιακού κλώνου μάλλον επιτυγχάνεται μέσω των παρεμβάσεων από την VPg πρωτεΐνη στον κυτταρικό μεταφραστικό μηχανισμό. Η ORF1 μεταφράζεται για να παράγει την μη δομική πολυπρωτεΐνη η οποία οδηγείται σε πρόδρομα και τελικά προϊόντα από την ιϊκή πρωτεΐαση (NS6^{Pro}).

Η έναρξη της σύνθεσης του συμπληρωματικού κλώνου RNA (αρνητικού κλώνου) από το πρωταρχικό ξεκινά από το 3' άκρο του εισερχόμενου γενώματος, το οποίο λειτουργεί ως εκμαγείο και μπορεί να περιέχει αντιδράσεις με τις κυτταρικές πρωτεΐνες. Ο αρνητικός κλώνος RNA που δημιουργήθηκε, με τη σειρά του χρησιμοποιείται για την αντιγραφή του RNA κλώνου ίδιου με αυτόν που εισήλθε στο κύτταρο. Η αντιγραφή του γενωμικού RNA εντοπίζεται στη περιοχή συγκρότησης όπου και πακετάρεται σε ιοσωμάτια.

Η αναπαραγωγή του ιϊκού RNA είναι συνδεδεμένη με τις κυτταρικές μεμβράνες του ξενιστή. Η ωρίμανση και η απελευθέρωση των ιϊκών σωματιδίων είναι πολύ λίγο κατανοητές. Υπολογίζεται ότι η πρωτεΐνη VP2 χρειάζεται για την παραγωγή μολυσματικών μορίων και ότι συσχετίζεται με τον αποπτωτικό μηχανισμό που διευκολύνει την απελευθέρωση των ιϊκών μορίων (Fields of Virology, 2007).



Εικόνα 5: Σχηματική Αναπαράσταση της προτεινόμενης στρατηγικής αναπαραγωγής του ιού. Ο κύκλος αναπαραγωγής περιλαμβάνει τα εξής στάδια: 1) είσοδο, 2) Απελευθέρωση, 3) Μετάφραση, 4) Αντιγραφή RNA, 5) Ωρίμανση, 6) Έξοδος (Courtesy of S. Sosnovtsev.)

1.8 Ταξινόμηση Νοροϊών

Οι νοροϊοί είναι μια γενετικά ποικιλόμορφη ομάδα RNA ιών χωρίς λιπιδικό φάκελο.

Διάφορα στελέχη έχουν ήδη χαρακτηρισθεί όπως:

Ιός Norwalk [M87661] (Hu/NLV/NV/1968/US)

Ιός Hawaii [U07611] (Hu/NLV/HV/1971/US)

Ιός Snow Mountain [L23831] (Hu/NLV/SMV/1976/US)

Ιός Mexico [U22498] (Hu/NLV/MX/1989/MX)

Ιός Desert Shield [U04469] (Hu/NLV/DSV395/1990/SR)

Οι νοροϊοί που συνήθως απομονώνονται σε περιπτώσεις οξείας γαστρεντερίτιδας ανήκουν σε δυο γονιδιακές ομάδες (genogroup): ομάδα I (GI) που περιλαμβάνει τον ιό Norwalk και τον ιό Desert Shield και την ομάδα II (GII) που περιλαμβάνει τον ιό Mexico και τον ιό Hawaii.

Οι νοροϊοί μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε διαφορετικές γονιδιακές ομάδες (GI, GII, GIII, GIV, GV), οι οποίες μπορούν να διαιρεθούν περαιτέρω σε διαφορετικές ομάδες ή γονότυπους. Για παράδειγμα το GII που είναι η πιο διαδεδομένη ανθρώπινη γονιδιακή ομάδα περιλαμβάνει σήμερα 19 γονοτύπους. Οι ομάδες GI, GII, GIV μολύνουν ανθρώπους, το GIII μολύνει βοοειδή ενώ το GV έχει πρόσφατα απομονωθεί σε ποντίκια (Ramirez et al, 2008).

Οι περισσότεροι νοροϊοί που μολύνουν ανθρώπους ανήκουν στις GI και GII. Οι νοροϊοί της GII με γονότυπο 4 (συντομογραφία GII.4) αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα των κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας σε ενήλικους και συχνά σαρώνουν όλη την υδρόγειο. Πρόσφατα παραδείγματα περιλαμβάνουν το US95/96-US στέλεχος που συνδέεται με κρούσματα παγκοσμίως στα μέσα ως τα τέλη της δεκαετίας του '90, του ιού Hunter το 2004 που συνδέεται με την εμφάνιση κρουσμάτων σε Ευρώπη και Ιαπωνία. Το 2006 υπήρχε και άλλη μεγάλη αύξηση της λοίμωξης νοροϊών σε ολόκληρο τον κόσμο. Δύο νέες παραλλαγές GII.4 προκάλεσαν περίπου το 80% των κρουσμάτων και έχουν ονομαστεί 2006a και 2006b (Tu Et et al, 2008).

1.9 Επιδημιολογία των Νοροϊών

Οι ιοί Νορο ανακαλύφθηκαν όπως έχει προαναφερθεί στο Norwalk του Οχάιο το 1972 με τη χρήση ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε μολυσμένα περιπτώματα (Karikian et al, 1972). Σήμερα είναι οι περισσότερο αναγνωρισμένοι παράγοντες πρόκλησης μη βακτηριακών επιδημιών γαστρεντερίτιδας που σχετίζονται με την κατανάλωση τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο.

Έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει μια κληρονομική προδιάθεση σε λοιμώξεις που οφείλονται σε Νορο καθώς και τα άτομα με ομάδα αίματος 0 είναι πιο συχνά μολυσμένα. Οι ομάδες αίματος B και AB μπορεί να παρέχουν μερική προστασία κατά της συμπτωματικής λοίμωξης (Lindesmith et al, 2003).

Εξειδικευμένη διάγνωση των νοροϊών αποτελεί η δοκιμή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ή η δοκιμή σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR), οι οποίες δίνουν αποτελέσματα μέσα σε λίγες ώρες. Οι δοκιμασίες αυτές είναι πολύ ευαίσθητες και μπορούν να ανιχνεύσουν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις έως 10 ιικά μόρια.

Ο πιο κοινός γονότυπος που προσδιορίζεται σε νοσοκομείο παιδών είναι ο GII.4 όμως και άλλοι γονότυποι όπως ο GII.18-nica εντοπίζεται σε μικρότερο ποσοστό.

Μελέτη που διεξήχθη από επιστήμονες στο πανεπιστήμιο της Ουάσιγκτον (Ιατρική Σχολή του Σαιντ Λούις) δείχνει ότι η πρωτεΐνη MDA-5 μπορεί να είναι ο πρωταρχικός ανοσοποιητικός αισθητήρας που ανιχνεύει την παρουσία νοροϊών στον οργανισμό (McCartney et al, 2008). Είναι επίσης ενδιαφέρον, ότι μερικοί άνθρωποι έχουν κοινές παραλλαγές στο γονίδιο της MDA-5 που θα μπορούσε να τους καταστήσει πιο ευπαθείς σε λοιμώξεις από Νοροϊούς.

Σύμφωνα με το κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών των ΗΠΑ (CDC), περισσότερες από 9 εκατομμύρια περιπτώσεις μόλυνσης από τους ιούς Noro εμφανίζονται ετησίως στις ΗΠΑ. Οι ιοί αυτοί προκαλούν τα δύο τρίτα του συνόλου των ασθενειών και το 7% των θανάτων. Ομάδες υψηλού κινδύνου αποτελούν τα μικρά παιδιά, οι ηλικιωμένοι, καθώς και τα άτομα που παίρνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (Mead et al, 1993).

Στη Σουηδία σημειώνονται 135000-220000 κρούσματα τροφιμογενών λοιμώξεων από τους Noro ετησίως (Lindqvist et al, 2001). Στην Τσεχία το 2001 σημειώθηκαν 104 κρούσματα τροφιμογενών λοιμώξεων που οφείλονταν σε Noro, ενώ το 2003 καταγράφηκαν ελάχιστα κρούσματα στην Πράγα (Drapal et al, 2003). Στη Δανία, την Αγγλία και την Ουαλία, τη Φινλανδία, τη Γαλλία και τη Σουηδία περισσότερες από το 95% των μη βακτηριακών επιδημιών αποδίδονται στους νοροϊούς. Τα αντίστοιχα ποσοστά είναι χαμηλότερα για τη Σλοβενία 43% και την Ισπανία 57% (Hedlund et al, 2000).

Στοιχεία για επιδημίες από τους νοροϊούς και SRSV για τον Ελλαδικό χώρο θα δοθούν παρακάτω.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Επιδημίες ιϊκής γαστρεντερίτιδας στην Ευρώπη την περίοδο 1995-2000.

	1995	1996	1997	1998	1999	Συνολικά οι ιοί	2000		Συνολικά 1995-2000
							<i>Rota-ιοί</i> ^α	<i>Noro-ιοί</i> ^α	
Δανία				9	11	17	0	17 (100)	37
Αγγλία και Ουαλία	392	352	151	219	239	290	13 (4)	273 (96)	1.643
Φινλανδία			5	27	35	58	1 (2)	56 (97)	125
Γαλλία	4	9	7	8	19	28	1 (14) ^β	5 (71) ^β	43
Γερμανία			1	53	145	227	0	227(100)	426
Ιταλία	0	0	0	0	0	2	0	2 (100)	2
Σλοβενία	8	6	8	4	5	14	8 (57)	6 (43)	45
Ισπανία	37	24	25	29	66	55	6 (43) ^γ	8 (57) ^γ	236
Σουηδία	81	130	130	130	190	195		190 (97)	856
Ολλανδία	25	69	54	36	58	59	5 (13) ^δ	32 (84) ^δ	301

^αΑριθμός των επιδημιών που αποδίδονται σε αυτούς τους μικροοργανισμούς (ποσοστό επιδημιών για το 2000).

^βΣύμφωνα με 7 εργαστηριακά επιβεβαιωμένες ιϊκές επιδημίες

^γΣύμφωνα με 14 εργαστηριακά επιβεβαιωμένες ιϊκές επιδημίες

^δΣύμφωνα με 38 εργαστηριακά επιβεβαιωμένες ιϊκές επιδημίες

1.10 Κλινική εικόνα που προκαλούν οι Νοροϊοί

Οι ιοί Νορο είναι ιδιαίτερα μεταδοτικοί. Η μολυσματική δόση μπορεί να είναι αρκετά χαμηλή ακόμα και 10-100 μόρια ιών. Εισβάλλουν και καταστρέφουν τα κύτταρα του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου και αποβάλλονται με τα κόπρανα. Πρόκειται για ιούς ταχείας δράσης, καθώς η περίοδος επώασης και η διάρκεια των συμπτωμάτων κυμαίνονται συνήθως από 24 έως 48 ώρες (με μέσο όρο τις 33 έως 36 ώρες), αν και σε ορισμένες περιπτώσεις η περίοδος επώασης μπορεί να περιορίζεται στις 12 ώρες μετά την έκθεση στον ιό. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ναυτία, έμετο, διάρροια, χαμηλό πυρετό και κοιλιακό άλγος με κυρίαρχο σύμπτωμα τον έμετο,, για αυτό η ίωση είναι γνωστή ως η «νόσος των χειμερινών εμέτων». Η πιο κοινή περιπλοκή είναι η αφυδάτωση. Τα συμπτώματα διαρκούν συνήθως 24 με 60 ώρες. Η αποκατάσταση είναι συνήθως πλήρης και δεν υπάρχουν στοιχεία για σοβαρά μακροπρόθεσμα δευτερογενή συμπτώματα.

Ασυμπτωματική μόλυνση έχει σημειωθεί στο 30% των περιπτώσεων. Άτομα που έχουν προσβληθεί από τον ιό μπορούν να τον μεταδώσουν ακόμα και ημέρες μετά την παρουσία συμπτωμάτων. Η ανοσία σε αυτόν τον ιό δεν είναι μόνιμη και ως εκ τούτου, νέα μόλυνση μπορεί να εμφανισθεί.

Η έλλειψη δυνατότητας κυτταροκαλλιέργειας των νοροϊών αποτελεί και το κύριο εμπόδιο για τη δημιουργία εμβολίων για την αντιμετώπισή τους.

1.11 Σκοπός της Εργασίας

Τα προβλήματα της ανθρώπινης υγείας που συνδέονται με την κατανάλωση πόσιμου νερού και χρήση του για την παραγωγή και επεξεργασία διαφόρων τροφίμων έχουν καταγραφεί ήδη από τους μεσαιωνικούς χρόνους. Ο ρόλος του νερού στη συσσώρευση διάφορων μικροοργανισμών όπως E.coli, Pseudomonas Aeroginosa έχει μελετηθεί διεξοδικά, οπότε και έγινε γνωστή η μετάδοση εντεροπαθογόνων ασθενειών από την κατανάλωση μολυσμένου νερού.

Το πόσιμο νερό έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση διάφορων ασθενειών όπως η χολέρα και η λοιμώδης ηπατίτιδα. Καθώς το πόσιμο νερό σε πολλές περιοχές προέρχεται από γεωτρήσεις και η κατανάλωσή του δεν συνδέεται συνήθως με θερμική ή οποιαδήποτε άλλη επεξεργασία, οι επιπτώσεις στη δημόσια υγεία είναι αρκετά σοβαρές.

Η συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια μεταπτυχιακού προγράμματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας με τίτλο «Βιοτεχνολογία- Ποιότητα διατροφής και Περιβάλλοντος».

Σκοπός της μελέτης ήταν

- 1) Η ανίχνευση των νοροϊών σε πόσιμο νερό και
- 2) Η απάντηση στο ερώτημα αν πρέπει να συμπεριληφθεί η αναζήτηση ιών στον μικροβιολογικό έλεγχο του πόσιμου νερού.

Θεωρήθηκε απαραίτητο να γίνει μια μελέτη για την ανίχνευση της παρουσίας αυτών των ιών σε πόσιμο νερό που προέρχεται από γεωτρήσεις και δεν περνά από άλλη επεξεργασία σε διάφορα σημεία του Νομού Λαρίσης.

Οι πληροφορίες που περιλαμβάνονται στη μελέτη αυτή είναι ιδιαίτερα πολύτιμες προκειμένου να βελτιωθεί ο μικροβιολογικός έλεγχος του πόσιμου νερού και να εξασφαλισθεί η δημόσια υγεία κατά την κατανάλωσή του.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με τη συλλογή των δειγμάτων νερού. Η δειγματοληψία έγινε σε γεωτρήσεις σε περιοχές του Νομού Λάρισας. Το νερό που προέρχεται από όλες αυτές τις γεωτρήσεις χρησιμοποιείται από τους κατοίκους κυρίως για ανθρώπινη κατανάλωση (πόση, επεξεργασία τροφίμων). Το κάθε δείγμα έχει όγκο 4 λίτρα. Συλλέχθηκαν συνολικά 10 δείγματα νερού γεωτρήσεων και χρησιμοποιήθηκαν 2 θετικοί μάρτυρες.

Πίνακας 4: Θετικοί μάρτυρες

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ I (GI)	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ II (GII)
1	A6

Πίνακας 5: Κωδικοποίηση Δειγμάτων πόσιμου νερού

Κωδικοποίηση δείγματος	Προέλευση
KOZ23	Γεώτρηση Δήμου Λάρισας
SX7	Γεώτρηση Σχολείου Λάρισας
ARM5	Γεώτρηση Στρατοπέδου Λάρισας
AG4	Γεώτρηση Αγιάς
PL2	Γεώτρηση Δήμου Φαρσάλων
AGK3	Γεώτρηση Αγιόκαμπου
BRT8	Γεώτρηση Βιομηχανικής Περιοχής
KR6	Γεώτρηση Δήμου Λάρισας
BIPE16	Γεώτρηση Βιομηχανικής Περιοχής
NTR1	Γεώτρηση Δήμου Λάρισας

2.2 Μέθοδος προσρόφησης- έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα.

Τα δείγματα πόσιμου νερού όγκου 4 λίτρων φυγοκεντρούνται στις 1000 rpm για 2min. Συλλέγεται το υπερκείμενο και ρυθμίζεται το pH στο 3,8 με την προσθήκη 3N HCl.

Με την προσθήκη $MgCl_2$ σε τελική συγκέντρωση 0.05M, τα ιικά σωματίδια φορτίζονται θετικά. Ακολουθεί αργή ανάδευση και φιλτράρισμα σε ηλεκτραρνητικά φορτισμένο φίλτρο (MF- Millipore) διαμέτρου 47mm και μέγεθος πόρου 3 μ m.

Το φίλτρο στη συνέχεια μεταφέρεται σε αποστειρωμένο δοχείο ζέσεως 250 ml, όπου προστίθενται 10 ml διαλύματος 0,05M Tris με pH 9, εμπλουτισμένο με 3% BSA. Η έκλουση πραγματοποιείται με αργή ανάδευση για 10 min. Το έκπλυμα φυλάσσεται και η διαδικασία της έκλουσης επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά.

Το φίλτρο απομακρύνεται και φυλάσσεται στους 4° C μέσα σε τρυβλίο Petri. Το pH του συγκεντρωμένου διαλύματος ρυθμίζεται στο 7, με τη χρήση διαλύματος 3N HCl. Ακολουθεί περαιτέρω συγκέντρωση του δείγματος με τη μέθοδο καθίζησης με PEG. Στο δείγμα προστίθεται 10% w/v PEG6000 και NaCl σε τελική συγκέντρωση 0,5M.

Το μίγμα αναδεύεται για 18h στους 4° C (χρήση Cold Room). Μετά το πέρας αυτής της χρονικής περιόδου το μίγμα φυγοκεντρείται στις 11000rpm για 1h. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται σε 2ml θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιεργειών (MEM) και διατηρείται σε συνθήκες κατάψυξης -18° C.

2.3 Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση του ιικού RNA έγινε με τη χρήση του QIAamp Viral RNA Mini Kit, και τα στάδια του συνοδευτικού πρωτόκολλου είναι τα εξής:

1. Σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 1,5ml τοποθετούνται 560μl από το Buffer AVL- carrier RNA.
2. Προστίθενται 140μl δείγματος και αναδεύονται με vortex για 15sec.
3. Το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου (15-25° C) για 10min.
4. Έπειτα προστίθεται 560μl αιθανόλης(96-100%) και ακολουθεί vortex για 15sec.
5. Προσεκτικά από το διάλυμα του σταδίου 4 προσθέτονται 630μl στις ειδικές φυγοκεντρικές στήλες QIAamp οι οποίες έχουν με τη σειρά τους τοποθετηθεί μέσα σε tubes των 2ml. Φυγοκεντρούνται τα δείγματα στις 8000rpm για 1min. Οι στήλες τοποθετούνται σε καθαρό tube και τα παλιά απορρίπτονται.
6. Επαναλαμβάνεται το στάδιο 5.
7. Μέσα στις φυγοκεντρικές στήλες προστίθενται 500μl Buffer AW2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα (14000 rpm) για 3 λεπτά.
8. Η στήλη τοποθετείται εκ νέου σε νέο tube των 2 ml και απορρίπτεται το παλιό. Φυγοκεντρείται ξανά σε μέγιστη ταχύτητα (14000 rpm) για 1 λεπτό.
9. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό 1,5ml μικροφυγοκεντρικό tube. Προστίθενται 60μl Buffer AVE και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
10. Τέλος φυγοκεντρείται στις 8000rpm για 1 min. Η φυγοκεντρική στήλη απορρίπτεται και το συγκεντρωμένο δείγμα φυλάσσεται στην κατάψυξη (-18° C).

2.4 Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse transcription- RT)

Όλα τα συγκεντρωμένα δείγματα καθώς και οι θετικοί μάρτυρες ακολούθως επεξεργάζονται σε θερμοκυκλοποιητή για την διεξαγωγή αντίστροφης μεταγραφής (RT) κατά την οποία το RNA των δειγμάτων θα μετατραπεί σε cDNA ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί αργότερα στις PCR.

Σε διάλυμα που περιέχει τυχαίους εκκινητές [Random Primers d(N9), Takara Biomedical group] 1μl/δείγμα, 10mM δεοξυτριφωσφορικά νουκλεοτίδια [dNTPs 10mM, Invitrogen] 1μl/δείγμα και νερό ελεύθερο νουκλεασών 5μl/δείγμα, (7μl/tube) προσθέτονται 5μl δείγματος RNA/ tube και φυγοκεντρώνται για 1 λεπτό στις 8000rpm.

Τα δείγματα τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή για 5min για επώαση στους 65° C. Έπειτα ψύχονται σε πάγο και ξαναφυγοκεντρώνται. Σε κάθε tube προστίθενται 8μl από το δεύτερο μίγμα που περιέχει 5x first strand Buffer 4μl/ δείγμα, 0,1M DTT 2μl/δείγμα, αναστολέα ριβονουκλεασών RNase out (20u/μl) 0,5μl/δείγμα, αντίστροφη μεταγραφάση RT (100u/μl) 0,5μl/δείγμα και H₂O nuclease free 1μl/δείγμα.

Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 1 λεπτό στις 800rpm και τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή για τα επόμενα στάδια της αντίστροφης μεταγραφής που είναι:

- 12min στους 25° C
- 50min στους 42° C
- 15min στους 70° C

2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain reaction-PCR)

Σε tubes που περιέχουν 47μl από το μίγμα που περιέχει: dNTPs 10mM 5μl/δείγμα, Taq Buffer (10x) 5μl/ δείγμα, H₂O nuclease free 34,5μl/δείγμα, Taq (5u/μl), (2,5u/t) 0,5μl/δείγμα, Primers (50pm) 1+1μl/δείγμα, προσθέτονται 3μl cDNA που προέκυψε από την RT και τοποθετούνται τα tubes στον θερμοκυκλοποιητή για τα εξής στάδια:

Αποδιάταξη DNA	95° C → 2min	
Αποδιάταξη	95° C → 30sec	} 25 κύκλοι
Υβριδοποίηση	43° → 30sec	
Επιμήκυνση	72° → 30sec	
Πλήρης Επιμήκυνση	72° → 5min	
	4° → ∞	

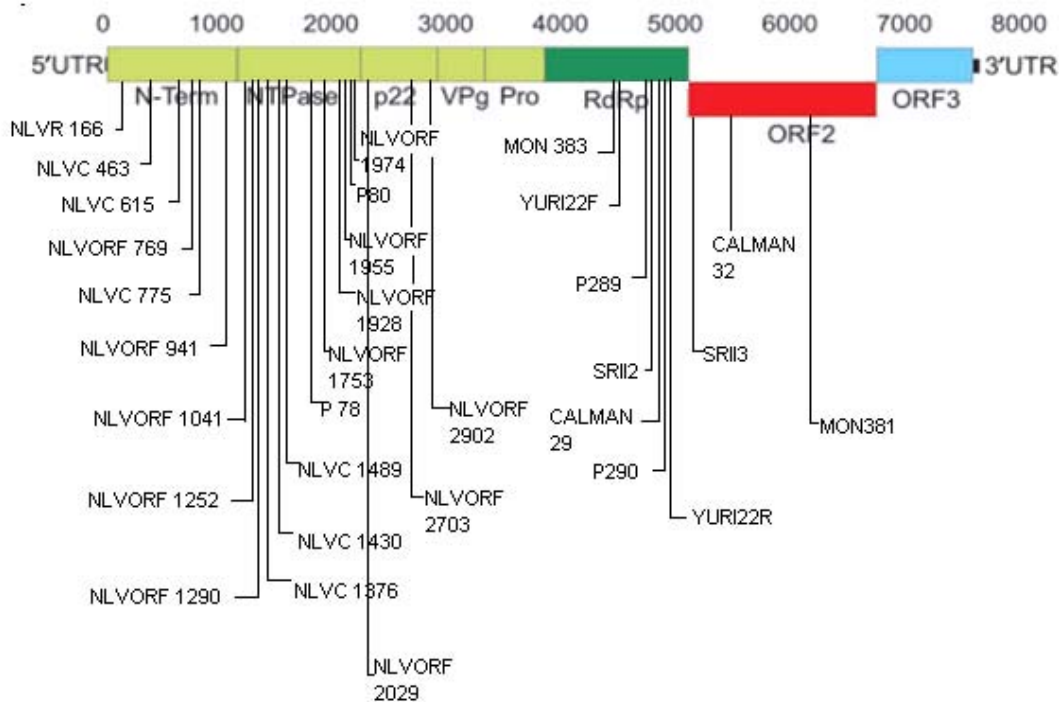
Η θερμοκρασία υβριδοποίησης Τα του κάθε Primer διαφέρει άρα ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στο 2^ο στάδιο για να διορθώνεται η θερμοκρασία αναλόγως το T_m του κάθε Primer. Συνήθως η θερμοκρασία υβριδισμού Τα, επιλέγεται να είναι κατά 5°C μικρότερη του T_m.

Στη διαδικασία χρησιμοποιούνται και οι θετικοί μάρτυρες και 3 αρνητικοί μάρτυρες που περιέχουν H₂O nuclease free.

Πίνακας 6: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR και τις Seminedsted και autonested PCR.

ΖΕΥΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΘΕΣΗ GI	ΘΕΣΗ GII	PCR product
Mon 381- Mon383	43° C	5647-5668 capsid 4163-4185 capsid	5362- 5383 5661- 5683	GII 321bp
SRII-1 SRII-2 SRII-3	50° C	5351-5369 3Dpol 4856-4878 3Dpol 3179-3197 3Dpol	5078- 5096 4583- 4605 4767- 4785	Seminedsted GII 202bp
P78 P80	50° C	1682-1701 2C helicase 1943-1970 2C helicase	2511- 2530 1748- 1775	GI 288bp
Calman 29 Calman 32	50° C	4865-4887 3Dpol 5335-5352 3Dpol	4592- 4611 6863- 6880	GI 487bp
G2SKF G2SKR	55° C	5321-5337 capsid 5652-5671 capsid	5046- 5064 5367- 5389	GI 350bp GII 343bp

P289	43° C	4865-4884 3Dpol	4592- 4613	GI 316bp
P290		4568-4589 3Dpol	4295- 4317	GII 318bp
SRI-1	40° C	5652-5671 capsid	5467- 5486	Seminested
SRI-2		5356-5373 capsid	3-20	GI 240bp
SRI-3		5578-5596 capsid	5653- 5681	
NLVR 58 NLVR756	50° C			GII 699bp
NLVORF 1290-1974	55° C			GII 685bp
NLVH 297-896	50° C			GII 600bp
NLVH 463-1430	55° C			GII 968bp
NLVORF 1955-2902	55° C			GII 948bp



Εικόνα 6: Θέσεις αναγνώρισης εκκινήτων στο γένωμα του ιού.

2.6 Seminested ή Autonested PCR

Σε tubes που περιέχουν 45μl από το μίγμα που περιέχει: dNTPs 10mM 5μl/δείγμα, Taq Buffer (10x) 5μl/ δείγμα, H₂O nuclease free 32,5μl/δείγμα, Taq (5u/μl),(2,5u/t) 0,5μl/δείγμα, Primers (50pm) 1+1μl/δείγμα, προσθέτονται 5μl DNA product που προέκυψε από την PCR και τοποθετούνται τα tubes στον θερμοκυκλοποιητή για τα εξής στάδια:

95° C → 2min

95° C → 30sec

43° → 30sec

72° → 30sec

} 40 κύκλοι

72° → 5min

4° → ∞

Όπως και στην PCR, η θερμοκρασία υβριδοποίησης του κάθε Primer διαφέρει άρα ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στο 2^ο στάδιο για να διορθώνεται η θερμοκρασία αναλόγως το T_m του κάθε Primer.

2.7 Ηλεκτροφόρηση

Τα προϊόντα PCR που προκύπτανε από τις Seminested ή Autonested PCR στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται.

Σε πήκτωμα αγαρόζης 2% προστίθενται 10μl βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 1μg/ml . Συμπεριλαμβάνονται οι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες καθώς και 3μl DNA ladder (100bp).

Τα θετικά δείγματα που προκύπτουν σύμφωνα με τους θετικούς μάρτυρες και το αναμενόμενο αποτέλεσμα προϊόντων PCR από τον πίνακα των Primers μετά τον έλεγχο του πηκτώματος στο UV , φυλάσσονται ώστε να χρησιμοποιηθούν στο στάδιο της κλωνοποίησης. Τα υπόλοιπα απορρίπτονται ως αρνητικά δείγματα.

2.8 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

2.8.1 Καθαρισμός PCR προϊόντων

Τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά κατά την ηλεκτροφόρηση, ηλεκτροφορούνται ξανά σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Οι θετικές ζώνες που εμφανίζονται σύμφωνα με το DNA ladder, απομονώνονται και μεταφέρονται σε tubes των 2ml τα οποία έχουν αποστειρωθεί. Ο καθαρισμός των προϊόντων γίνεται με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit, ακολουθώντας τις οδηγίες που αναγράφονται στο συνοδευτικό πρωτόκολλο.

2.8.2 Autonested GoTaq PCR

Για την ενίσχυση των ανιχνευμένων περιοχών, χρησιμοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με το ένζυμο GoTaq. Η αντίδραση γίνεται για το κάθε θετικό δείγμα (που βρέθηκε με κάποιο συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητή), και χωριστά για τον κάθε εκκινητή.

Τα στάδια της είναι η αποδιάταξη του DNA στους 95° C, η αποδιάταξη, υβριδοποίηση και επιμήκυνση του εκκινητή, και η τελική επιμήκυνση των προϊόντων.

95°c	→	2 min	}	30 κύκλοι
95°c	→	1 min		
50°c	→	30 sec		
72°c	→	1 min		
72°c	→	5 min		
4°c	→	∞		

Το μίγμα περιέχει: 10mM dNTPs 5μl/tube, Colorless Go Tag Flexi Buffer 5X 10μL/tube, MgCl₂ 25mM 4μL/tube, H₂O nuclease free 24,75μL/tube, Go Tag (5u/μl), (1,25u/t) 0,25μl/tube, primers (50pm) 1+1μL/tube

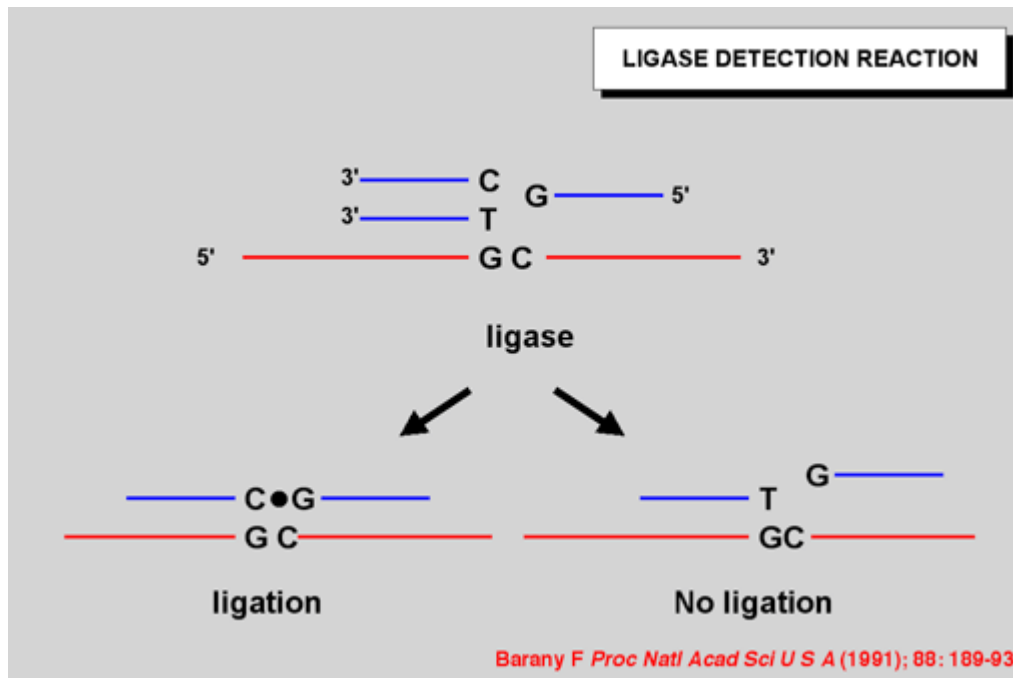
Το μίγμα χωρίζεται σε tubes τα οποία περιέχουν 46μl στα οποία προστίθενται και 4μl προϊόν PCR.

Μετά το τέλος της GoTag PCR ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα 2% αγαρόζης και δεύτερος καθαρισμός των προϊόντων.

2.8.3 Αντίδραση της Λιγάσης (Ligation chain reaction)

Το τμήμα του γενώματος το οποίο έχει ενισχυθεί στα προηγούμενα στάδια πρέπει τώρα να ενσωματωθεί σε ένα πλασμίδιο το οποίο θα αποτελεί τον φορέα κλωνοποίησης.

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pGEM- T Easy Vector System, ο οποίος έχει μια θέση ενσωμάτωσης με πολλές μονόκλωνες ουρές polyT που είναι συμπληρωματικά των παραγόμενων από την προηγούμενη διαδικασία (polyA). Έτσι η λιγάση αντιδρά και δημιουργεί δεσμούς ανάμεσα στους δυο συμπληρωματικούς κλώνους, το οποίο οδηγεί στην τελική δομή του προϊόντος.



Εικόνα 7: Αντίδραση της Λιγάσης.

Το μίγμα που δημιουργείται για την διαδικασία περιέχει: 2x Rapid Ligation Buffer 5μL/tube, PGEM- T Easy Vector 50ng 1μL/tube, T4 DNA Ligase (3u/μL) 1μL/tube. Το μίγμα μοιράστηκε σε tubes που περιείχαν 7μl το καθένα και στα οποία προστέθηκε και 3μL προϊόν GoTaq PCR .

Επεξεργάστηκαν τα δείγματα στους 25° C για 2 ώρες.

2.8.4 Παραγωγή Δεκτικών κυττάρων (competent cells) με χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂).

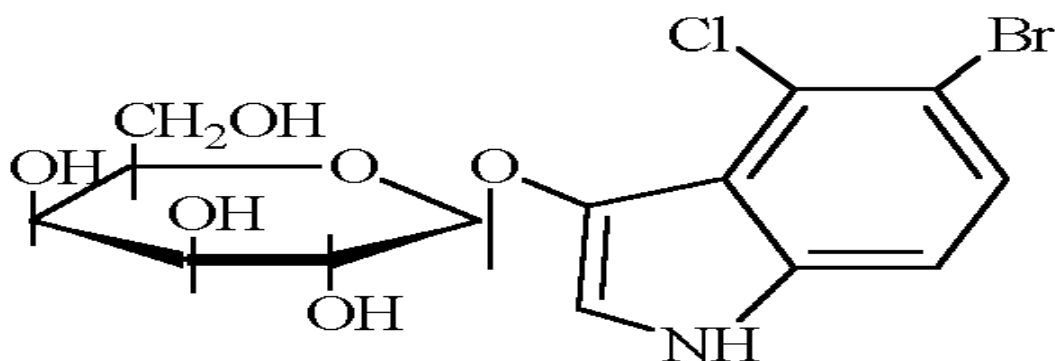
Για την παραγωγή των ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης χρησιμοποιούνται κύτταρα E.coli DH5. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων

2. Ασηπτική μεταφορά τους σε διάλυμα LB Broth (20g/L) και επώαση τους στους 37° C για 16 ώρες στις 210 στροφές/λεπτό.
3. Καθορίζεται η OD₆₀₀ έτσι ώστε να διακοπεί η επώαση στα (0,450-0,550 A) με τοποθέτησή τους σε πάγο.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το ίζημα διαλύεται σε παγωμένο διάλυμα CaCl₂ (0,1M).
5. Το στάδιο 4 επαναλαμβάνεται μια φορά ακόμα.

2.8.5 Μετασχηματισμός Δεκτικών κυττάρων (Transformation of competent cells).

Ο φορέας κλωνοποίησης έχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Η αμπικιλίνη αναστέλλει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος παρεμβαίνοντας στην σύνδεση των πεπτιδογλυκανών. Με αυτό τον τρόπο αποτρέπεται η ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων που δεν έχουν προηγουμένως μετασχηματισθεί. Η διαδικασία ελέγχεται με το X-Gal το οποίο έχει ένα μπλε αδιάλυτο χρώμα. Το X-Gal διασπάται όταν στον φορέα δεν έχει εισαχθεί η συγκεκριμένη αλληλουχία. Έτσι παράγεται η β γαλακτοσιδάση που σχηματίζει ένα ενεργό ένζυμο που διασπά το X-Gal και χρωματίζει τις αποικίες.



Σχήμα 3: Χημική Σύσταση του X-Gal, η γαλακτόζη βρίσκεται στα αριστερά και η μπλε χρωστική που διαχέεται όταν αποκοπεί στα δεξιά.

Η διαδικασία του μετασχηματισμού έχει τα εξής στάδια:

1. Μεταφορά επιδεικτικών κυττάρων σε αποστειρωμένα tubes
2. Προσθήκη του μισού προϊόντος της αντίδρασης της λιγάσης, αναδεύονται αργά και τοποθέτηση τους σε πάγο για 30 min.
3. Ακολουθεί επώαση τους σε υδατόλουτρο 42° C για 90sec.
4. Μεταφορά τους σε πάγο για 2 λεπτά (για να επέλθει θερμικό σοκ).
5. Σε LB Broth μεταφέρεται μια ποσότητα μετασχηματισμένων κυττάρων και ακολουθεί επώαση τους στους 37° C για 1 ώρα στις 180στροφές/λεπτό.
6. Μικρή ποσότητα από κάθε καλλιέργεια επιστρώνεται σε τριβλύο Petri το οποίο περιέχει LB Agar (30g/l) και αμπικιλίνη (6,6mg/ml)
7. Προστίθεται σε κάθε τριβλύο ποσότητα X-Gal (50mg/ml)
8. Επώαση για 16 ώρες στους 37° C.
9. Οι λευκές αποικίες συλλέγονται και εισάγονται σε LB Broth το οποίο περιέχει αμπικιλίνη.
10. Επωάζονται στους 37° C για 16 ώρες στις 210 στροφές/ λεπτό.
11. Εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με την χρήση NucleoSpin Plasmid Kit.



Εικόνα 8: Διάκριση λευκών και μπλε αποικιών με τη χρήση X-Gal.

2.8.6 Πέψη με EcoRI

Για να επιβεβαιωθεί η ένθεση του προϊόντος PCR στον φορέα κλωνοποίησης πραγματοποιείται η πέψη με EcoRI. Για την πραγματοποίηση της πέψης χρησιμοποιήθηκαν: 10x H Buffer, EcoRI, H₂O (nuclease free) και ποσότητα από το εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA.

Επώαστηκαν τα δείγματα στους 37° C για 2 ώρες και έπειτα προστίθενται 3μl 10x Loading Buffer έτσι ώστε να σταματήσει η αντίδραση.

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 2% αγαρόζης.

2.8.7 Αλληλούχιση κλωνοποιημένων προϊόντων.

Η αλληλούχιση των κλωνοποιημένων προϊόντων πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Macrogen Inc. με εκκινήτες τους επαγωγείς T7 και SP6 του φορέα κλωνοποίησης.

2.8.8 Αναζήτηση Ομόλογης Αλληλουχίας

Η αναζήτηση των ομόλογων αλληλουχιών έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής BLAST. Η αναζήτηση έγινε ανάμεσα σε ένα σύνολο αλληλουχιών που βρίσκονται καταχωρημένες στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (Gene Bank).

Το BLAST αναζητά τις πιο κοντινές αλληλουχίες που βρίσκονται στη Gene Bank σύμφωνα με την εισαγόμενη αλληλουχία και τις καταγράφει με μορφή πίνακα με σειρά μειωμένης συγγένειας.

2.8.9 Κατασκευή Φυλογενετικών δέντρων

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων ήταν το MEGA 4. Η μέθοδος που ακολουθείται είναι η ένωση γειτόνων με την χρήση της παραμέτρου p-distance.

Η παράμετρος p-distance εκφράζει την αναλογία των διαφορετικών ομόλογων θέσεων μεταξύ των αλληλουχιών και εκφράζεται ως ο αριθμός των νουκλεοτιδικών διαφορών ανά θέση.

Η στοίχιση ξεκινά πρώτα με τις δυο πιο κοντινές συγγενικές αλληλουχίες και στη συνέχεια προστίθενται σε σχέση με αυτές και οι υπόλοιπες. Η μέθοδος αποδίδει καλύτερα την φυλογένεση όταν διαφορετικές γενιές παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς τον εξελικτικό τους ρυθμό.

3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα Autonested και Seminested PCR

Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 10 δείγματα νερού που όπως προείπαμε προήρχοντο από γεωτρήσεις και χρησιμοποιούνται ως πόσιμο νερό και δυο θετικοί μάρτυρες.

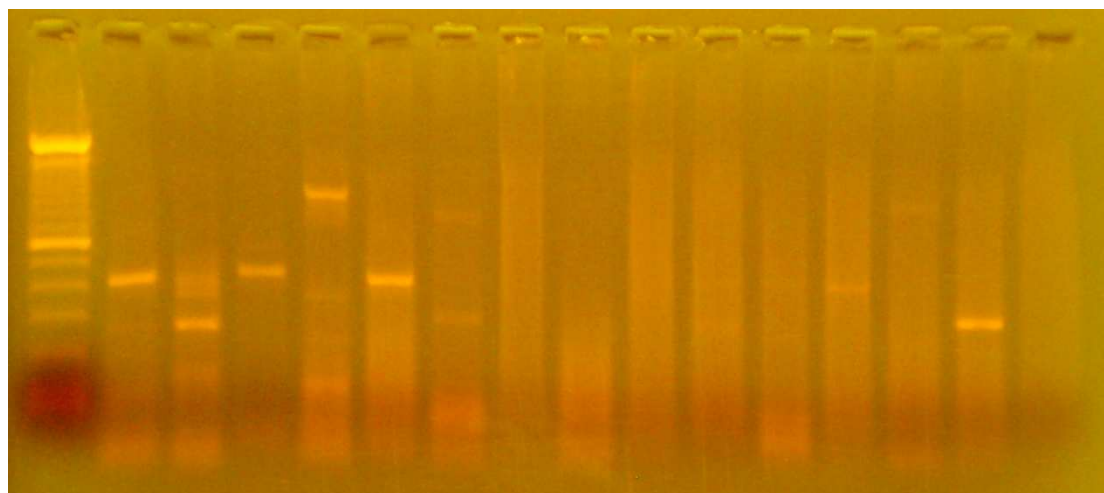
Κανένα δε βρέθηκε θετικό σε όλους του εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ενώ μόνο τέσσερα από αυτά βρέθηκαν να ενισχύονται με τουλάχιστον έναν από αυτούς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα Autonested- Seminested.

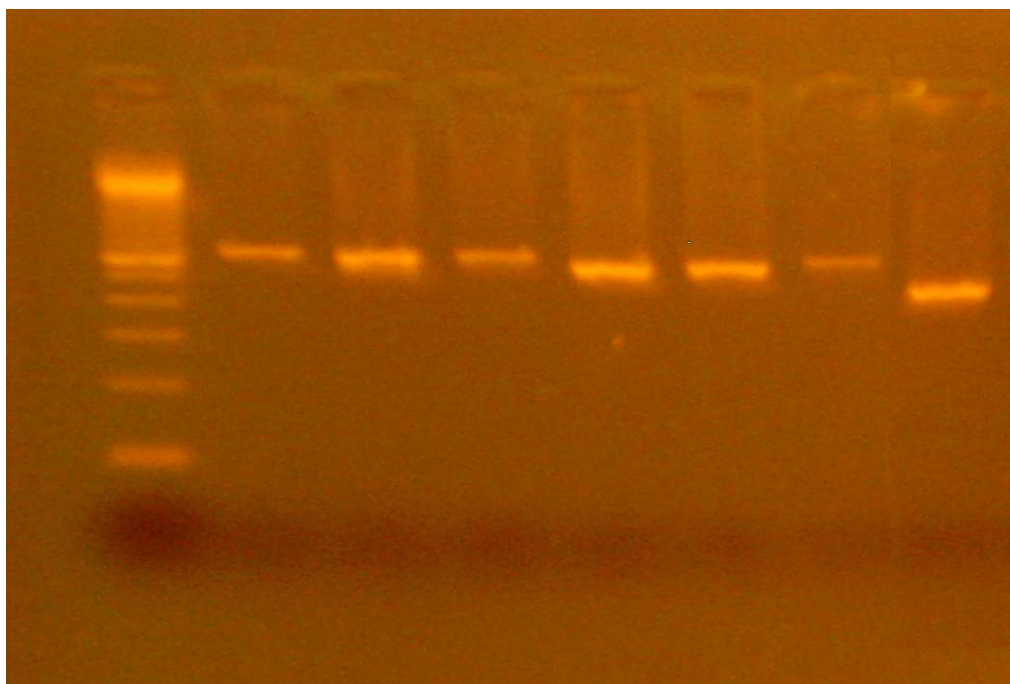
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	PCR ΠΡΟΙΟΝ
1	Mon381-383	321bp
ARM5	G2SKF- G2SKR	350bp
	NLVH 297- 896	600bp
AGK3	SRI 1,2,3	315bp
AG4	P78-P80	288bp
	SRII 1,2,3	513bp
	NLVH297-896	600bp

Επιλεκτικά παρατίθεται η φωτογραφία ενός θετικού δείγματος AG4 μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Είχε προηγηθεί *autonested* με τους εκκινητές P78 P80.

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
15



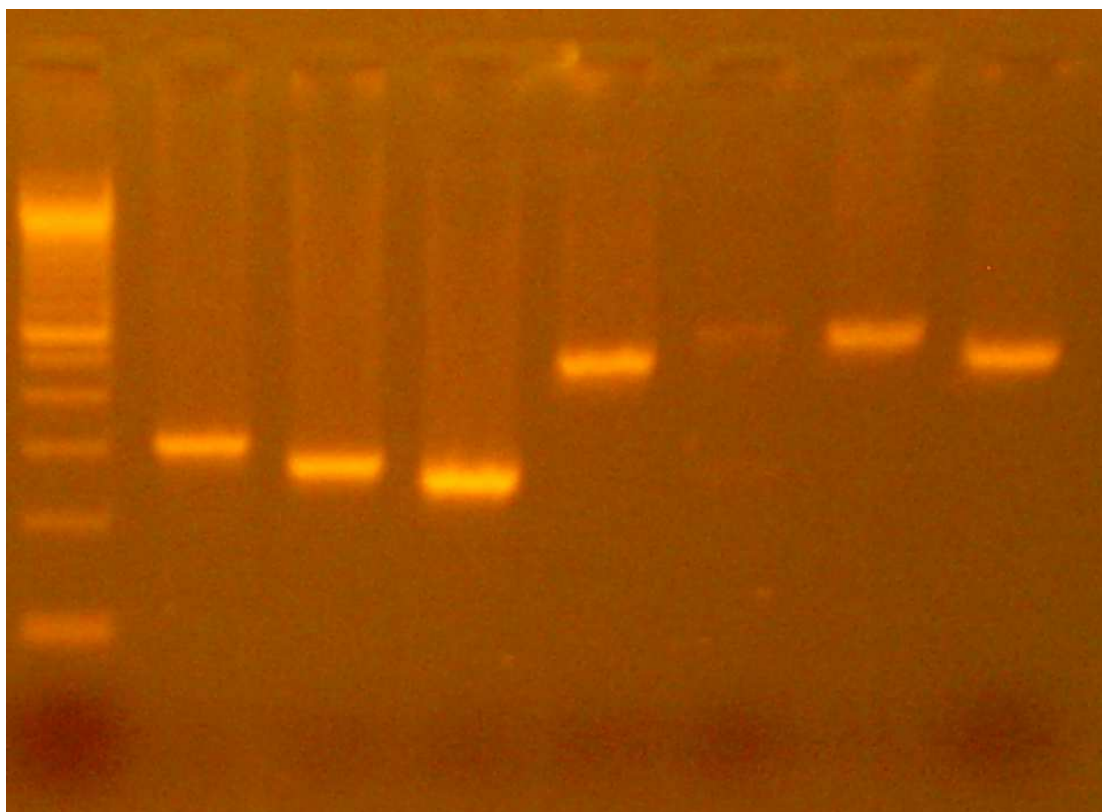
Εικόνα 9: L: Ladder DNA, δείγματα 1-6: δείγματα νερού (το AG4 είναι το 2), 7 αρνητικός μάρτυρας (νερό), 8-9: δείγματα νερού, 10: αρνητικός μάρτυρας, 11-12: δείγματα νερού, 13: θετικός μάρτυρας (1), 14: θετικός μάρτυρας (A6), 15: αρνητικός μάρτυρας (νερό). Σημειώνεται ότι το δείγμα 6 που φαίνεται να παρουσιάζεται ως θετικό, ύστερα από άλλους 25 κύκλους PCR επιπλέον, δεν παρουσίασε καμία ζώνη και έτσι λόγω του αχνού ίχνους του δεν θεωρείται θετικό. Επιπλέον ο θετικός μάρτυρας (1) στη θέση 13 δεν παρουσίασε με τους συγκεκριμένους εκκινητές θετικό ίχνος.



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση μετά τον καθαρισμό των θετικών δειγμάτων από το πήκτωμα αγαρόζης.

3.2 Αποτελέσματα GoTaq PCR

Η αντίδραση GoTaq PCR ήταν θετική σε όλα τα δείγματα. Συνολικά επεξεργάστηκαν 7 δείγματα, τα οποία ήταν θετικά στο προηγούμενο στάδιο. Παρουσιάζεται η φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης στο πήκτωμα αγαρόζης που ακολούθησε.



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση θετικών δειγμάτων μετά από GoTaq PCR.

3.3 Αποτελέσματα Μοριακής Κλωνοποίησης- Αλληλούχησης

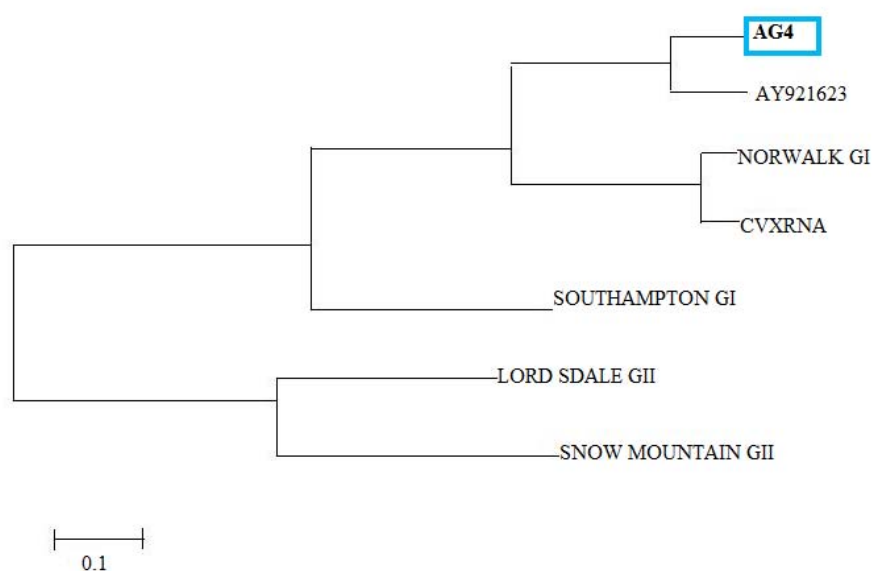
Ο πρώτος έλεγχος για την επιτυχή κλωνοποίηση πραγματοποιείται μέσω επίστρωσης των μετασχηματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει X-Gal. Θετικό αποτέλεσμα θεωρείται η παραγωγή λευκών αποικιών. Ο δεύτερος έλεγχος πραγματοποιείται με την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Μετά την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιβεβαιώνεται η επιτυχής σύνδεση του ενθέματος στο φορέα κλωνοποίησης.

Μετά την λήψη των χρωματογραφημάτων από την Macrogen Inc , τα δείγματα επεξεργάστηκαν με προγράμματα βιοπληροφορικής.

Από το πρόγραμμα Blast μόνο το δείγμα AG4 εμφάνιζε ομοιότητες με κάποιο στέλεχος Νοροϊών. Ειδικότερα με την γενετική ομάδα GI η οποία περιέχει

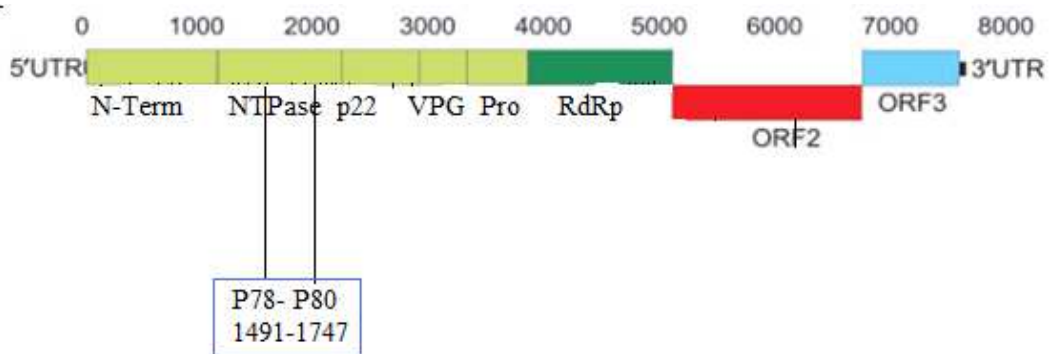
αρκετά παθογόνα για τον άνθρωπο όπως τους ιούς Southampton και ο Norwalk.

Το δείγμα νερού AG4 λήφθηκε από γεώτρηση του Δήμου Αγίας Λάρισας και σύμφωνα με το πρόγραμμα MEGA4 ταξινομείται στην ομάδα GI. Το στέλεχος του ιού που βρέθηκε, σχηματίζει υποομάδα με το στέλεχος AY921623 της GI γενετικής ομάδας που βρίσκεται καταχωρημένο στην Gene Bank.



Σχήμα 4: Φυλογενετικό δέντρο του AG4 στελέχους. Κατασκευάστηκε σε αντιστοιχία με την γενωμική περιοχή ORF1 (1491-1747).

Το συγκεκριμένο στέλεχος βρέθηκε ύστερα από την επεξεργασία του με το ζεύγος εκκινήτων P78-P80. Η απεικόνιση των θέσεων αναγνώρισης των συγκεκριμένων εκκινήτων φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 5: Απεικόνιση των θέσεων σύνδεσης των εκκινήτων P78 και P80 που ανίχνευσαν το θετικό δείγμα AG4.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολυάριθμοι ιοί μπορούν να βρεθούν στο ανθρώπινο έντερο αλλά μόνο ορισμένοι από αυτούς αναγνωρίζονται συνήθως ως τροφιμογενείς . Πολλοί από αυτούς ανήκουν στην κατηγορία των Νοροϊών. Οι νοροϊοί ευθύνονται για το 90% περίπου των ετήσια καταγεγραμμένων κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας σε όλες τις ηλικίες παγκοσμίως. Αν και όλες οι ηλικίες του πληθυσμού είναι ευαίσθητες στη μόλυνση από αυτόν οι ηλικιωμένοι εμφανίζονται πιο ευαίσθητοι στην προσβολή από τον ιό. Η περίοδος επώασης τους είναι 24-48 ώρες και τα συμπτώματα περιλαμβάνουν έμετο, διάρροια, κοιλιακό πόνο και άλλα συμπτώματα.

Η μόλυνση από τον νοροϊό διαδίδεται κυρίως μέσω της ανθρώπινης επαφής, της έκθεσης σε μολυσμένα αερολύματα και της περιττωματικής οδού, ενώ συνδέεται περισσότερο με την κατανάλωση μολυσμένων τροφών και υδάτων. Εστίες μόλυνσης εμφανίζονται συχνά σε κλειστές ή ημίκλειστες κοινωνίες, όπως στρατόπεδα, νοσοκομεία, φυλακές καθώς και κρουαζιερόπλοια, όπου η λοίμωξη μεταδίδεται πολύ γρήγορα.

Οι ιοί Νογο δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε κυτταροκαλλιέργειες και δεν υπάρχει κανένα γνωστό ζωικό πρότυπο. Η ανεπαρκής γνώση του μηχανισμού δράσης των Νοροϊών αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών φαρμάκων για την αντιμετώπισή τους. Μέχρι και σήμερα οι γιατροί με σκοπό την πρόληψη της εξάπλωσης της μόλυνσης από νοροϊούς συνιστούν την απομόνωση των κρουσμάτων, ενώ χορηγούν παρεντερικά ή δια στόματος υγρά και θεραπεία για την αποκατάσταση των αποβαλλόμενων ηλεκτρολυτών.

Η χρήση των μοριακών τεχνικών άνοιξε το δρόμο για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση πολλών μικροοργανισμών σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα,

όπως νερό (*Powell et al., 1995*), που μέχρι πρότινος δεν μπορούσαν να ανιχνευτούν λόγω των περιορισμών των μεθόδων κυτταροκαλλιέργειας.

Οι μοριακές τεχνικές έχουν τα παρακάτω πλεονεκτήματα:

- Ανίχνευση μικρών ποσοτήτων ιών (γονιδιωματικό RNA σε αραίωση) που περιέχεται σε <1pfu ιών. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε θεωρητικά ανιχνεύει έως και ένα μόνο ιϊκό σωματίο (*Puig et al., 1994*).
- Δεν χρειάζεται καλλιέργεια και συνεπώς μπορούν να ανιχνευθούν και οι δύσκολα καλλιεργήσιμοι ιοί (π.χ. ο ιός της ηπατίτιδας Α και οι Νορο ιοί).
- Ολοκληρώνονται σε 48-72 ώρες, ενώ οι καλλιεργητικές τεχνικές απαιτούν 15-20 ημέρες, γεγονός σημαντικό για τη Δημόσια Υγεία.
- Παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα.

Εντούτοις, η χρήση μοριακών τεχνικών εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα:

- Πρόκειται για δαπανηρές μεθόδους.
- Γίνεται ανίχνευση και των μη λοιμογόνων ιών.
- Απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και μηχανήματα ακριβείας.
- Υπάρχει ο κίνδυνος ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.
- Υπάρχει ο κίνδυνος αρνητικοποίησης των αποτελεσμάτων λόγω της παρουσίας αναστολέων.
- Δεν επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ μολυσματικών και μη μολυσματικών ιϊκών σωματιδίων, καθώς ανιχνεύεται μόνο η ύπαρξη του ιϊκού γονιδιώματος στο εξεταζόμενο δείγμα.

Στην εργασία αυτή, η διαδικασία συλλογής δειγμάτων ήταν από το Νομό Λάρισας και αφορούσε νερό που χρησιμοποιείται για πόση και επεξεργασία τροφίμων και το οποίο προέρχεται από γεωτρήσεις. Για την συγκέντρωση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσρόφησης και έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα. Στη συνέχεια η ανίχνευση των Νοροϊών έγινε με διαφορετικές μεθόδους. Αρχικά εφαρμόστηκε αντίστροφη μεταγραφή (RT PCR), ενώ στη συνέχεια εφαρμόστηκαν PCR, *autonested* PCR και *seminested* PCR. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν βοήθησαν

στην ανίχνευση μέρους του γενώματος του ιού και τελικά βοήθησαν στην αλληλούχιση μιας μικρής περιοχής του ORF1 (1491-1747 νουκλεοτίδια ενός δείγματος νερού με κωδικό όνομα AG4 το οποίο προήρχετο από γεώτρηση στο Δήμο Αγιάς.

Κατά την φυλογενετική ανάλυση του δείγματος αυτού, κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δέντρο για το πρώτο αναγνωστικό πλαίσιο ORF1. Το στέλεχος AG4 κατατάσσεται στην γενετική ομάδα Νοροϊών GI και σύμφωνα με την Gene Bank είναι συγγενικό φυλογενετικά του AY921623 και συγγενεύουν με τον ιό του Norwalk. Η γενετική συγγένεια με άλλα πρότυπα στελέχη όπως ο ιός Snow Mountain και Lord Sdale είναι πολύ μακρινή αφού αυτά τα στελέχη ανήκουν στην γενετική ομάδα GII.

Ορισμένα προβλήματα που δυσκολεύουν την ανίχνευση ιών σε περιβαλλοντικά δείγματα, και πιο συγκεκριμένα στα ύδατα, είναι:

- Το μικρό μέγεθος των ιών εντερικής προέλευσης (διάμετρος περίπου 20-100nm).
- Η μικρή συγκέντρωση των ιών στο νερό, καθώς και η ποικιλομορφία στην ποσότητα και στους τύπους υδάτων που ανευρίσκονται ανάλογα με την εποχή .
- Η γενετική αστάθεια των ιών.
- Οι διάφορες διαλυμένες ουσίες στο νερό που δρουν ως αναστολείς των τεχνικών ανίχνευσης των ιών.
- Οι διάφοροι περιορισμοί για τον υπολογισμό και την ταυτοποίηση των ιών εντερικής προέλευσης που υπάρχουν σε όλες τις τεχνικές.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την ανίχνευση των ιών δείχνουν αξιοπιστία και επαναληψιμότητα. Συνεπώς είναι μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από εξειδικευμένα εργαστήρια για την εύρεση της μικροβιακής ποιότητας των υδάτων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

Πρέπει να συμπεριληφθεί η αναζήτηση ιών στον μικροβιολογικό έλεγχο του πόσιμου νερού;

Μεγάλος αριθμός εντερικών μικροοργανισμών μπορούν να εισέλθουν στο υδάτινο περιβάλλον μέσω των κοπράνων των μολυσμένων ατόμων. Όταν η ποσότητα των μολυσμένων λυμάτων που αναμιγνύονται με το νερό είναι αρκετά μεγάλη, και ακολουθεί ανεπαρκής ή μηδαμινή επεξεργασία τότε είναι πολύ πιθανό να προκληθεί υδατογενής επιδημία. Αυτή η πιθανότητα αυξάνεται όταν οι άνθρωποι χρησιμοποιούν ως πόσιμο νερό, ύδατα που προέρχονται από γεωτρήσεις χωρίς να προηγηθεί καμία επεξεργασία του νερού, όπως η απαραίτητη χλωρίωση. Ακόμα και αν τα μολυσμένα λύματα επεξεργαστούν σε μονάδες βιολογικού καθαρισμού, δεν είναι απολύτως σίγουρο ότι οι ιοί έχουν απενεργοποιηθεί εντελώς.

Οι νοροϊοί δείχνουν να αδρανοποιούνται έπειτα από επαρκή θέρμανση, είτε έπειτα από καθαρισμό με απολυμαντικά χλωρίου. Η ικανότητά τους να επιβιώνουν στο νερό είναι μεγαλύτερη από αυτή των βακτηρίων που μέχρι τώρα συμπεριλαμβάνονται στον μικροβιολογικό έλεγχο του νερού, καθώς μπορούν να επιβιώσουν από εβδομάδες έως και μήνες. Η συγκέντρωση των ιών που μπορεί να απομονωθεί από τα επιφανειακά νερά ποικίλει αν και οι νοροϊοί δεν δείχνουν να εμφανίζουν κάποια σημαντική εποχικότητα.

Στον Ελλαδικό χώρο το Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ) επιτηρεί τις επιδημίες-συρροές τροφιμογενούς- υδατογενούς νοσήματος μέσω του συστήματος υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων.

Κατά το χρονικό διάστημα 2004-2008 δηλώθηκαν συνολικά 4 συρροές κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας από Νοροϊούς στην Ελλάδα. Σημειώνεται ότι τα δεδομένα που παρατίθενται, αφορούν *δηλωθείσες* συρροές στο σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης.

Πίνακας 8: Αριθμός δηλωθεισών συρρών κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας από Νοροϊούς στην Ελλάδα. Σύνολο χώρας, έτη δήλωσης 2004-2008 (πηγή ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ).

Έτος	Αριθμός συρρών
2004	0
2005	2
2006	1
2007	1
2008	0
Σύνολο	4

Πίνακας 9: Κατανομή δηλωθεισών συρρών κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας από Νοροϊούς ανά περιοχή. Σύνολο χώρας, έτη δήλωσης 2004-2008 (πηγή ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ).

Περιοχή συρροής	Έτη					Σύνολο
	2004	2005	2006	2007	2008	
ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	0	0	0	1	0	1
ΣΤΡΑΤΟΠΕΔΟ ΝΑΥΠΛΙΟΥ	0	1	0	0	0	1
ΞΑΝΘΗ	0	1	1	0	0	2
ΣΥΝΟΛΟ	0	2	1	1	0	4

Πίνακας 10: Κατανομή κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας και εργαστηριακά επιβεβαιωμένων κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας από Νοροϊούς, ανά περιοχή και έτος (πηγή ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ)

ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΡΡΟΗΣ-ΕΤΟΣ	ΚΡΟΥΣΜΑΤΑ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΤΙΔΑΣ	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΑ ΚΡΟΥΣΜΑΤΑ
ΣΤΡΑΤ. ΝΑΥΠΛΙΟΥ-2005	38	6
ΞΑΝΘΗ- 2005	702	15
ΞΑΝΘΗ-2006	Μη διαθέσιμα στοιχεία	32
ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ- 2007	37	1

Σημειώνεται ότι 1) με εξαίρεση τη συρροή που παρατηρήθηκε στην Καλαμπάκα το 2007, οι υπόλοιπες τρεις συρροές θεωρήθηκε ότι ήταν υδατογενείς και 2) οι παθογόνοι μικροοργανισμοί απομονώθηκαν μεν στα κόπρανα των ασθενών, αλλά δεν υπάρχει αντίστοιχη εργαστηριακή επιβεβαίωση και στα εμπλεκόμενα τρόφιμα-νερό για να γίνει επιβεβαίωση του υπεύθυνου για τη συρροή μικροοργανισμού.

Σύμφωνα με τα παρεχόμενα στοιχεία από το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ παρουσιάζεται ότι στην Ελλάδα, υπάρχουν κρούσματα γαστρεντερίτιδας που οφείλονται σε Νοροϊούς τα τελευταία χρόνια. Όμως η επιβεβαίωση ότι το πρόβλημα υφίσταται στο νερό που καταναλώθηκε από τους ανθρώπους που νοσήσανε δεν υπάρχει, από τη στιγμή που δεν υπάρχει οργανωμένος και τακτικός έλεγχος όσον αφορά τον έλεγχο ιών στο νερό.

Αυτή τη στιγμή η νομοθεσία για τον έλεγχο του πόσιμου νερού περιλαμβάνει χημικές παραμέτρους, μικροβιολογικές παραμέτρους αλλά καμία ιολογική παράμετρο. Δεν υπάρχει κανένα στοιχείο ιολογικού ελέγχου των υδάτων που είναι υπεύθυνα για κρούσματα γαστρεντερίτιδας ακόμα και όταν είναι υπεύθυνα για συρροή πολλών κρουσμάτων. Για την επεξήγηση της προέλευσης τους, χρησιμοποιείται ο όρος «θεωρήθηκε ως υδατογενές», μόνο από τις μαρτυρίες των ανθρώπων ότι κατανάλωσαν νερό από συγκεκριμένη περιοχή .

Υποστηρίζεται ότι έλεγχος για ιούς στο πόσιμο νερό είναι ανώφελο να γίνει λόγω μικρής ποσότητας ιικών σωματιδίων που είναι ικανά να δημιουργήσουν κρούσματα γαστρεντερίτιδας, καθώς επίσης αναλύεται και το κόστος των ιολογικών αναλύσεων για κάθε δείγμα νερού. Επίσης σημειώνεται η έλλειψη εξοπλισμού των εργαστηρίων για ιολογικές αναλύσεις καθώς και η έλλειψη τεχνογνωσίας.

Η συγκεκριμένη μελέτη για την παρουσία των Νοροϊών σε πόσιμα ύδατα οδήγησε σε χρήσιμα συμπεράσματα. Η μελέτη διεξήχθη σε περιορισμένο αριθμό δειγμάτων μόνο στο Νομό Λάρισας. Απαιτείται λοιπόν περαιτέρω μελέτη προκειμένου να προσδιοριστεί η έκταση της παρουσίας των Νοροϊών στους υδάτινους χώρους του υπόλοιπου Ελλαδικού χώρου.

Μέσα από την εργασία αυτή υποστηρίζεται η προσθήκη της αναζήτησης ιών στον τακτικό μικροβιολογικό έλεγχο του πόσιμου νερού, όχι μόνο όταν αυτό θεωρείται υπεύθυνο για την εμφάνιση κρουσμάτων αλλά και ως προληπτικό μέτρο κατά των ιών που προκαλούν τέτοια συμπτώματα. Θα πρέπει να συμπεριληφθεί στον έλεγχο όλων των υδάτινων πόρων της Ελλάδας αλλά και ως Κανονισμός μέσω της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ο έλεγχος για ιούς όπως οι ιοί Νορο, ο ιός της ηπατίτιδας Α, οι εντεροϊοί και οι εντερικοί αδενοϊοί. Θα πρέπει να δοθεί έμφαση στη δημιουργία προγράμματος που θα ελέγχει όλα τα ύδατα που προέρχονται από γεωτρήσεις και προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

Πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι ένα μεγάλο ποσοστό ακόμα των Ελλήνων χρησιμοποιεί νερό για καθημερινή κατανάλωση που προέρχεται από ιδιόκτητες ή δημόσιες γεωτρήσεις και στις οποίες η επεξεργασία των υδάτων είναι τουλάχιστον ελλιπής .

Τα κεντρικά συμπεράσματα της εργασίας αυτής είναι δυο.

Πρώτον ότι αν και εξετάστηκαν λίγα περιβαλλοντικά δείγματα πόσιμου νερού, ανιχνεύθηκε σε ένα από αυτά στέλεχος νοροϊών. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ιοί υπάρχουν στο υδάτινο περιβάλλον και δύνανται να εισέλθουν μετά από πόση στον ανθρώπινο οργανισμό.

Και δεύτερον ότι η απάντηση στο ερώτημα , αν πρέπει να συμπεριληφθεί η αναζήτηση ιών στον μικροβιολογικό έλεγχο του πόσιμου νερού , θα πρέπει να είναι καταφατική, μιας και στο πόσιμο νερό μπορούν να ανιχνεύονται Νοροϊοί.

5. Βιβλιογραφία

- Wheeler, D., 1990. The pollution of beaches by viruses. In House of Commons Environment Committee Inquiry into the Pollution of Beaches. Appendices to the minutes of evidence, pp24-39. HMSO, London
- Anderson, A.D., V.D. Garrett, J. Sobel, S.S. Monroe, R.L. Fankhauser, and K.J. Schwab, 2001. Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. *Am. J. Epidemiol.*, 154:1013–9.
- Melnick, J.L., 1984. Etiologic agents and their potential for causing waterborne virus diseases. *Monogr. Virol.*, 15:1-16
- Seymour, I.J. and Appleton., 2001. Foodborne viruses and fresh produce. *J. App. Microbiol.*,91:759-773
- Fankhauser, R.L., J.S. Noel, S.S. Monroe, T. Ando, and R.I. Glass, 1998. Molecular epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.*, 178:1571–8.
- Fankhauser, R.L., S.S. Monroe, J.S. Noel, C.D. Humphrey, J.S. Bresee, U.D. Parashar, T.Ando, and R.I. Glass, 2002. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk like Viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.*,186(1):1-7.
- Pato, R., P.L. Lopalco, M. Chironna, G. Barbuti, C. Germinario, and M. Quarto, 2004. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy. *BMC Infec. Dis.*, 4:37
- Payment, P., E. Franco, and G.S. Fout., 1994. Incidence of Norwalk virus infections during a prospective epidemiological study of drinking water related gastrointestinal illness. *Can. J. Microbiol.*, 40:805-809
- Shieh Y.S.C., R.S. Baric, J.W. Woods, and K.R. Calci, 2003. Molecular Surveillance of Enterovirus and Norwalk-Like Virus in Oysters Relocated to a Municipal-Sewage-Impacted Gulf Estuary. *Appl. Environ, Microbiol.*, 69 (12):7130-7136

- Mayo, M.A., 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.*, 8:1655-1656.
- Kapikian, A.Z., M.K. Estes, R.M.Chanock., 1996. *Norwalk Group of Viruses. Fields Virology*, 3rd Edition. Ed. Fields BN, Knipe,DM, Howley PM, et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996; Ch. 25, 783-810
- Drapal, J., K. Ettlerova, J. Hajslova, P. Hlubik, M. Jechova, M. Kozakova, F. Malir, V.Ostry, J. Ruprich, J. Sosnovcova, V. Spelina, and D. Winklerova, 2003. Microbiological contaminants in foodstuff (in Czech). Vedecky Vybor pro Potraviny, VVP:MIKRO/2003/2, 29pp. http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/mikro_2003_2_deklas.pdf
- Lindqvist, R., Y. Andersson, and J. Lindbäck, 2001. A one-year study of foodborne illness in the municipality of Uppsala, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(suppl): 588-592.
- Mead, P.S., L. Slutsker, and V. Dietz, 1999 Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5:607-625
- Hedlund, K.O., E. Rubilar-Abreu, and L.Svensson, 2000. Epidemiology of Calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. *J. Infect. Dis.*, 181(suppl 2):275-80.
- Gerba, C.P., C. Wallis, and J.L. Melnick, 1975. Viruses in water: the problem, some solutions. *Environ. Sci. Technol.*, 9:1122-1126
- Griffin, D.W., K.A Donaldson, J.H. Paul, and J.B. Rose, 2003. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16:129–143
- Koopman, J.S., E.A. Eckert, H.B. Greenberg, B.C. Strohm, and R.E. Isaacson, 1982. Monto. Norwalk virus enteric illness acquired by swimming exposure. *Am. J. Epidemiol.*, 115: 173-177
- Bosch, A., 1998. *Int. Microbiol.*, 1: 191-196
- Bitton, G., G.E. Maruniak, and F.W. Zettler, 1987. Virus survival in natural ecosystems, in survival and Dormancy of microorganisms, Y. Henis Wiley (ed), pp. 302-332.

- Craun, G.F, 1978. Impact of the coliforms standard on the transmission of disease, in Evaluation of the microbiology standards for drinking water, Hendricks C.W. (ed), USEPA-57019-78-OOC.Washington D.C.
- Daniels, N.A., D.A. Bergmire-Sweat, K.J. Schwab, K.A. Hendricks, S. Reddy, and S.M.Rowe, 2000. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J. Infect. Dis.*,181:1467–70.
- Dedman, D., H. Laurichesse, E.O. Caul, and P.G. Wall, 1998. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990–5. *Epidemiol. Infect.*, 121:139–49.
- Eaton, A. D., L.S. Clesceri, and A.E. Greenberg, 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater* (20th ed.), American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Baltimore, MD
- Evans, A., R. Kaslow, eds, 1997. *Viral Infections in Humans: epidemiology and control*. 4th ed. New York: Plenum:119-38
- Fields, B., D.M. Knipe, and P.M. Howley, 2007. *Field Virology* 5th ed. Lippincott Raven Chapter 28,section II
- Girones, R., J. Jofre, and A. Bosch, 1989. Natural Inactivation of Enteric Viruses in Seawater, *J. Environ. Qual.*, 18:34-39.
- Glass, R.I., J. Noel, T. Ando, R. Fankhauser, G. Belliot, and A. Mounts, 2000. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J.Infect. Dis.*, 181(Suppl 2):S254–61
- Gray, J.J., X. Jiang, P. Morgan-Capner, A. Desselberger, M.K. Estes., 1993. Prevalence of antibodies to Norwalk virus in England: detection by enzyme-linked immunosorbent assay using baculovirus expressed Norwalk virus capsid antigen. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 1022-1025.
- Gunn, R.A., H.T. Janowski, S. Lieb, E.C. Prather, and H. Greenberg, 1982. Norwalk virus gastroenteritis following raw oyster consumption. *Am. J. Epidemiol.*, 115:348-351

- Hayward, K., 1999. Phages gain ground as water quality indicators. *Water 21*, November- December 1999: 36-37
- Havelaar, A.H., M. Olphen, and Y. Drost, 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environm. Microbiol.*, 59:2956-2959.
- Heid, C.A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M: Williams, 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6:986-994
- West, P.A, 1991. Human pathogenic viruses and parasites: emerging pathogens in the water cycle. *J. Appl. Bacteriol. Sympos. Suppl.*, 70:107S-114S
- Vinjé, J., and M.P. Koopmans, 1996. Molecular detection and epidemiology of small roundstructured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.*, 174:610–5.
- Vainio, K., K. Stene-Johansen, T. O. Jonassen, A.-L. Bruu, and B. Grinde, 2001. Molecular epidemiology of calicivirus infections in Norway. *J. Med. Virol.*, 65:309-314
- Tree, J.A., M.R. Adams and D.N. Lees, 2005. Disinfection of feline calicivirus (a surrogate for Norovirus) in wastewaters. *J. Appl. Microbiol.*, 98:(1) 155-162
- Sunen, E., and M.D. Sobsey, 1999. Recovery and detection of enterovirus, hepatitis A virus and Norwalk virus in hardshell clams (*Mercenaria mercenaria*) by RT-PCR methods. *J. Virol. Methods*, 77:179-187
- Stent, G., 1963. Molecular Biology of Bacterial Viruses. Freeman
- Puig, M., J. Jofre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell, and R. Girones, 1994. Detection of adenovirus and enterovirus in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:2963-2970
- Mosley, J.W., 1967. Transmission of viral disease by drinking water, p.5-23, In G.Berg (ed.), Transmission of Viruses by the water route. Interscience, New York
- Melnick, J.L., and C.P. Gerba, 1980. The ecology of enteroviruses in natural waters. *Crit. Rev. Environ. Control.*, 10:65

- Marzouk, Y., S.M. Goyal, and C.P. Gerba, 1980. Relationship of viruses and indicator bacteria in water and wastewater of Israel. *Wat. Res.*, 14:1585-1590.
- Maguire, A. J., J. Green, D.W.G. Brown, U. Desselberger, and J.J. Gray, 1999. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round-structured viruses in East Anglia, United Kingdom, during the 1996-1997 season. *J. Cli. Microbiol.*, 37:81-89.
- Kopecka, H., S. Dubrou, J. Prevot, J. Marecahl, and J.M. Lopez-Pila., 1993. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction and hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:1213-1219
- Koopmans, M., J. Vinjé, M. de Wit, I. Leenen, W. van der Poel, and Y. van Duynhoven, 2000. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *J. Infect. Dis.*,181(Suppl. 2):S262-S269).
- Keswick, B. H., T. K. Satterwhite, P. C. Johnson, H. L. DuPont, S. L. Secor, J. Bitsura, G. W.Gary, and J. C. Hoff, 1985. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:261-264
- IAWPRC Study group on Health Related Water Virology, 1983. The health significance of viruses in water. *Water Res.*, 17:121-132.
- IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.*, 25:529-545
- Horne R.W. and P. Wildy, 1961. Symmetry in virus structure. *Virology*, 15:348-373.
- Ming Tan , Pingan Fang , Teepanis Chachiyo , Ming Xia , Pengwei Huang , Zhaoyin Fang ,Wen Jiang , Xi Jiang, 2008, Noroviral P particle: Structure, function and applications in virus–host interaction,*Virology* 382 (2008) 115–123
- Anne M. Hutson, Robert L. Atmar, and Mary K. Estes, 2004, Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors, *TRENDS in Microbiology* Vol.12 No.6 June 2004

- Ming Tan and Xi Jiang, 2005, Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle, TRENDS in Microbiology Vol.13 No.6 June 2005
- Miyuki Asanaka, Robert Atmar, Vivian Ruvolo, Sue Crawford, 2004, Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells
- Kenneth K., Natalia Pendas, Jorge Rojo, 2000, Crystal Structure of Norwalk virus Polymerase Reveals the Carboxyl Terminus in the active Site Cleft
- Salvador Ausar et al, 2006, conformational stability and disassembly of Norwalk Virus-like Particles, journal of biological chemistry, Vol. 281 No 28, pp 19478-19488
- Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, 2005, Norovirus and foodborne diseases, USA 1991-2000, Dis 11 (1):95-102
- Goodgame R, 2006, Norovirus gastroenteritis, Gurr Gastroenterol Rep 8 (5):401-8
- ICTVdB, 2006, Norovirus Global database 4th edition, Columbia university, USA
- www.ligocyte.com/downloads/Noro.pdf υποψήφιου εμβολίου Norovirus από Ligocyte