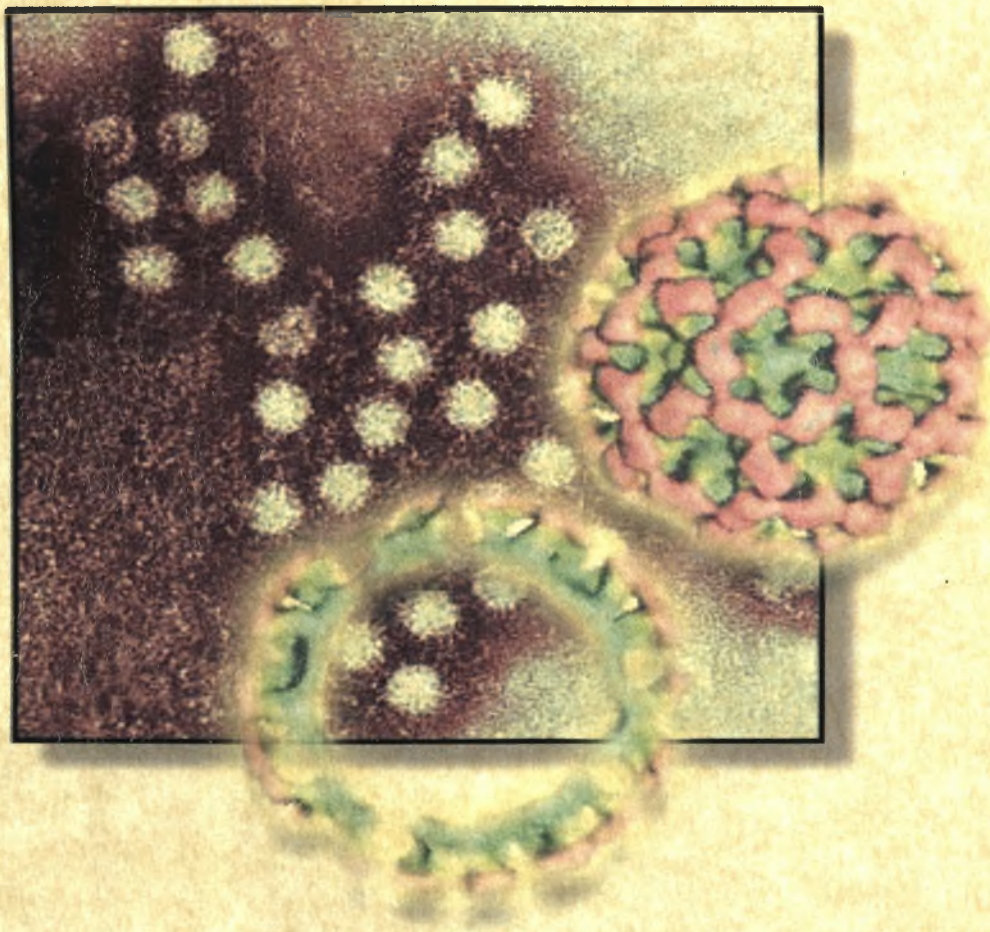


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Μοριακή Ανίχνευση Νοροϊών Σε Κλινικά Δείγματα Κοπράνων



Επιβλέπων καθηγητής: Π. Μαρκουλάτος

ΧΡΙΣΤΟΓΙΑΝΝΗ ΙΩΑΝΝΑ

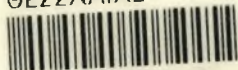
Λάρισα 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7364/1
Ημερ. Εισ.: 10-09-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΧΡΙ

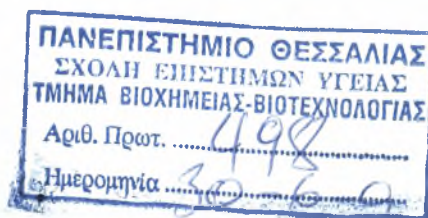
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087196

Στοιχεία Πτυχιακής Εργασίας

Επιβλέπων καθηγητής : Π. Μαρκουλάτος



Τριμελής Επιτροπή:

Π. Μαρκουλάτος Καθηγητής Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζ. Μαμούρης Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δ. Κομιώτης Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση βιοδραστικών μορίων του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ημερομηνία κατάθεσης πτυχιακής εργασίας : 26 – 06 - 2009

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το πειραματικό μέρος της συγκεκριμένης εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2008 – Απρίλιος 2009 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου κύριο Ζήση Μαμούρη και Δημήτριο Κομιώτη που με ευχαρίστηση δέχτηκαν να συμμετάσχουν στη τριμελή επιτροπή για τη παρούσα μελέτη.

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου και την βαθύτερη εκτίμησή μου θα ήθελα να εκφράσω στον καθηγητή μου κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο τόσο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου για την ανάθεση τις συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας όσο και για τις γνώσεις και τη στήριξη που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής εργασίας. Οι γνώσεις του και οι συμβουλές του πάνω στο αντικείμενο ήταν πάρα πολύ σημαντικές για μένα και θα με ακολουθούν συνέχεια στην περαιτέρω σταδιοδρομία μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Πιλιάκα Βίκυ και τον μεταπτυχιακό σπουδαστή Τσακογιάννη Δημήτριο για την βοήθεια τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους τόσο στον εργαστηριακό τομέα όσο και στο να μπορέσουν να ξεπεραστούν τα όποια εργαστηριακά προβλήματα προέκυψαν.

Ιδιαίτερα όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τον φίλο και συνάδελφο Ιωάννη Μουστάκα με τον οποίο πραγματοποιήσαμε το μεγαλύτερο μέρος των πειραμάτων καθώς η βοήθειά του ήταν πολύτιμη για τη πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας, τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο. Τον εκτιμώ ιδιαίτερα τόσο για την αρμονική συνεργασία όσο και για την συμπαράσταση, υπομονή, επιμονή και εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Σταμάτιο και Μαρία, για την συμπαράστασή τους καθώς και για τις θυσίες και τον αγώνα που έκαναν τόσα χρόνια προσφέροντάς μου όλα τα απαραίτητα αγαθά, υλικά και ψυχικά, για τη πραγματοποίηση των σπουδών μου.

Την εργασία αυτή την αφιερώνω στους γονείς μου και στο φίλο μου Χρήστο για την απεριόριστη υπομονή και κατανόηση που έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	6
1.Εισαγωγή.....	7
1.1 Ιστορική Αναδρομή	7
1.2 Βιολογία των Νοροϊών	9
1.2.1 Ταξινόμηση	9
1.2.2 Οργάνωση Γονιδιώματος.....	10
1.2.3 Δομή Ιοσωματίου.....	12
1.2.4 Δομικές Πρωτεΐνες.....	16
1.2.5 Μη Δομικές Πρωτεΐνες	17
1.2.5.1 Πρωτεολυτική Επεξεργασία του ORF1.....	17
1.2.5.2 Δομή μη Δομικών Πρωτεϊνών και Λειτουργία.....	18
1.3 Αντιγραφή-Μετάφραση.....	20
1.4 Κύκλος ζωής των Νοροϊών	22
1.4.1 Είσοδος και Περίοδος Επάσης.....	22
1.4.2 Περιοχή Αρχικής Αντιγραφής.....	22
1.4.3 Απελευθέρωση από τον ξενιστή.....	24
1.5 Ανοσία.....	25
1.5.1 Αντιγονικές σχέσεις των Νοροϊών	26
1.6 Εύρος Ξενιστών.....	27
1.7 Μοριακή Επιδημιολογία.....	28
1.7.1 Ο Επικρατής ρόλος των Νοροϊών στην Επιδημική Γαστρεντερίτιδα.....	29
1.8 Μετάδοση.....	30
1.8.1 Πορείες Μόλυνσης.....	30
1.8.2 Τρόποι Μετάδοσης.....	30
1.9 Επικράτηση και Επίπτωση του Calicivirus στην Ευρώπη.....	34
1.9.1 Εποχικότητα.....	34
1.9.2 Ηλικιακή κατανομή	34
1.10 Παθογένεση.....	35
1.11 Κλινική Εικόνα.....	36
1.12 Υποθετική Διάγνωση.....	37
1.13 Μέθοδοι Εργαστηριακής Διάγνωσης.....	38
1.13.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία.....	38
1.13.2 Ανοσοδοκιμές.....	38
1.13.3 Μοριακές τεχνικές.....	38
1.13.4 Επιδημιολογικές Μέθοδοι.....	40
1.14 Θεραπεία.....	42
1.15 Εμβόλια κατά των Νοροϊών	43
1.16 Πρόληψη και Έλεγχος.....	44
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	45
2.1 Πειραματικά Στελέχη.....	45

2.1.1 Θετικά στελέχη.....	45
2.1.2 Κλινικά δείγματα.....	45
2.2 Επεξεργασία Κοπράνων.....	47
2.3 Εκχύλιση ιϊκού RNA.....	47
2.4 Αντίστροφη Μεταγραφή (RT-Reverse Transcription).....	47
2.5 Εκκινητικά Μόρια.....	49
2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	52
2.6.1 PCR.....	52
2.6.2 Semi-nested PCR.....	52
2.6.3 Auto-nested PCR.....	53
2.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR.....	57
2.8 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR και Αλληλ.ούχιση.....	57
2.9 Επεξεργασία Νουκλεοτιδικών Αλληλουχιών.....	58
2.9.1 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.....	58
2.9.2 Αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας.....	58
3. Αποτελέσματα.....	60
3.1 Αποτελέσματα PCR για την γενετική ομάδα GI.....	60
3.2 Αποτελέσματα PCR για την γενετική ομάδα GII.....	62
3.3 Αποτελέσματα Αλληλούχισης.....	64
4. Συζήτηση.....	65
5. Βιβλιογραφία.....	68

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οικογένεια Caliciviridae αποτελείται από μικρούς (27-40 nm), χωρίς κάλυμμα, ιούς με εικοσαεδρική συμμετρία καψιδίου που διαθέτουν ένα γραμμικό, θετικής πολικότητας, μονόκλωνο RNA γένωμα. Τα τέσσερα γένη της οικογένειας είναι οι : Norovirus, Sapovirus, Vesivirus και Lagovirus. Τα σημαντικότερα από ιατρικής άποψης παθογόνα στην οικογένεια είναι οι Noroviruses και Sapoviruses, τα οποία προκαλούν την οξεία γαστρεντερίτιδα. Τα σημαντικότερα κτηνιατρικά παθογόνα περιλαμβάνουν τους Vesiviruses όπως είναι ο calicivirus των αιλουροειδών (Feline Calicivirus), που προκαλεί μια αναπνευστική ασθένεια στις γάτες, και τους lagoviruses που προκαλεί μια αιμορραγική ασθένεια στα κουνέλια.

Οι Νοροϊοί είναι η κύρια αιτία της μη βακτηριακής επιδημικής γαστρεντερίτιδας, μια ασθένεια που συνήθως εμφανίζεται σε μια οικογένεια ή ξεσπά στο εύρος μιας κοινότητας. Πρέπει να σημειωθεί ότι και οι Noroviruses και οι Sapoviruses έχουν συνδεθεί με την γαστρεντερίτιδα στα νήπια και στα μικρά παιδιά.

Ο ιός Norwalk, αποτελεί πρότυπο στέλεχος των Νοροϊών, και οι Norwalk-like viruses (που επίσης καλούνται round structured) εντοπίστηκαν σε πόσιμο νερό, ανακυκλώσιμο νερό και θαλάσσια οστρακόδερμα. Διαφορετικές ομάδες RNA ιών συχνά προκαλούν γαστρεντερίτιδα με διάρροια ή/και εμετό, πυρετό και αναπνευστικά συμπτώματα που διαρκούν περίπου 2 ημέρες.

Η παρούσα εργασία ασχολείται με την ανίχνευση των Νοροϊών, σε κλινικά δείγματα (κόπρανα) ασθενών που παρουσίασαν τα προαναφερθέντα κλινικά συμπτώματα. Πιο συγκεκριμένα στοχεύει στην ανίχνευση Νοροϊών που ανήκουν στις γενετικές ομάδες GI και GII, μέσω των παρακάτω βημάτων: εκχύλιση του ιϊκού RNA, αντίστροφη μεταγραφή του ιϊκού RNA και μετατροπή σε cDNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων για την ενίσχυση της κάθε περιοχής και αλληλούχιση των προϊόντων της PCR. Στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία των αλληλουχιών των δειγμάτων με ειδικά προγράμματα βιοπληροφορικής για τον εντοπισμό στελεχών Νοροϊών.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η καθιέρωση μιας αιτιολογίας προερχόμενης από ιό για την γαστρεντερίτιδα ήταν μια μακροχρόνια διαδικασία που εμποδίστηκε από την πολύπλοκη φύση πολλών από αυτούς τους ιούς σχετικά με την ανάπτυξη σε κυτταροκαλλιέργεια (Knipe, David M. Howley, Peter M. , Fields Virology, 5th Edition).

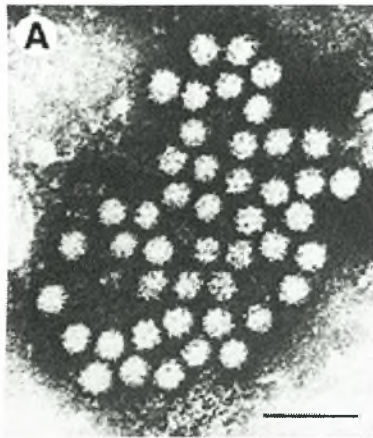
Το 1968 ένα κρούσμα οξείας γαστρεντερίτιδας (ασθένεια εμετού κατά την περίοδο του χειμώνα) συνέβη μεταξύ μαθητών και δασκάλων σε ένα σχολείο στο Norwalk του Ohio . Το αρχικό εύρος προσβολής ήταν 50% με ένα δεύτερο εύρος προσβολής 32%. Η ασθένεια χαρακτηρίστηκε από ναυτία και εμετό σε >90% και διάρροια στο 38% των άρρωστων ατόμων και η διάρκεια της ασθένειας ήταν συνήθως 12-24 ώρες. Ακολούθως, κόπρανα απαλλαγμένα από οργανισμούς, που προέρχονταν από τα προσβεβλημένα άτομα προκάλεσαν την ίδια ασθένεια σε εθελοντές ανθρώπους , και αποδείχθηκε ότι ο αιτιολογικός παράγοντας ήταν ένας μικρός (<36 nm), αιθερο-ανθεκτικός (χωρίς κάλυμμα), σχετικά σταθερός στη θέρμανση ιός .Οι προσπάθειες όμως για πολλαπλασιασμό του αιτιολογικού παράγοντα σε κυτταροκαλλιέργειες ήταν ανεπιτυχείς (Dolin et al 1972).

Το 1972 ο Karikian και λοιποί, χρησιμοποίησαν ανοσο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (immune electron microscopy IEM) για να αναγνωρίσουν ιϊκά μόρια 27nm, τον παράγοντα Norwalk, σε φιλτραρισμένα κόπρανα που χρησιμοποιήθηκαν για να προκαλέσουν ασθένεια σε ανθρώπους εθελοντές (Εικόνα 1). Τα ιϊκά μόρια είχαν καθιζάνει σε μια αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος χρησιμοποιώντας ορό κατά την φάση της ανάρρωσης από εθελοντές που αρρώστησαν μετά τον εμβολιασμό με τα φιλτραρισμένα κόπρανα και τα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος οπτικοποιήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία (EM). Στη συνέχεια η δοκιμή τροποποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αντισώματος στον ορό και αποδείχθηκε ότι σημαντικά περισσότερα αντισώματα ήταν παρόντα στον ορό κατά την φάση ανάρρωσης σε αντίθεση με τον ορό οξείας φάσης. Εξαιτίας αυτών των στοιχείων , ο ιός Norwalk (NV) προτάθηκε ως ο αιτιολογικός παράγοντας της γαστρεντερίτιδας στο Norwalk του Ohio (Carter et al 1991).

Το 1976 τα τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των caliciviruses αναγνωρίστηκαν σε δείγματα κοπράνων από τους Madeley και Cosgrove . Αυτοί οι ερευνητές βρήκαν μόρια calicivirus σε δείγματα κοπράνων 10 παιδιών , αλλά μερικά

από τα παιδιά ήταν ασυμπτωματικά, για αυτό το λόγο δεν μπόρεσαν να διεξαχθούν συμπεράσματα για την παθογένεια του ιού. Στο τέλος του 1976 οι Flewett και Davies ανίχνευσαν calicivirus στο λεπτό έντερο από μια θανατηφόρα περίπτωση γαστρεντερίτιδας ,αλλά επειδή ιικά σωματίδια αδενοϊών ήταν επίσης παρόντα , η σημασία των caliciviruses δεν μπόρεσε να διευκρινιστεί.

Αργότερα δημοσιεύθηκαν στοιχεία προτείνοντας ότι ο NV έχει μια πρωτεΐνη με εκτιμώμενη μοριακή μάζα 59 KDa και προτάθηκαν μοριακά στοιχεία που αποδείκνυαν ότι ο NV είναι calicivirus ,με ιικό γένωμα που αποτελείται από μονόκλωνο, θετικής πολικότητας , πολυαδενυλιωμένο RNA.



Εικόνα 1 :NV σωματίδια σε φιλτραρισμένα κόπρανα που οπτικοποιήθηκαν με ανοσο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (Karikian AZ et al 1972)

1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

1.2.1 Ταξινόμηση

Οι ανθρώπινοι caliciviruses (human caliciviruses HuCVs) αποτελούνται από ένα γραμμικό θετικής πολικότητας RNA και το ισωμάτιό τους έχει διάμετρο 27-40 nm όπως φαίνεται με αρνητική χρώση στην ηλεκτρονική μικροσκοπία (EM). Η ταξινόμησή τους, η οποία βασίζεται στη μορφολογία τους, έχει βελτιωθεί λόγω των πρόσφατων δεδομένων που προέρχονται από την αλληλούχιση του γονιδιώματος και την φυλογενετική ανάλυση. Η οικογένεια των Caliciviridae πρόσφατα διαιρέθηκε σε τέσσερα γένη: Lagovirus, Vesivirus, NLV (Norwalk-like virus) και SLV (Sapporo-like virus) (Virus Taxonomy 2000) (Πίνακας 1). Η ονομασία small round structured virus (SRSV) ήταν αυτή που περιέγραφε το γένος που σήμερα καλείται NLV. (Τα NLV και SLV είναι προσωρινά ονόματα και ίσως αλλάξουν στο μέλλον. Οι NLVs και SLVs ομαδοποιούνται σε ξεχωριστά γένη) (Chiba et al 2000).

Το γένος NLV διακλαδίζεται σε τουλάχιστον δύο διαφορετικές γενετικές ομάδες (GGI και GGII) με βάση την γενετική απόκλιση στην περιοχή της πολυμεράσης και στην περιοχή του καψιδίου (Ando et al 2000). Έτσι, δεν υπάρχει ακόμη καμία συμφωνία για το πώς οι γενετικές ομάδες θα έπρεπε να υποδιαιρεθούν, εξαιτίας της ποικιλότητας των στελεχών μέσα σε κάθε γενετική ομάδα (Green et al 2000). Ένας αριθμός ερευνών έχει προτείνει τρόπους για την υπο-ομαδοποίηση των στελεχών σε γενοτύπους. Πρόσφατες προτάσεις περιέχουν προσεγγιστικά 7 GGI ομάδες οι οποίες περιλαμβάνουν τους πρότυπους ιούς Norwalk, Southampton και Desert Shield και περίπου 10 GGII γενοτύπους που περιλαμβάνουν τα ιικά στελέχη αναφοράς Snow Mountain, Toronto, Bristol και Hawaii (Ando et al 2000, Koopmans 2001, Vinje et al 2000, Vinje and Koopmans 2000). Ερευνητές πρότειναν ένα τρίτο γενότυπο GGIII, που περιέχει τους ζωο-μολυσματικούς ιούς Jena και Newbury agent-2 (Ando et al 2000).

Οι SLVs επίσης διαχωρίζονται σε δύο γενετικές ομάδες. Ο πρότυπος ιός Sapporo ανήκει στην γενετική ομάδα I και ο ιός London ανήκει στην γενετική ομάδα II (Koopmans 2001).

Επιπρόσθετα, πρέπει να σημειωθεί ότι ο calicivirus των βοοειδών (BEC) και πιο συγκεκριμένα το στέλεχος NB, έχει προταθεί ως αντιπρόσωπος ενός πιθανού 5^{ου} γένους στην οικογένεια (Smiley JR et al 2002).

Genus	Species	Representative Strain
<i>Norovirus</i> (NoV)	<i>Norwalk virus</i> (NV)	Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US
<i>Sapovirus</i> (SaV)	<i>Sapporo virus</i> (SV)	Hu/SaV/GI.1/Sapporo/1982/JP
<i>Lagovirus</i> (LaV)	<i>Rabbit hemorrhagic disease virus</i> (RHDV)	Ra/LaV/RHDV/GH/1988/DE
	<i>European brown hare syndrome virus</i> (EBHSV)	Ha/LaV/EBHSV/GD/1989/FR
<i>Vesivirus</i> (VeV)	<i>Vesicular exanthema of swine virus</i> (VESV)	Sw/VeV/VESV/A48/1948/US
	<i>Feline calicivirus</i> (FCV)	Fe/VeV/FCV/F9/1958/US

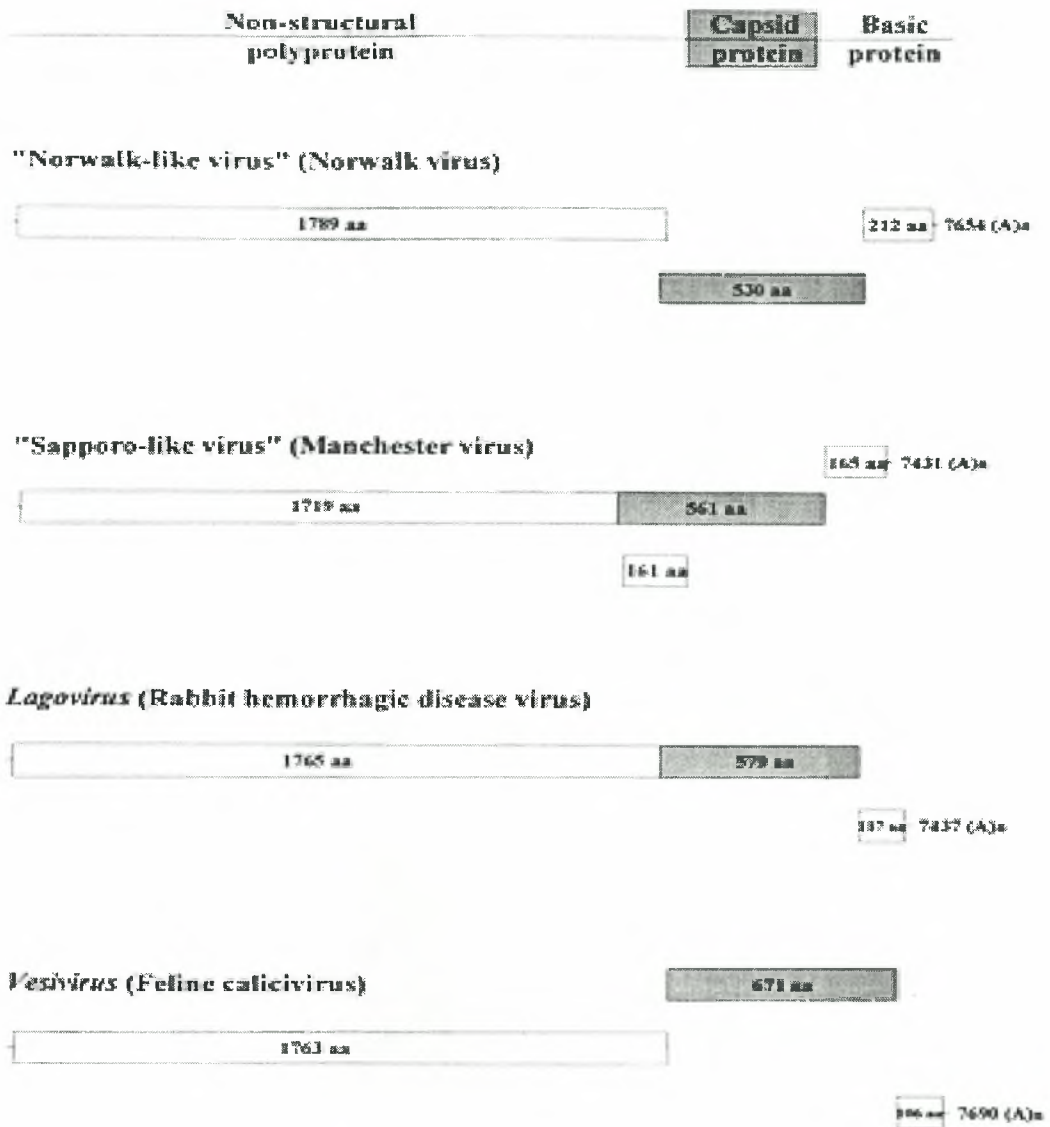
Πίνακας 1 :Ταξινόμηση των Caliciviridae

Οι συντομεύσεις οργανώνονται ως εξής: είδη ξενιστών από τα οποία ο ιός αποκτήθηκε /γένος/είδη (ή γενετική ομάδα)/όνομα στελέχους/χρόνος περιστατικού/χώρα προέλευσης. Συντομεύσεις ειδών ξενιστών: Fe, feline; Ha, Hare; Hu, Human; Sw, Swine; Ra, Rabbit. Συντομεύσεις χωρών : DE, Germany; FR, France; JP, Japan; US, United States. GenBank Accession numbers και αναφορές για την περιγραφή των αντιπροσωπευτικών ιών : NV, M87661 (Karikian AZ et al 1972); Sapporo virus, U65427 (Numata K et al 1997); RHDV, M67473 (Meyers G et al 2003), EBHSV, Z69620 (Le Gall G et al 1996); VESV, AF181082 (Neill JD 1998); FCV, M86379 (Carter MJ et al 1992).

1.2.2 Οργάνωση Γονιδιώματος

Οι caliciviruses έχουν γραμμικό, μονόκλωνο, θετικής πολικότητας RNA γένωμα (που κυμαίνεται περίπου από 7.3 έως 8.5 Kb σε μήκος) και οργανώνεται σε 2 ή περισσότερα ORFs ανάλογα με το γένος. Όλα τα γονιδιώματα αρχίζουν με pGrU στο 5'-τελικό άκρο. Η ακολουθία του 5'-τελικού άκρου επαναλαμβάνεται εσωτερικά στο γονιδίωμα και αντιστοιχεί στην αρχή ενός υπογενωμικού αντιγράφου RNA που είναι ομοτελικό με το 3'-τελικό άκρο του γενώματος. Οι μη δομικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται στην αρχή κοντά στο 5'-τελικό άκρο του γενώματος στο ORF 1, και οι δομικές πρωτεΐνες (VP1 και VP2) κωδικοποιούνται προς το 3'-τελικό άκρο του γενώματος στην περιοχή που αντιστοιχεί στο υπογενωμικό RNA. Οι noroviruses και vesiviruses κωδικοποιούν τη VP1 δομική περιοχή σε ένα χωριστό ORF (ORF 2), ενώ οι sapoviruses και οι lagoviruses κωδικοποιούν τη VP1 κοντά με τη μεγάλη μη δομική πολυπρωτεΐνη στο ORF 1 (Εικόνα 2). Όλοι οι caliciviruses κωδικοποιούν ένα σχετικά μικρό ORF κοντά στο 3'-τελικό άκρο που κωδικοποιεί τη δευτερεύουσα δομική πρωτεΐνη VP2. Η VP2 είναι μεταβλητή στο μέγεθος μεταξύ των caliciviruses

(12000-29000 D) και είναι επίσης διαφορετική στην ακολουθία μεταξύ των ιών μέσα σε ορισμένες ομάδες (Morales M. et al 2004).



Εικόνα 2 : Απεικόνιση της οργάνωσης του γονιδιώματος των ιών των τεσσάρων διαφορετικών γενών των Caliciviridae. Μια βασική πρωτεΐνη κωδικοποιείται στο 3'-άκρο του γενώματος και για τα τέσσερα γένη (Hardy M. et al 1996, Liu B et al 1997, Carter M. Et al 1992).

1.2.3 Δομή Ιοσωματίου

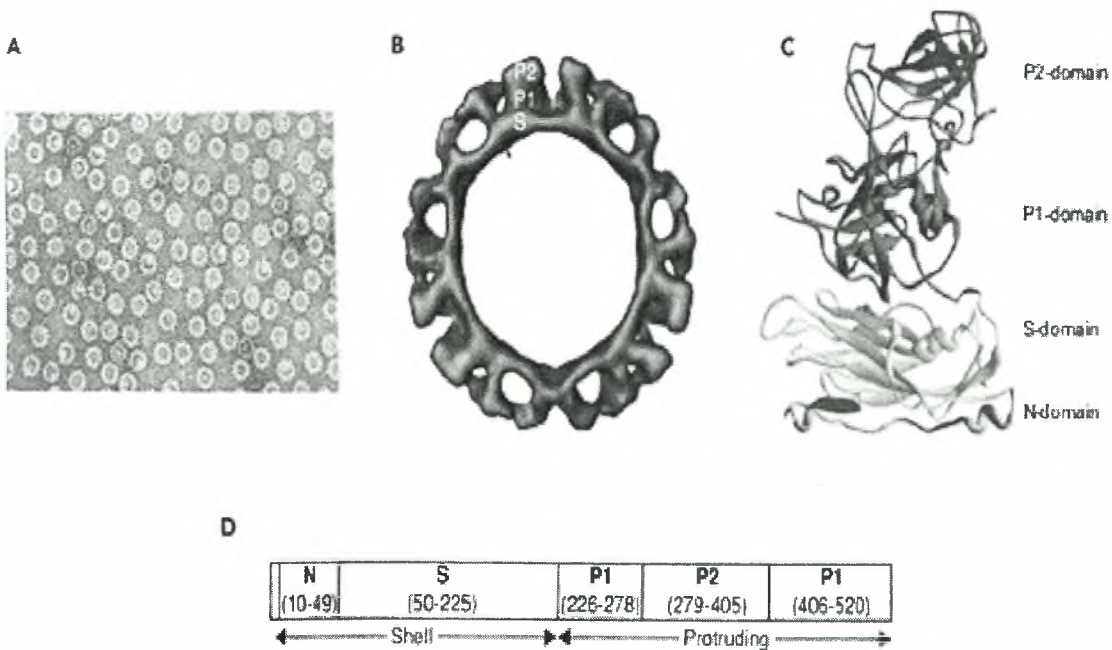
Τα ιοσωμάτια του calicivirus παρουσιάζουν εικοσαεδρική συμμετρία με $T=3$. Το καψίδιο περιέχει 90 διμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης που σχηματίζουν ένα εξωτερικό περίβλημα από το οποίο 90 καψομερή σαν τόξο προεξέχουν στους τοπικούς και άκαμπτους με 2 πτυχές άξονες (Chen R. Et al 2004, Prasad BV et al 2001). Αυτά τα τόξα τακτοποιούνται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να σχηματίζουν 32 μεγάλες κοιλότητες που μοιάζουν σαν δομές κούπας στην επιφάνεια των caliciviruses (calici προέρχεται από το λατινικό calyx, που σημαίνει κούπα). Η αυτοσυγκρότηση της καψιδιακής πρωτεΐνης VP1 σε τμήματα virus-like (VLPs) είναι μια διαδικασία που δεν απαιτεί RNA (Jiang X. et al 1992) ή τη δευτερεύουσα καψιδιακή πρωτεΐνη, VP2. Η ανασυνδυασμένη VP1 (180 αντίγραφα) του NV χαρακτηριστικά αυτοσυγκροτείται σε μόρια 38nm με $T=3$ συμμετρία, αλλά μπορεί να διαμορφώσει μικρότερα VLPs (23nm) με $T=1$ συμμετρία που αποτελείται από 60 αντίγραφα της VP1.



Εικόνα 3: Απεικόνιση της ατομικής δομής της πρωτεΐνης VP1 του ιού Norwalk.

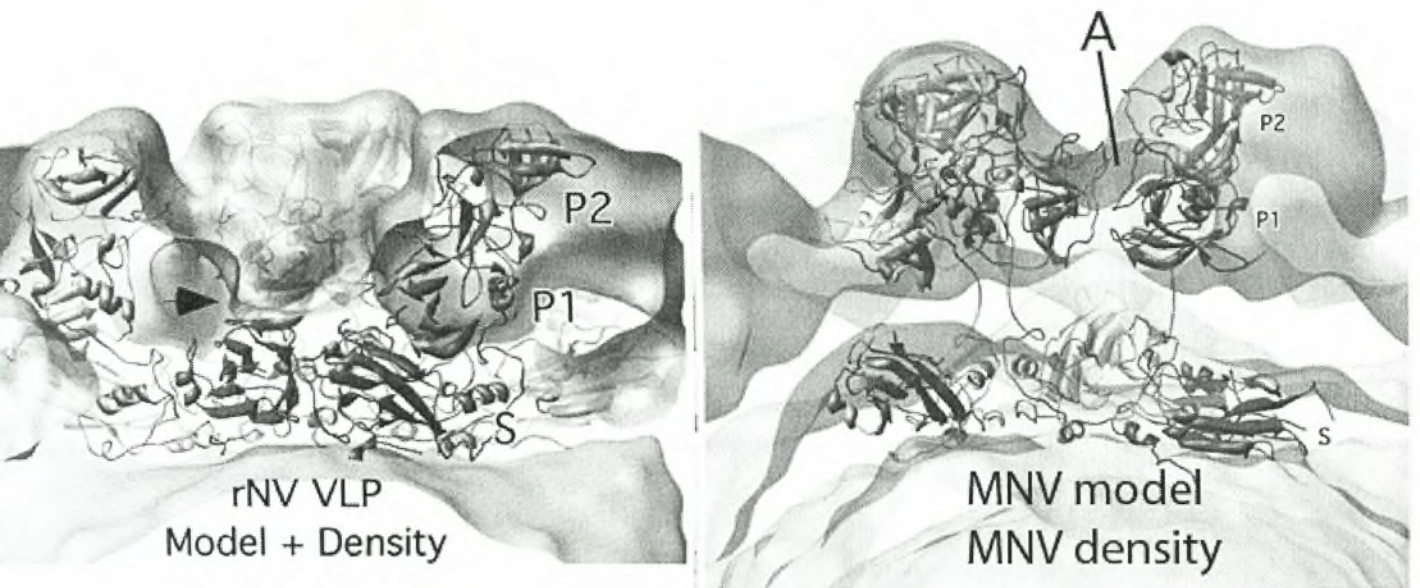
Η ατομική δομή του Norwalk rVLP έχει καθοριστεί από την κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (Εικόνα 3). Μελέτες ηλεκτρονικής κρυσταλλογραφίας έχουν καθορίσει 2 σημαντικές περιοχές της VP1 την πτυχή(S) και τον προεξέχον

βραχίονα (P). Η περιοχή S αποτελεί το εσωτερικό τμήμα του καψιδίου που περιβάλλει το RNA γονιδίωμα και διατηρεί τις εικοσαεδρικές επαφές T=3 , και η P περιοχή διαμορφώνει τις αψιδωτές προεξοχές που προέρχονται από την πτυχή και περιέχουν τις διμερείς επαφές. Ο NH₂-τελικός βραχίονας ,βρίσκεται μέσα στην περιοχή S ,αποτελείται από τα κατάλοιπα 10-49 και αντικρίζει το εσωτερικό του καψιδίου. Ολόκληρη η περιοχή S (αα 1ως 225) αντιστοιχεί στη N-τελική περιοχή της καψιδιακής πρωτεΐνης που είναι σχετικά συντηρημένη μεταξύ των Νοροϊών σε συγκρίσεις αλληλουχιών . Η P περιοχή η οποία συνδέεται με την περιοχή S μέσω μιας εύκαμπτης άρθρωσης ,αντιστοιχεί στο μισό C-τελικό άκρο της VP1 ,το οποίο είναι πιο μεταβλητό στην ακολουθία των αμινοξέων. Η P περιοχή διαιρείται σε δύο υποπεριοχές :την P1(αα 226-278) που διαμορφώνει τις πλευρές της αψίδας των καψομεριδίων και τοποθετεί την P2 υποπεριοχή στην κορυφή της αψίδας και την P2 (αα 279-405) η οποία αντιστοιχεί σε μια περιοχή της VP1 που παρουσιάζει την υψηλότερη μεταβλητότητα ακολουθίας μεταξύ των Νοροϊών . Η έκθεση της VP1 μεταβλητής περιοχής στην επιφάνεια του ιοσωματίου είναι σύμφωνη με τον πιθανό ρόλο της στο σχηματισμό μιας σημαντικής αντιγονικής περιοχής και στη σύνδεση υποδοχέων (Hardy ME. Et al 1996, Nilsson M. et al 2003).Έχει προταθεί ότι η υψηλά συντηρημένη περιοχή S μπορεί να λειτουργήσει ως εικοσαεδρικό ικρίωμα με το N-τελικό βραχίονα να παρέχει μια αλλαγή για να διευκολύνει την κατάλληλη κυρτότητα, και ότι η P περιοχή είναι μια αντικαταστάσιμη μονάδα η οποία συνδέεται με τα αντιγονικά χαρακτηριστικά των στελεχών (Chen R. Et al 2006). Η άμεση υποστήριξη για αυτή την υπόθεση έχει βρεθεί στις πρόσφατες μελέτες που παρουσιάζουν την P2 περιοχή σαν μια σημαντική θέση για την αντιγονικότητα και την ειδικότητα πρόσδεσης του υποδοχέα των Νοροϊών (Lochridge VP. Et al 2005, Rohayem J et al 2005, Tan M. et al 2003).



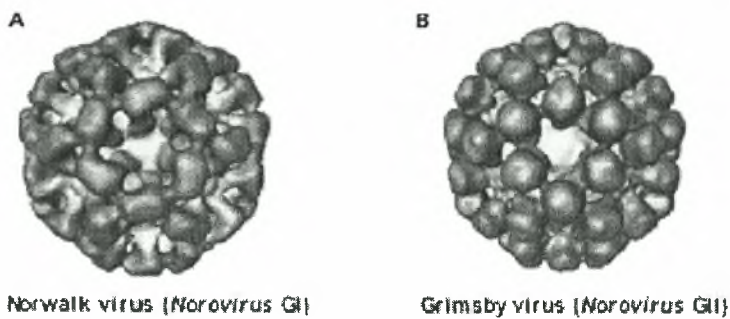
Εικόνα 4 :Λεπτομερής απεικόνιση της κύριας καψιδιακής πρωτεΐνης VP1 του Norwalk virus (NV). A: NV ανασυνδυασμένα virus-like particles (rVLPs) όπως περιγράφηκαν από τον Jiang και λοιπούς (Jiang X et al 1995), και οπτικοποιήθηκαν από ηλεκτρονική μικροσκοπία (EM). (Courtesy of MK Estes.) B: Ένα κεντρικό τμήμα του NV rVLP του κάθετου τρίπλευρου άξονα της εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το τόξο συγκροτείται από την προεξέχουσα (P) περιοχή(διαίρεείται σε υποπεριοχές P1 και P2) and στην κοχύλι (S) περιοχή. C: Η τρισδιάστατη απεικόνιση των ξεχωριστών υπομονάδων από το rNV κασομερές όπως αποδεικνύεται από κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων-x του Norwalk rVLP . D: Περιοχές της NV καψιδιακής πρωτεΐνης , αρχικά φαίνονται οι ακολουθίες των αμινοξέων (τα όρια των αμινοξικών καταλοίπων φαίνονται στην παρένθεση) που αντιστοιχούν στις P1, P2, και S περιοχές (Prasad BV et al 1994).

Η VP1 περιοχή του NV έχει μήκος 530 αα, και η ελάχιστη πρωτεϊνική ακολουθία που απαιτείται για τον σχηματισμό ανασυνδυασμένου VLP έχει εντοπιστεί στη N-τελική περιοχή (Εικόνα 4)(Bertolotti-Ciarlet A et al 2002). Η έκφραση της N-τελικής περιοχής της VP1 που αντιστοιχεί στην περιοχή S , οδήγησε στο σχηματισμό των λείων σωματιδίων με διάμετρο περίπου 30 nm . Η έκφραση της VP1 ακολουθίας προς τα κάτω από το αα 35 , αντιστοιχεί στην περιοχή P και δεν παράγει VLPs .Η διαγραφή των πρώτων 20 καταλοίπων αα από το ακραίο N-τελικό άκρο της VP1 του NV δεν είχε επιπτώσεις στην ικανότητα της πρωτεΐνης για αυτοσυγκρότηση σε VLP 38 nm με T=3 συμμετρία.



Εικόνα 5 :Σύγκριση των rNV και MNV μοντέλων. Με γκρι απεικονίζεται η επιφάνεια των rNV(κορυφή) και MNV(βάση). Στο μοντέλο rNV η P δομή απλώνεται προς τα πάνω στην S δομή και δεν αλληλεπιδρά με την δομή P1. Σε αντίθεση στο μοντέλο MNV η P δομή αναδεικνύεται από την επιφάνεια της δομής S και αλληλεπιδρά με την P1 δομή (Katpally, U., Wobus, C. E., Dryden, K., Virgin, H. W. IV, and Smith, T. J. (2008) Unexpected structural differences between authentic norovirus and virus like particles. *J. Virol*).

Η ανάλυση των rVLPs του Norwalk ,που αντιπροσωπεύει την GI γενετική ομάδα των Νοροϊών , δείχνει ότι τα μόρια (38 nm στη διάμετρο μέσω κρυομικροσκοπίας) έχουν μια ευδιάκριτη αρχιτεκτονική και παρουσιάζουν T=3 εικοσαεδρική συμμετρία (Εικόνα 5) .Η σύγκριση της δομής του Norwalk με τον Grimsby virus ,έναν GII ανθρώπινο Νοροϊό , παρουσιάζει παρόμοια αρχιτεκτονική , αλλά με ομαλότερες άκρες και ευρύτερες αγίδες (Εικόνα 6). Οι δομικές διαφορές που αποκαλύφθηκαν με αυτή την τεχνική ήταν σύμφωνες με τη μικρή, στρογγυλά δομημένη εμφάνιση των ανθρώπινων Νοροϊών έναντι της κλασσικής εμφάνισης των ζωικών και ανθρώπινων caliciviruses που είχαν περιγραφεί σε μελέτες αρνητικής χρώσης EM(Prasad BV. et al 1994).



Εικόνα 6 : Τρισδιάστατη απεικόνιση (A) του ιού Norwalk (NV) ανασυνδυασμένων σωματιδίων rVLPs (γενετική ομάδα I norovirus) και (B) του ιού Grimsby (γενετική ομάδα II norovirus) (Prasad BV et al 1994).

1.2.4 Δομικές Πρωτεΐνες

Τρεις πρωτεΐνες βρίσκονται στα ώριμα ιοσωμάτια των caliciviruses :VP1, VP2 και VPg (Sosnovtzen SV. et al 2000). Η VP1 (~60000d) είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη του ιού και είναι παρούσα σε 180 αντίγραφα (90 διμερή) ανά ιοσωμάτιο (Prasad BV. et al 1994). Η επικράτηση της VP1 στο σχηματισμό της δομής του ιικού καψιδίου ,είναι σύμφωνη με τον κρίσιμο ρόλο της στον καθορισμό του αντιγονικού φαινοτύπου και των αλληλεπιδράσεων του ιού με τα κύτταρα του ξενιστή.

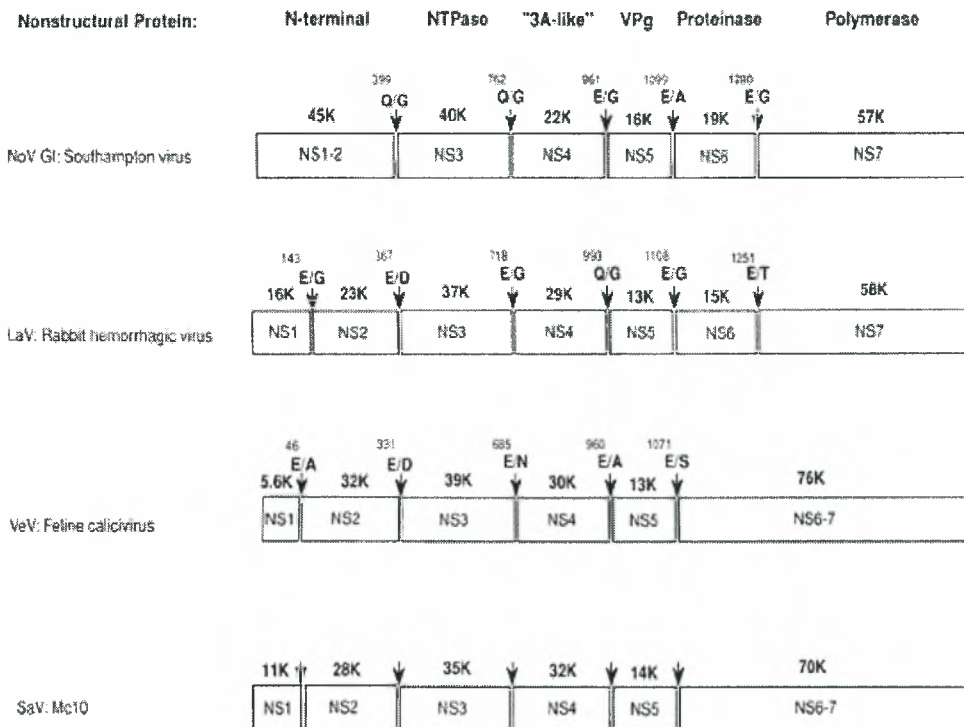
Η VP2 (12000-29000 d) θεωρείται η δευτερεύουσα δομική πρωτεΐνη επειδή είναι παρούσα μόνο σε ένα ως δύο αντίγραφα ανά ιοσωμάτιο, και η λειτουργία της είναι άγνωστη (Glass PJ. et al 2000, Glass PJ et al 2003). Αν και η VP1 μπορεί να αυτοσυγκροτηθεί σε rVLPs ανεξάρτητα από την παρουσία της VP2 , η παρουσία της VP2 ίσως αυξάνει την αποδοτικότητα έκφρασης της VP1 και ενισχύει τη σταθερότητα των rVLPs που παράγονται στο σύστημα έκφρασης baculovirus (Bertolotti-Ciarlet A. Et al 2003). Τα στοιχεία για μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των VP1 και VP2 καψιδιακών πρωτεϊνών έχουν αναφερθεί και για NV (Glass PJ .et al 2003) και FCV (Kaiser WJ. et al 2006), προτείνοντας περαιτέρω ένα ρόλο στην ωρίμανση ή τη σταθερότητα των μορίων. Η VPg συνδέεται ομοιοπολικά με το γενωμικό και υπογενωμικό RNA στα μολυσμένα κύτταρα και είναι ένα δευτερεύον συστατικό στα ιοσωμάτια ,κατ'έκτίμηση υπάρχουν 1 ή 2 αντίγραφα ανά σωματίδιο . Αν και η VPg είναι παρούσα στα ιοσωμάτια ,πιθανότατα έχει πρωταρχικές λειτουργίες σαν μη δομική πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής.

1.2.5 Μη Δομικές Πρωτεΐνες

1.2.5.1 Πρωτεολυτική Επεξεργασία του ORF1

Οι caliciviruses παράγουν τις ώριμες μη δομικές τους πρωτεΐνες με πρωτεολυτική διάσπαση μιας μεγάλης πολυπρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το ORF1. Το μήκος της μη διασπασμένης πρόδρομης πολύπρωτεΐνης είναι περίπου 200000d. Αυτή η μεγάλη πρόδρομη μορφή δεν έχει παρατηρηθεί ποτέ, πιθανότατα επειδή η πρωτεολυτική επεξεργασία είναι γρήγορη και συμμεταφραστική (Sosnovtseva SA. et al 1999). Η θέση των περιοχών διάσπασης της πολυπρωτεΐνης στο ORF1 που καθορίζουν τα όρια των τελικών μη δομικών πρωτεϊνικών προϊόντων διάσπασης έχει καθοριστεί για στελέχη caliciviruses που αντιπροσωπεύουν τα γένη Norovirus (Liu BL. Et al 1999), Vesivirus (Sosnovtsen SV. et al 2000) και Lagovirus (Konig M. et al 1998) και ένας δοκιμαστικός χάρτης διάσπασης έχει προταθεί για το γένος Sapovirus (Oka T. Et al 2005) (Εικόνα 7). Πέντε θέσεις διάσπασης για τον norovirus στο ORF1 της πολυπρωτεΐνης (αντιπροσωπευόμενος από τον ιό Southampton) έχουν χαρτογραφηθεί που θα απελευθέρωναν 6 ώριμα προϊόντα. Ένας αριθμός πρόδρομων πρωτεϊνών έχει περιγραφεί επίσης για τους caliciviruses και πιθανότατα αυτές οι πρωτεΐνες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αντιγραφή (Belliot G. et al 2003, Meyers G et al 2000, Sosnovtsen SV et al 2006).

Οι περιοχές αναγνώρισης διάσπασης διπεπτιδίων του calicivirus είναι σύμφωνες με εκείνες που περιγράφονται για την 3C πρωτεάση κυστεΐνης του picornavirus. Οι θέσεις διάσπασης των caliciviruses που προσδιορίζονται ως εδώ έχουν είτε αρνητικά φορτισμένο γλουταμικό οξύ (E) ή πολική γλουταμίνη (Q) στην πρώτη θέση (οριζόμενη P1). Περισσότερη ποικιλομορφία υπάρχει μέσα στη δεύτερη θέση της περιοχής διάσπασης διπεπτιδίων. Οι μελέτες της ειδικότητας του υποστρώματος της πρωτεΐνωσης των caliciviruses έχουν παρουσιάσει ανθεκτικότητα στη θέση P1 σε ορισμένες θέσεις διάσπασης (Hardy M. et al 2002). Η διαμόρφωση της πρωτεΐνης που περιβάλλει την περιοχή αναγνώρισης διπεπτιδίων είναι επίσης σημαντική για την αποδοτική διάσπαση από την πρωτεάση (Sosnovtseva SA. et al 1999).



Εικόνα 7 :Χάρτες πρωτεολυτικής διάσπασης των μη δομικών πολυπρωτεϊνών του ιού Southampton (γένος *Norovirus*), ο ιός της αιμορραγικής ασθένειας των κουνελιών(γένος *Lagovirus*), και ο *calicivirus* των αιλουροειδών(γένος *Vesivirus*). Ο προβλεπόμενος χάρτης διάσπασης του ιού Mc10 (γένος *Sarovirus*) περιλαμβάνεται στη σύγκριση. Η πρωτεολυτική διαδικασία των χαρτογραφημένων(ή προβλεπόμενων) θέσεων διάσπασης των διπεπτιδίων από την ική πρωτεϊνάση της κυστεΐνης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, δίνει μη δομικές πρωτεΐνες με υπολογισμένη μάζα(εκφρασμένη σε kilodaltons, K)(Konig M et al 1998, Liu B et al 1996, Sosnovtzen SV et al 2002,2006).

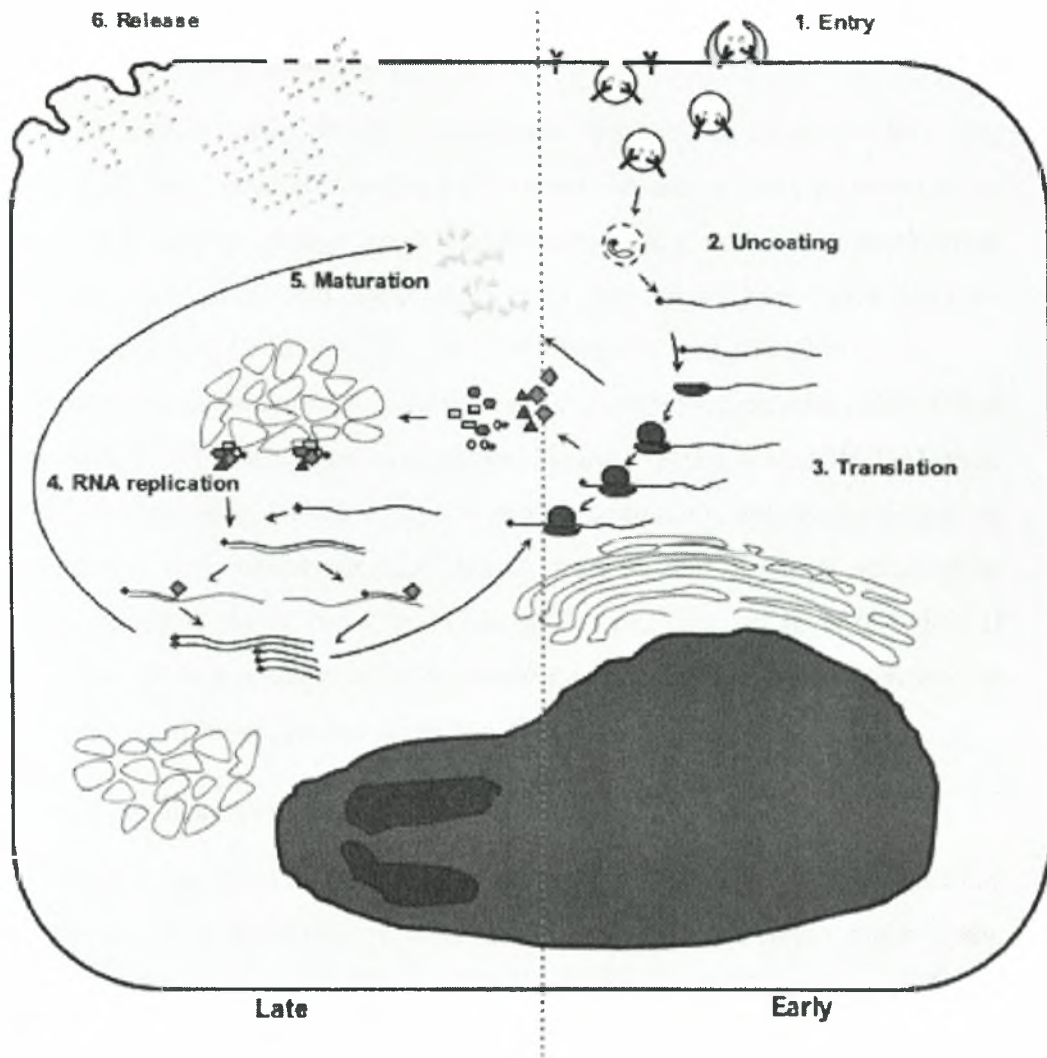
1.2.5.2 Δομή μη Δομικών Πρωτεϊνών και Λειτουργία

Οι λειτουργίες 3 μη δομικών πρωτεϊνών του *calicivirus* προέκυψαν αρχικά βασιζόμενες στις ανάλογες ακολουθίες των *picornaviruses* που περιλαμβάνουν την 2C ελικάση, 3C πρωτεϊνάση και την 3D-RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση(Neill JD. et al 1990).Οι βιοχημικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τις ομόλογες δραστηριότητες στις πρωτεΐνες των *caliciviruses* που αντιστοιχούν στις NS3^{NTPase}, NS6^{Pro},NS7^{Pol} πρωτεΐνες, αντίστοιχα. Αν και η γονιδιακή τάξη των μη δομικών πρωτεϊνών και η ισχυρή ομολογία σε ορισμένα μοτίβα προτείνουν έναν κοινό πρόγονο για τους *caliciviruses* και *picornaviruses*, είναι εντυπωσιακό ότι διαφορετικές πρωτεΐνες κωδικοποίησαν τμήμα του ORF1 του *calicivirus* με ελάχιστη ή καμία ανιχνεύσιμη συγγένεια ακολουθίας με τους *picornaviruses*. Αυτές

περιλαμβάνουν τις N-τελικές πρωτεΐνες NS1 και NS2 (που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες 2A και 2B των picornaviruses), NS4(αντίστοιχα στην 3A πρωτεΐνη των picornaviruses) και NSS(η οποία αντιστοιχεί στην VPg).

1.3 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Η στρατηγική αντιγραφής για τους caliciviruses μοιράζεται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με άλλους RNA ιούς θετικής πολικότητας. Καταρχήν, το ισωμάτιο πρέπει να αλληλεπιδράσει με το κύτταρο ξενιστή (πιθανότατα μέσω κάποιου υποδοχέα), κατόπιν ακολουθεί η είσοδος του ιού, και στη συνέχεια το RNA γένωμα απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα (απέκδυση) (Εικόνα 8). Αυτές οι πρώτες αλληλεπιδράσεις με τα κύτταρα είναι ανεπαρκώς κατανοητές για τους caliciviruses, αλλά η αναγνώριση υποδοχέων είναι ουσιαστική (Lynn S. et al 2004). Η έναρξη της σύνθεσης ενός antisense (αρνητικού) RNA από το γενωμικό RNA, συμβαίνει στην αρχή του 3'-άκρου του γενωμικού θετικής πολικότητας RNA, και ίσως περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με κυτταρικές πρωτεΐνες (Gutierrez-Escolano AL. et al 2000). Το αρνητικά περιελιγμένο RNA στη συνέχεια, χρησιμεύει ως ένα πρότυπο για τη μεταγραφή 2 σημαντικών ειδών θετικών περιελιγμένων RNA που αντιστοιχούν σε ένα ολόκληρο γενωμικό και υπογενωμικό RNA (Neill JD. Et al 1998). Η μεταγραφή από τη θέση έναρξης του υπογενωμικού RNA βρέθηκε να απαιτεί 50 nt πάνω από την περιοχή έναρξης για την πλήρη δραστηριότητα των πολυμερασών σε *in vitro* μελέτες (Morales M. Et al 2004). Το άφθονο υπογενωμικό θετικό περιελιγμένο RNA χρησιμεύει ως πρότυπο για τη σύνθεση των δομικών πρωτεϊνών VP1 και VP2 και η ρύθμιση της μετάφρασης της VP2 από το υπογενωμικό RNA (μεταφράζεται περίπου το 20% των επιπέδων της VP1) ίσως να περιλαμβάνει ένα μηχανισμό λήξης στον οποίο οι ακολουθίες κοντά στο άκρο της VP1 κωδικής περιοχής περιέχουν ένα σήμα για τη μετάφραση της VP2 (Meyers G. 2003). Όπως με όλους τους άλλους RNA ιούς θετικής πολικότητας, η αντιγραφή του ιϊκού RNA συνδέεται με τις κυτταρικές μεμβράνες των ξενιστών. Η έναρξη της μετάφρασης του εισερχόμενου θετικού μονόκλωνου γονιδιώματος πιθανότατα μεσολαβεί μέσω των αλληλεπιδράσεων γονιδιώματος-συνδεδεμένης VPg πρωτεΐνης με τους κυτταρικούς μηχανισμούς μετάφρασης (Daughenbaugh KF. et al 2003, Goodfellow I. et al 2005, Gutierrez-Escolano AL. et al 2000). Το ORF1 μεταφράζεται για να παράγει μη δομική πολυπρωτεΐνη, η οποία υποβάλλεται σε επεξεργασία στην πρόδρομη μορφή και τα προϊόντα επεξεργάζονται από την ιϊκή πρωτεϊνάση (NS6^{Pro}).



Εικόνα 8 : Σχηματική αναπαράσταση της στρατηγικής αντιγραφής των caliciviruses. Σύμφωνα με άλλους θετικής πολικότητας RNA ιούς, ο κύκλος αντιγραφής του calicivirus περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: (1) Είσοδος, (2) Απέκδυση, (3) Μετάφραση, (4) RNA αντιγραφή, (5) Ωρίμανση και (6) Απελευθέρωση (Courtesy of S. Sosnovtsev.)

1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

1.4.1 Είσοδος και Περίοδος Επώασης

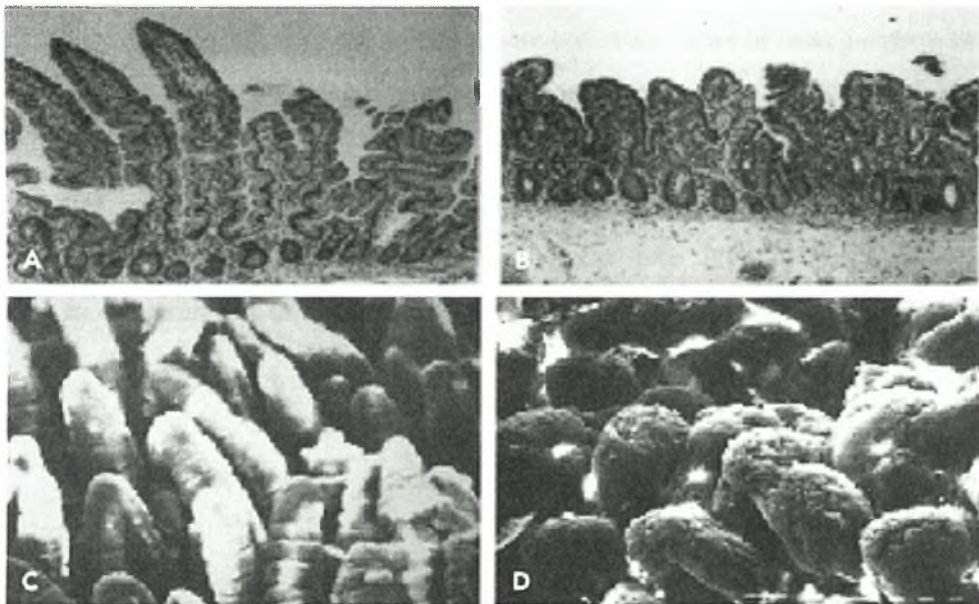
Οι ανθρώπινοι caliciviruses εισέρχονται στο σώμα κυρίως μέσω της στοματικής οδού, όμως έμμεσα στοιχεία από επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι οι ιοί μπορούν να εισέλθουν επίσης μέσω αερολυμάτων , π.χ. εκείνα που παράγονται κατά τον εκρηκτικό εμετό (υπό μορφή ρουκέτας) που εμφανίζεται συχνά κατά τη διάρκεια της ασθένειας(Chadwick PR et al 1994, Marks PJ et al 2000, 2003).

Βασιζόμενοι σε εθελοντικές μελέτες με NV ,η περίοδος επώασης είναι μικρή ,κυμαινόμενη από 10-51 ώρες ,με ένα μέσο όρο 24 ωρών (Dolin R et al 1972).Η οξεία ασθένεια διαρκεί συνήθως 24 -48 ώρες . Η περίοδος επώασης που καταγράφηκε σε 22 κρούσματα της γαστρεντερίτιδας από Νοροϊό ήταν μεταξύ 24 και 48 ωρών και σε 20 από τα κρούσματα και το εύρος ήταν από 4-77 ώρες (Kaplan JE et al 1982). Η περίοδος επώασης που προκλήθηκε πειραματικά σε ασθένεια από Snow Mountain ιό κυμάνθηκε από 19-41 ώρες , με ένα μέσο όρο 27 ωρών(Dolin R et al 1982).

1.4.2 Περιοχή Αρχικής Αντιγραφής

Η περιοχή της αρχικής αντιγραφής για τους ανθρώπινους caliciviruses δεν έχει εξακριβωθεί, αλλά υποτίθεται ότι αντιγράφεται στο ανώτερο τμήμα του εντέρου. Οι βιοψίες νήστιδας των εθελοντών που παρουσίασαν γαστρεντερίτιδα μετά από στοματική χορήγηση του Norwalk και Hawaii ιού έδειξαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις(Εικόνα 9)(Dolin R et al 1975). Παρατηρήθηκε άμβλυση και διεύρυνση των λαχνών του κεντρικού λεπτού εντέρου παρόλο που ο βλεννογόνος ιστός παρέμεινε ιστολογικά άθικτος. Οι βιοψίες που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της φάσης ανάρρωσης από την ασθένεια ήταν φυσιολογικές. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το χαρακτηριστικό τραύμα της νήστιδας παρατηρήθηκε στους εθελοντές στους οποίους χορηγήθηκε NV και Hawaii ιός αλλά που δεν αρρώστησαν(Meeroff JC et al 1980). Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές αλλοιώσεις στο γαστρικό πυθμένα, στο ιγμόρειο άντρο ή στον βλεννογόνο του πρωκτού των εθελοντών με προκληθείσα ασθένεια από NV ιό . Οι βιοψίες του εντέρου από παιδιατρικούς ασθενείς που μολύνθηκαν με Νοροϊό έδειξαν μείωση στα επίπεδα των εντερικών ενζύμων τρεχαλάση και αλκαλική φωσφατάση , ενώ δεν παρατηρήθηκε αύξηση στη δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης στη νήστιδα . Η γαστρική έκκριση του υδροχλωρικού οξέος ,της πεψίνης και του ενδογενή παράγοντα δεν εμφανίστηκε να

αλλάζει κατά τη διάρκεια της ασθένειας από NV ιό . Έχει προταθεί ότι η ανώμαλη γαστρική λειτουργία είναι υπεύθυνη για την ναυτία και ο εμετός συνδέεται με αυτούς τους ιικούς παράγοντες (Meeroff JC et al 1980), αλλά ο ακριβής μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για αυτή την ασθένεια είναι άγνωστος. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι πληροφορίες που υπάρχουν για τον κυτταρικό και ιστικό τροπισμό των ανθρώπινων caliciviruses είναι περιορισμένες καθώς τα ραδιενεργά Norwalk rVLPs δεσμεύονται σε ποικίλους τύπους κυττάρων και σε ορισμένα κύτταρα "έσωτερικεύονται" με χαμηλή αποδοτικότητα.



Εικόνα 9 : (A):Φυσιολογική εμφάνιση ιστού νήστιδας από βιοψία ασθενούς πριν μολυνθεί με ιό Norwalk (NV), (B):διευρημένες και επίπεδες λάχνες σε βιοψία ιστού νήστιδας από τον ίδιο εθελοντή κατά τη διάρκεια της ασθένειας με Norwalk –γαστρεντερίτιδα,(C):Φυσιολογική εμφάνιση ιστού νήστιδας από βιοψία γουρουνιού πριν μολυνθεί με εντερικό calicivirus των χοίρων. Σάρωση με ηλεκτρονική μικροσκοπία,(D):Αμβλυνση , στόμωση, σύντηξη ή απουσία λαχνών στη βιοψία της νήστιδας από το ίδιο γουρούνι που μολύνθηκε με εντερικό calicivirus των χοίρων (Flynn WT et al 1988).

1.4.3 Απελευθέρωση από τον ξενιστή

Οι ανθρώπινοι caliciviruses απελευθερώνονται από τον εντερικό σωλήνα του ξενιστή στα κόπρανα. Οι Νοροϊοί έχουν ανιχνευθεί επίσης στον εμετό μέσω IEM και RT-PCR . Οι πιο ευαίσθητες τεχνικές όπως η RT-PCR έδειξαν ότι η διάχυση μετά από μόλυνση με Νοροϊό μπορεί να εμφανιστεί , πριν από την αρχή και μετά την υποχώρηση των συμπτωμάτων και ότι η διάχυση μπορεί να κρατήσει αρκετές ημέρες (από 7-13ημέρες)(Gaulin C et al 1999).Μελέτες με Νοροϊό σε μια κοινότητα με 99 εξεταζόμενους ασθενείς, έδειξαν ότι το 26% των ασθενών παρουσίασε διάχυση ιού (ανιχνεύεται με RT-PCR) μέχρι 3 εβδομάδες μετά από την αρχή της ασθένειας, με το υψηλότερο ποσοστό (38%) παρατεταμένης διάχυσης σε παιδιά μικρότερα του ενός έτους(Rockx B et al 2002). Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα μολυσμένα άτομα που ανακτούν από την ασθένεια από Νοροϊό μπορούν να συνεχίσουν να διαχέουν τον ιό και μετά από την συμπτωματική περίοδο .

1.5 ΑΝΟΣΙΑ

Σε μερικές μελέτες ,βρέθηκαν αλλοιώσεις του βλεννογόνου σε εθελοντές ,οι οποίοι είχαν προσλάβει μολυσμένα φιλτραρισμένα κόπρανα , αλλά δεν εκδήλωσαν τα κλινικά συμπτώματα της ασθένειας , ενώ κάποιοι άλλοι εθελοντές δεν παρουσίασαν καθόλου συμπτώματα κλινικά ή παθολογικά της μόλυνσης. Όταν αργότερα αυτοί οι εθελοντές επαναμολύνθηκαν με το ίδιο "εμβόλιο", κάποιοι από αυτούς ανέπτυξαν την ασθένεια και κάποιοι όχι (Parrino et al 1977).Έτσι αποδεικνύεται ότι κάποιος βαθμός βραχυπρόθεσμης ανοσίας παρατηρείται,τουλάχιστον μεταξύ μερικών ανθρώπων.

Η έκβαση της μακροπρόθεσμης ανοσίας επίσης εξετάστηκε. Ο Parrino και λοιποί ,μόλυναν 12 εθελοντές με τον παράγοντα Norwalk (Parrino et al 1977). Έξι από αυτούς ασθένησαν, και όταν επαναμολύνθηκαν 27-42 μήνες αργότερα, ασθένησαν και πάλι. Οι υπόλοιποι έξι εθελοντές που επαναμολύνθηκαν 31-34 εβδομάδες αργότερα, δεν παρουσίασαν γαστρεντερίτιδα .Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν τη θεωρία της βραχυπρόθεσμης ανοσίας στους HuCVs ενώ η μακροπρόθεσμη ανοσία δεν εμφανίζεται μετά από μια μόνο μόλυνση. Όπως και σε άλλες μελέτες με εθελοντές , μερικοί εθελοντές δεν παρουσίασαν κανένα σημάδι της ασθένειας. Σε αυτή τη μελέτη ,τα ίδια άτομα που δεν παρουσίασαν την ασθένεια στην πρώτη έκθεση ,δεν ανέπτυξαν την ασθένεια μετά την επανέκθεσή τους. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από τα αρχικά επίπεδα των κυκλοφορούντων αντισωμάτων. Πιθανόν, διαφορές στην τοπική ανοσολογική απάντηση του εντερικού βλεννογόνου ή κάποια γενετική ιδιαιτερότητα (π.χ. ένας συγκεκριμένος υποδοχέας) ίσως εξηγούσαν γιατί μερικά άτομα μπορούν να αναπτύξουν γαστρεντερίτιδα σχετιζόμενη με Norwalk και άλλα δεν μπορούν. Το 1998, ένα κρούσμα από NLV τροφικής προέλευσης, συνέβη στην Αυστραλία μεταξύ ομάδων τουριστών που επισκέφθηκαν μια κοινότητα ιθαγενών (Ewald et al 2000). Όλοι αυτοί κατανάλωσαν το ίδιο γεύμα, κανένας όμως από τους ιθαγενείς κατοίκους δεν ένωσε άρρωστος. Αν υποθέσουμε ότι δεν υπάρχει μακροπρόθεσμη ανοσία στον NLV , μια πιθανή εξήγηση για την ανοσία αυτής της κοινότητας είναι ότι η συχνότητα έκθεσης ίσως προκάλεσε συντηρημένη ανοσία. Μια άλλη πιθανότητα είναι οι διαφορές στην γενετική επιδεκτικότητα.

Εθελοντές οι οποίοι είχαν μολυνθεί με τον παράγοντα Norwalk ,δεν ανέπτυξαν την ασθένεια όταν μολύνθηκαν με τον παράγοντα Montgomery Country. Χρόνια αργότερα, ορολογικές εξετάσεις ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι των

παραγόντων Norwalk, Hawaii και Montgomery Country επιβεβαίωσαν την πολύπλοκη αντιγονική σχέση (Madore et al 1990). Ο Madore και λοιποί, εξέθεσαν τους εθελοντές σε ένα από τους τρεις παράγοντες. Μετά την πρόσληψη ενός από τους παράγοντες, βρέθηκε στον ορό ότι ο τίτλος των αντισωμάτων αυξήθηκε στους περισσότερους εθελοντές. Μια πρόσφατη μελέτη του NLV σε παιδιά έδειξε ότι τα κυκλοφορούντα αντισώματα προστατεύουν από τη μόλυνση (Lew et al 1994). Η εργασία του Noel και των λοιπών απέδειξε ότι τα αντισώματα παρουσιάζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των GGI στελεχών (Noel et al 1997). Παρ' όλα αυτά, γενετικά όμοια GGII στελέχη αποδείχθηκε ότι είναι αντιγονικά διαφορετικά. Αυτά τα ευρήματα αναδεικνύουν την πολυπλοκότητα της βραχυπρόθεσμης HuCV ανοσίας.

Αντίθετα με τον rotavirus, υψηλός ρυθμός προσβολής από NLV παρατηρήθηκε σε υγιείς ενήλικους ακόμη και αν οι περισσότεροι από αυτούς έχουν προηγουμένως μολυνθεί σε παιδική ηλικία. Έτσι η κατανόηση της ανθρώπινης ανοσίας στη μόλυνση και στην ασθένεια από NLV παραμένει περιορισμένη.

1.5.1 Αντιγονικές σχέσεις των Νοροϊών

Η τεχνική IEM χρησιμοποιήθηκε για να εξακριβωθούν τα στοιχεία για τουλάχιστον 4 ευδιάκριτους αντιγονικούς οροτύπους (προτείνονται ως ορότυποι 1-4), των οποίων τα πρωτότυπα στελέχη ήταν οι ιοί Norwalk, Hawaii, Snow Mountain και Taunton αντίστοιχα (Kapikian AZ et al 1975, Kapikian JE et al 1972, Kaplan JE et al 1982, Lewis D 1991). Οι συγκριτικές αναλύσεις ακολουθίας της καψιδιακής πρωτεΐνης VP1 προερχόμενης από τους ιούς Norwalk, Hawaii και Snow Mountain (με τον ιό Taunton μη διαθέσιμο για αυτή την ανάλυση) εντόπισαν υψηλή γενετική ποικιλομορφία (75% αμινοξική ομοιότητα ή λιγότερη σε συγκρινόμενα ζεύγη). Η σύγκριση της καψιδιακής ακολουθίας του Norwalk, Hawaii και Snow Mountain ιού με άλλες από ανθρώπινους Νοροϊούς δείχνει ότι διαφορετικές γενετικές ομάδες των καψιδιακών πρωτεϊνών κυκλοφορούν παγκοσμίως (Ando T et al 2000, Noel JS et al 1997, Vinje J et al 2000, Zheng DP et al 2006).

1.6 ΕΥΡΟΣ ΞΕΝΙΣΤΩΝ

Το εύρος των ξενιστών είναι περιορισμένο μεταξύ των caliciviruses όπως αποδεικνύεται από την εύρεση γενετικά σχετιζόμενων ανθρώπινων και ζωικών εντερικών caliciviruses στον ίδιο φυλογενετικό κλάδο. Οι ανθρώπινοι και ζωικοί εντερικοί caliciviruses είναι αρκετά διαφορετικοί έτσι ώστε να έχουν υποβληθεί στην προσαρμογή ειδών ξενιστών για κάποιο διάστημα .Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις μετάδοσης διαειδικών caliciviruses όπου η οικολογική θέση του ιού έχει αλλάξει. Οι περιπτώσεις αυτές αναφέρονται στη μετάδοση των θαλάσσιων caliciviruses ,στο γένος Vesivirus στους χοίρους στις Ηνωμένες Πολιτείες τη δεκαετία του '30 και στα άβραστα απορρίμματα(Smith AW et al 1998).

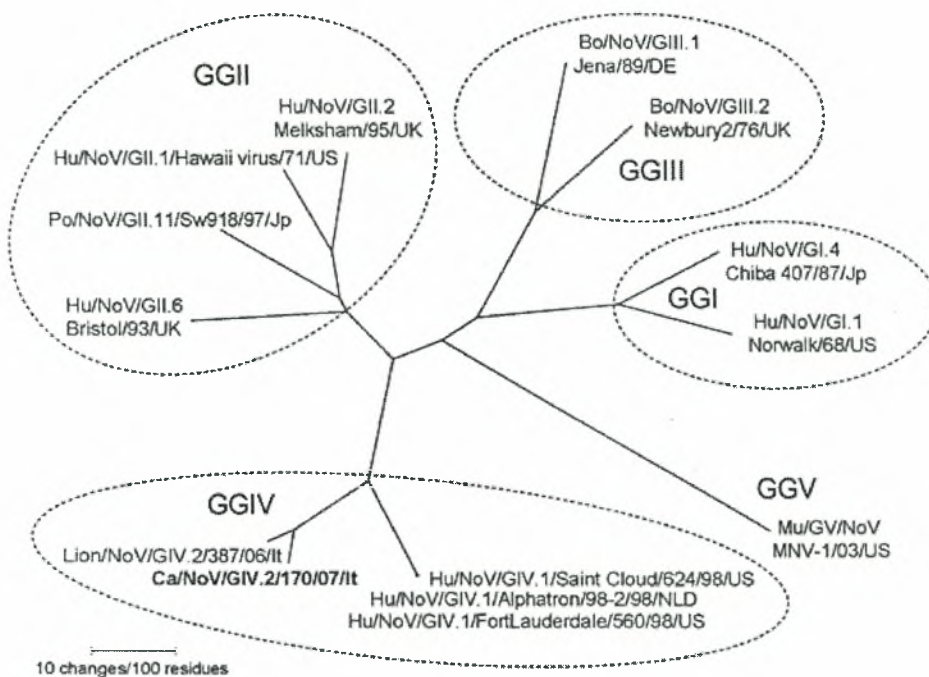
1.7 ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει μια γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των κυκλοφορούντων Νοροϊών. Η κυκλοφορία των στελεχών είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διευκρίνιση της πηγής των επιδημιών. Τα τυπικά γενετικά συστήματα για τους Νοροϊούς έχουν προταθεί βασισμένα στη συγγένεια της πλήρους VP1 καψιδιακής πρωτεΐνης, η οποία προφανώς συσχετίζεται με την αντιγονική ποικιλομορφία (Ando T et al 2000) και τη μερική καψιδιακή ακολουθία. Σύμφωνα με το ανωτέρω σύστημα παρουσιάζεται η διαίρεση του γένους *Norovirus* σε 5 σημαντικούς φυλογενετικούς κλάδους ή γενετικές ομάδες, τις GG1,GG2,GG3, GG4 και GG5(Εικόνα 10)(Zheng DP et al 2006). Οι γενετικές ομάδες I, II και III υποδιαιρούνται περαιτέρω σε 8,19 και 3 ομάδες, αντίστοιχα.

Οι NLV GG2 είναι οι επικρατέστεροι στην Ευρώπη και παγκοσμίως. Σποραδικές περιπτώσεις ή επιδημίες, ανεξάρτητα με το αν εμφανίστηκαν στα πλαίσια μιας κοινότητας ή ενός νοσοκομείου, επαληθεύουν ότι τα στελέχη GG2 είναι υπεύθυνα για 75% των περισσότερων περιπτώσεων (Hale et al 2000, Koopmans 2001, Schreier et al 2000).

Παρόλα αυτά, η κατανομή των γενοτύπων διαφέρει ανάμεσα στις χώρες αλλά και μέσα στις χώρες από χρόνο σε χρόνο. Στο Βόρειο και Δυτικό Yorkshire και Humberside, UK, τρεις αντιγονικοί τύποι παρακολούθηθηκαν για πάνω από 6 χρόνια(από το 1992-1998)(Hale et al 2000). Τα στελέχη GG2 (αντιπροσωπεύονται από τους ιούς Grimsby-like και Mexico-like) ήταν τα επικρατέστερα για ολόκληρη την περίοδο της μελέτης. Κατά τον πρώτο χρόνο της μελέτης, επικρατούσε ο ιός Grimsby. Κατά το δεύτερο χρόνο της μελέτης ο ιός Mexico εμφανιζόταν σαν το πιο κοινό στέλεχος, μέχρι που αντικαταστάθηκε ξανά από τον ιό Grimsby κατά τον επόμενο χρόνο. Ένα παρόμοιο πρότυπο παρατηρήθηκε σε επιδημία γαστρεντερίτιδας στην Ολλανδία(Koopmans et al 2001).

Έτσι η μόλυνση από NLV φαίνεται να προκαλεί βραχυπρόθεσμη ανοσία, ενώ αλλαγές στην ανοσία θα μπορούσαν να επιτρέψουν την εμφάνιση ενός νέου ενδημικού στελέχους(Hale et al 2000). Ίσως οι δεξαμενές ιών σε ζώα και οι γενετικές παραλλαγές αυτών μπορούν να αναπτύξουν διαφορετικό τροπισμό (και μπορούν να επεκταθούν πιο εύκολα μέσω π.χ. της αναπνευστικής οδού (Koopmans et al 2001).



Εικόνα 10 :Φυλογενετικό Δέντρο:κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ένα σύνολο στελεχών Νοροϊών τα οποία είναι αντιπροσωπευτικά για τις γενετικές ομάδες I ως V(Zheng et al 2006).

1.7.1 Ο Επικρατής ρόλος των Νοροϊών στην Επιδημική Γαστρεντερίτιδα

Ο κύριος ρόλος των Νοροϊών ως παράγοντα επιδημικής γαστρεντερίτιδας έχει επιβεβαιωθεί σε πολυάριθμες τοποθεσίες σε όλο τον κόσμο(Inouye S et al 2000,Vinje J et al 1996), και είναι η σημαντικότερη αιτία των μη βακτηριακών επιδημιών γαστρεντερίτιδας . Σε μια ανάλυση 233 μη βακτηριακών κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας που αναφέρθηκαν στα Κέντρα Ελέγχου Ασθένειας και Πρόληψης (CDC) μεταξύ Ιουλίου 1997 και Ιουνίου 2000, 217(93%) συνδέθηκαν με Νοροϊούς (Frankhauser RL et al 2002). Σε μια μεγαλύτερη έρευνα 3174 μη βακτηριακών κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας που εμφανίστηκαν στην Ευρώπη μεταξύ 1995 και 2000, 85% συνδέθηκαν με Νοροϊούς (Lorman BA et al 2003). Ιδιαίτερα αξιοσημείωτος είναι ο κυρίαρχος ρόλος των Νοροϊών στα κρούσματα τροφικής γαστρεντερίτιδας . Υπολογίζεται ότι 23 εκατομμύρια άνθρωποι προσβάλλονται από Νοροϊούς ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες και το 40% προέρχεται από τρόφιμα(Mead PS et al 1999).

1.8 ΜΕΤΑΔΟΣΗ

1.8.1 Πορείες Μόλυνσης

Οι μελέτες σε εθελοντές κατέδειξαν ότι οι ιοί Norwalk, Hawaii, Montgomery Country και Snow Mountain προκάλεσαν τη γαστρεντερίτιδα όταν η χορήγηση έγινε από τη στοματική οδό με μια περίοδο επώασης 24 ωρών . Η μετάδοση μέσω της αναπνευστικής οδού δεν έχει διερευνηθεί για αυτή την ομάδα παραγόντων, αν και έχει προταθεί από επιδημιολογικές μελέτες (Chadwick PR et al 1994). Ο ιός ανιχνεύθηκε στο εμετικό περιεχόμενο που λήφθηκε από τους μολυσμένους εθελοντές , ενώ οι ρινοφαρυγγικές πλύσεις από έναν εθελοντή με πειραματικά προκληθείσα γαστρεντερίτιδα με Norwalk δεν προκάλεσαν την ασθένεια σε 3 επόμενους εθελοντές (Dolin R et al 1972).

1.8.2 Τρόποι Μετάδοσης

Οι HuCVs προκαλούν επιδημίες γαστρεντερίτιδας περιλαμβάνοντας τη μετάδοση μέσω τροφής, μέσω πόσιμου νερού και από άτομο σε άτομο. Στα τελευταία χρόνια περιγράφηκε ο ρόλος της περιβαλλοντικής μόλυνσης και η μόλυνση των άβραστων φρούτων και λαχανικών .Η μετάδοση από άτομο σε άτομο έχει τεκμηριωθεί με 2 τρόπους : μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και μέσω σχηματισμού αερολυμάτων από τον εμετό υπό μορφή ρουκέτας. Στην πραγματικότητα , οι επιδημίες είναι συνήθως αποτέλεσμα περισσότερων από έναν τρόπων μετάδοσης και είναι δύσκολο να αποδοθούν σε ένα μόνο τρόπο μετάδοσης. Για παράδειγμα , ένας χειριστής τροφίμων ίσως μολυνθεί από ένα άτομο από το σπίτι του. Ο χειριστής τροφίμων μπορεί στη συνέχεια να μολύνει κάποιο προϊόν, που μπορεί να οδηγήσει σε επιδημία η οποία επεκτείνεται από άτομο σε άτομο . Τρόποι μετάδοσης (Εικόνα 11):

(1)Μετάδοση από άτομο σε άτομο: Γενικά η εξάπλωση από άτομο σε άτομο είναι ο πιο κοινός τρόπος μετάδοσης στις επιδημίες γαστρεντερίτιδας. Από το 1992 ως το 1995, η μετάδοση από άτομο σε άτομο αναφέρθηκε ως ο πρωταρχικός τρόπος μετάδοσης στο 72% των κρουσμάτων από NLV στην Αγγλία και στην Ουαλία. Ένα πρόσφατο περιστατικό συνέβη όταν ένα άτομο που έτρωγε σε ένα εστιατόριο έκανε εμετό. Η ανάλυση ακολουθίας έδειξε ότι τα άτομα που δειπνούσαν στο εστιατόριο ένωσαν διαδοχικά άρρωστα(μέσα σε 36 ώρες) και ανιχνεύθηκαν στελέχη NLV στα

κόπρανά τους. Τα άτομα που κάθονταν κοντά στο άτομο που έκανε εμετό είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να μολυνθούν (Marks et al 2000).

(2) Μετάδοση μέσω τροφής: Αυτή ποικίλλει από χώρα σε χώρα. Στη Σουηδία, το 16% των κρουσμάτων από HuCV από το 1994-1998 ήταν συνδεδεμένα με μετάδοση μέσω τροφής ή νερού. Στο Ηνωμένο Βασίλειο το φαγητό εμπλέκεται στο 5% των κρουσμάτων από το 1992-1999 (Koormans et al 2001). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, τα οχήματα μεταφοράς τροφίμων εκτιμάται ότι παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στις μολύνσεις (40% των μολύνσεων από NLV) (Mead et al 1999). Η μόλυνση μέσω τροφής εμφανίζεται να είναι ένας σημαντικός τρόπος μετάδοσης καθώς οι μοντέρνοι τρόποι διανομής τροφίμων επιτρέπουν στους ιούς να φθάνουν σε μεγάλο πληθυσμό σε σύντομο χρονικό διάστημα.

(2.1) Δίθυρα μαλάκια: Τα δίθυρα μαλάκια αποτελούν φίλτρα των τροφών που προσλαμβάνουν. Οι HuCVs δεν αντιγράφονται στα οστρακόδερμα τα οποία συσσωρεύουν και συγκεντρώνουν ιούς από μολυσμένα νερά και απόβλητα. Καθώς τα στρείδια καταναλώνονται ωμά ή ελαφρά μαγειρεμένα, προκαλούν μολύνσεις (Advisory Committee on the microbiological safety of food 1998, Ministry of Agriculture Food and Fisheries 1996). Συχνά αναφέρονται κρούσματα γαστρεντερίτιδας από στρείδια σε ανθρώπους (Godoy et al 2000). Καθώς τα οστρακόδερμα μολύνονται από απόβλητα ίσως κυκλοφορούν πολλαπλά HuCVs στελέχη (Lees 2000). Έρευνες σε κρούσματα εντόπισαν μικτές μολύνσεις (από NLV της γενετικής ομάδας I και της γενετικής ομάδας II) σε άτομα τα οποία καταναλώνουν άβραστα οστρακόδερμα.

(2.2) Προϊόντα μολυσμένα από χειριστές τροφίμων: Οι ιοί HuCVs συνήθως καταστρέφονται μετά από επαρκές μαγείρεμα (>1 λεπτό στους 90° C) και τα οχήματα μολύνονται από μολυσμένους χειριστές τροφίμων. Η μόλυνση τροφίμων από εμετό αποδείχθηκε από ένα κρούσμα σε ένα ξενοδοχείο στο βόρειο Yorkshire, στην Αγγλία, όταν ένας εργαζόμενος της κουζίνας ξαφνικά έκανε εμετό σε ένα νεροχύτη. Ο νεροχύτης καθαρίστηκε με απολυμαντική χλωρίνη, αλλά ακόμη έμεινε επαρκές NLV φορτίο για να μολυνθεί μια πατατοσαλάτα που προετοιμάστηκε στο νεροχύτη την επόμενη μέρα. Τυπικές οδηγίες συνήθως προτείνουν ότι οι χειριστές τροφίμων δεν πρέπει να επιστρέφουν στη δουλειά για 48-72 ώρες μετά τον τερματισμό των συμπτωμάτων (Hedberg and Osterholm 1993).

(2.3)Μόλυνση φρούτων και λαχανικών: Φρούτα και λαχανικά μπορούν να μολυνθούν από τα νερά της άρδευσης, το πλύσιμο ή το ψέκασμα πριν το πάγωμα ή από μολυσμένους χειριστές τροφίμων που εμπλέκονται στη συγκομιδή.

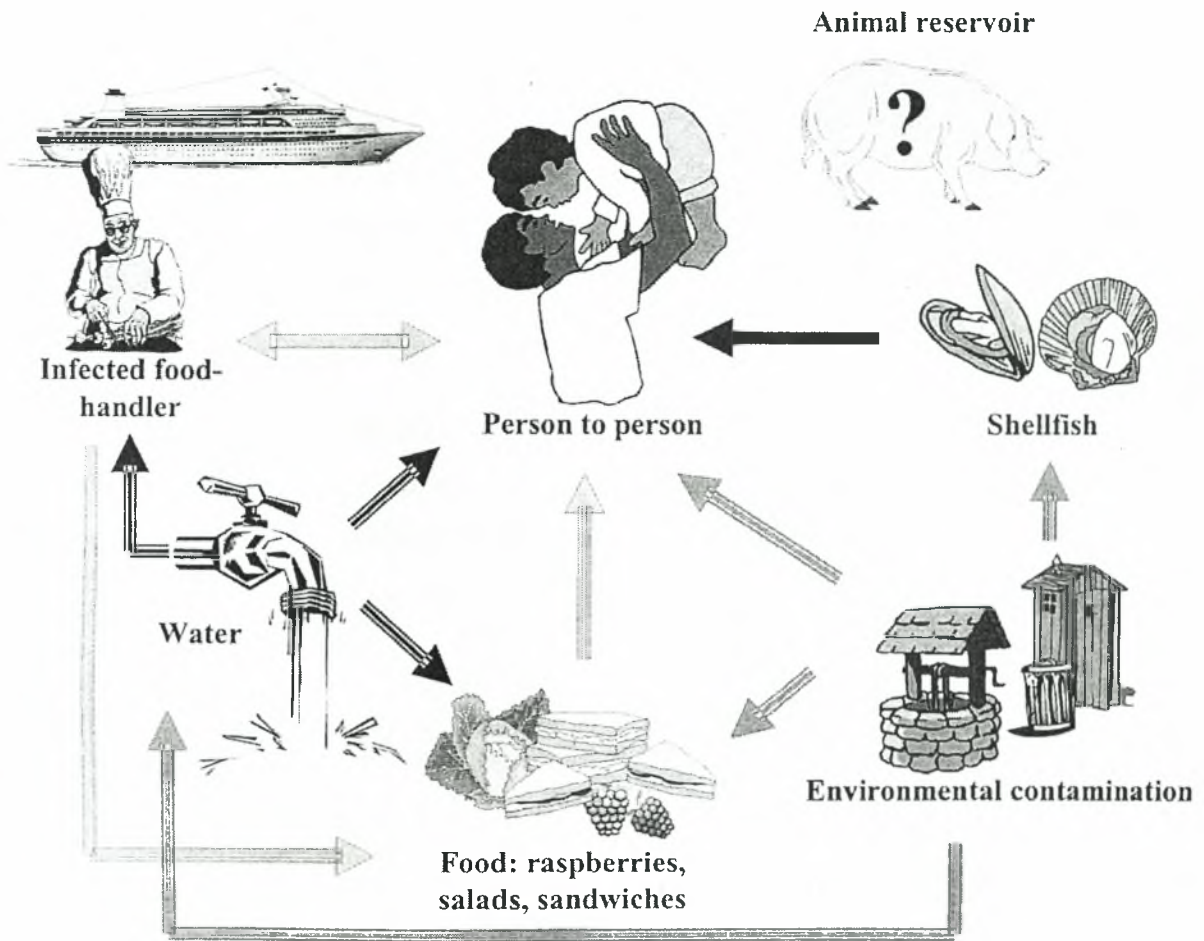
(3)Μετάδοση μέσω νερού: Το πόσιμο νερό μπορεί να αποτελέσει πηγή για κρούσματα ιϊκής γαστρεντερίτιδας, ως αποτέλεσμα της μόλυνσης ιδιωτικών πηγαδιών, δημόσιων πηγαδιών και των συστημάτων νερού (Karlan et al 1982c). Εμπορική διανομή και παραγωγή πάγου διευκόλυνε την γεωγραφική εξάπλωση του NLV . Επίσης τα εμφιαλωμένα νερά ίσως να είναι μολυσμένα. Μια έρευνα στη Σουηδία ανίχνευσε NLVs με RT-PCR σε 21 από τα 63 μπουκάλια εμπορικά διαθέσιμου μεταλλικού νερού(Beuret et al 2000).

(4)Άλλη περιβαλλοντική μόλυνση: Η μέθοδος RT-PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση NLVs σε ανακυκλώσιμα νερά(Schvoerer et al 2000), σε απόβλητα, και σε επιφάνειες διαφορετικών υλικών(Wyn-Jones et al 2000). Πολλές επιφάνειες όπως τα χαλιά, οι τουαλέτες, τα καλύμματα είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα ιού . Για παράδειγμα , η μόλυνση από NLV 2 ανδρών που μετακίνησαν χαλιά μετά από ένα κρούσμα σε νοσοκομείο ,αποδόθηκε σε αυτή την περιβαλλοντική έκθεση.

(5)Ζωονόσοι: Οι caliciviruses είναι σημαντικά παθογόνα στα ζώα όπως και στους ανθρώπους. Πρόσφατες ανακαλύψεις έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην πιθανότητα μετάδοσης μεταξύ των ζώων. Στο Ηνωμένο Βασίλειο , ο μοριακός χαρακτηρισμός των caliciviruses των βοοειδών απέδειξε ότι είναι περισσότερο όμοιοι με τους ανθρώπινους NLVs από ότι με τους ζωικούς caliciviruses . Επιπρόσθετα ,αυτοί οι ιοί έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν διάρροια σε νεογέννητα μοσχάρια κάτω από πειραματικές συνθήκες(Liu et al 1999).

(6)Μετάδοση σε νοσοκομεία και ιδιωτικές κλινικές: Για ένα μεγάλο αριθμό αιτιών, οι NLVs αποτελούν ένα ρίσκο για την υγεία στα νοσοκομεία και στις ιδιωτικές κλινικές. Ο ιός μπορεί να εισέλθει σε ιδρύματα μέσω της τροφής ,του νερού ή από έναν επισκέπτη (Chadwick et al 2000,Centers for Disease Control and Prevention 2001). Για αυτούς τους λόγους ,επιδημίες οι οποίες είναι δύσκολο να ελεγχθούν ,μπορούν να συμβούν σε αυτά τα ιδρύματα (Mayoral et al 2000). Το υψηλό ποσοστό προσβολής από HuCV δεν περιορίζεται μόνο σε οικότροφους και ασθενείς, καθώς και το προσωπικό μπορεί να προσβληθεί σε ένα ποσοστό που κυμαίνεται στο 30-50%. Η μόλυνση του προσωπικού δημιουργεί ένα πρόβλημα

καθώς οι κινήσεις τους διευκολύνουν τη μετάδοση σε νέους χώρους . Κατά τη διάρκεια του χειμώνα 1997-1998 στη Γερμανία το 1/3 όλων των κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας συνέβη σε νοσοκομεία και το 1/3 σε ιδιωτικές κλινικές (Schreier et al 2000).



Εικόνα 11 :Απεικόνιση των τρόπων μετάδοσης(Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., LoBue, A.D., Cannon, J.L., Zheng, D., Vinje, J., Baric, R.S. 2008)

1.9 ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ CALICIVIRUS ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ

1.9.1 Εποχικότητα

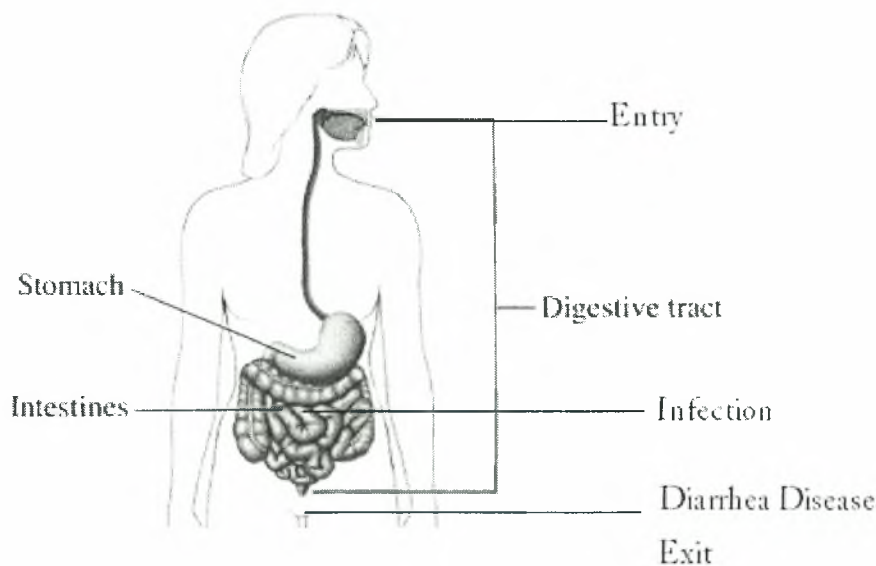
Η περιγραφή του Zahorsky για την χειμωνιάτικη ασθένεια εμετού, έδειξε ότι η ιϊκή γαστρεντερίτιδα έχει διαφορετική εποχικότητα(Zahorsky 1929).Ο Mounts και λοιποί αναφέρουν ότι ,σε 12 μελέτες ο ιός NLV είναι επικρατέστερος κατά τη διάρκεια των κρύων μηνών του χρόνου (Mounts et al 2000).Στις ευρωπαϊκές καιρικές συνθήκες ,τα επίπεδα NLVs άρχισαν να αυξάνονται τον Οκτώβριο ή Νοέμβριο , με κορύφωση γύρω στον Ιανουάριο και μειώνονταν τον Μάιο ή Ιούνιο(Hedlund et al 2000, Mounts et al 2000, Pang et al 2000).

1.9.2 Ηλικιακή κατανομή

Οι μολύνσεις από ιούς NLV και SLV μπορούν να συμβούν σε οποιαδήποτε ηλικία, με τον ιό NLV να είναι τόσο συχνός όσο ο ιός rotavirus(Pang et al 2000). Ορολογικές μελέτες αποδεικνύουν ότι η πλειοψηφία των παιδιών μολύνονται στην ηλικία των 5 ετών ενώ οι ιοί NLV και SLV είναι κοινά παθογόνα μεταξύ των ενηλίκων(de Wit et al 2001b).

1.10 ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

Οι NLVs και SLVs μεταδίδονται μέσω της στοματικής οδού . Σαν ιοί που είναι σταθεροί σε οξέα περνούν διαμέσου του στομάχου και η αντιγραφή πραγματοποιείται στο λεπτό έντερο(Εικόνα 12). Οι περισσότερες από τις υπάρχουσες γνώσεις αφορούν την παθογένεση των HuCVs(human Caliciviruses) που προέρχονται από μελέτες σε εθελοντές στην Αμερική. Τα υπό εξέταση άτομα έδωσαν εντερικά δείγματα για βιοψία πριν και μετά την έκθεσή τους, στους ιϊκούς παράγοντες. Η τεχνική EM έδειξε ότι τα άτομα με την κλινική ασθένεια παρουσίασαν αλλοιώσεις στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου . Το εσωτερικό του βλεννογόνου ερεθίστηκε και τα επιθηλιακά κύτταρα ανέπτυξαν μια μη φυσιολογική εμφάνιση. Η στόμωση των λαχνών, το κόντεμα των μικρολαχνών, η διαστολή του ενδοπλασματικού δικτύου , τα διογκωμένα μιτοχόνδρια και το ενδοκυττάριο οίδημα επίσης παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά. Μέσα σε 2 εβδομάδες ,το λεπτό έντερο επέστρεψε σε μια φυσιολογική ιστολογική κατάσταση σε αυτούς τους υγιείς εθελοντές(Dolin et al 1975). Παρ'όλα αυτά το εύρος της παθολογίας το οποίο μπορεί να εκδηλωθεί σε ευπαθείς ανθρώπους (παιδιά και ηλικιωμένους)παραμένει άγνωστο.



Εικόνα 12 : Πορεία μόλυνσης (2008 Nucleus Medical Art, Inc).

1.11 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Απουσία άλλων παραγόντων, μολύνσεις με NLVs και SLVs ιούς είναι τυπικά ήπιες και αυτοπεριοριζόμενες. Η έναρξη της ασθένειας είναι απότομη, συνήθως μέσα σε 24-28 ώρες μετά την έκθεση και η διάρκεια της ασθένειας είναι σχετικά μικρή(12-60 ώρες). Η ασθένεια που προκαλείται από τους Νοροϊούς μπορεί περιστασιακά να αποδειχθεί σοβαρή και χρειάζεται ιατρική παρέμβαση (Amess MK et al 2000). Ένα υψηλό ποσοστό ασθενών παρουσιάζουν διάρροια, κοιλιακές κράμπες και ναυτία(Hedberg and Osterholm 1993), αλλά η υψηλή συχνότητα του εμετού υπό μορφή ρουκέτας στους ενήλικες διαχωρίζει τον ιό NLV από άλλα κοινά ιϊκά και βακτηριακά παθογόνα όπως η Salmonella, η Shigella και ο S.aureus .Στην πραγματικότητα , η αναγνώριση ενός κρούσματος από ιό NLV μπορεί αξιόπιστα να βασιστεί σε κλινικά συμπτώματα και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά. Οι κλινικές εκδηλώσεις που παρατηρήθηκαν σε 38 κρούσματα γαστρεντερίτιδας που συνδέθηκαν με τον ιό NV ήταν οι εξής :ναυτία (79%), εμετός (69%), διάρροια (66%), κοιλιακές κράμπες (30%), πονοκέφαλος (22%), πυρετός (37%), ρίγος (32%) , μυαλγίες (26%) και πόνους στο λαιμό (18%)(Kaplan JE et al 1982). Αιματούχα κόπρανα δεν αναφέρθηκαν. Ο εμετός εμφανιζόταν συχνότερα από τη διάρροια στα παιδιά ,ενώ στους ενήλικες παρατηρήθηκε το αντίστροφο. Το φάσμα των κλινικών εκδηλώσεων που παρατηρήθηκε σε 2 εθελοντές που ανέπτυξαν την ασθένεια μετά από μόλυνση με NV ιό διέφερε σημαντικά. Αν και τα 2 άτομα έλαβαν το ίδιο εμβόλιο , ο ένας εθελοντής ανέπτυξε μια ασθένεια που χαρακτηρίστηκε από τον εμετό χωρίς διάρροια , ενώ ο άλλος είχε τη διάρροια χωρίς εμετό. Οι κλινικές εκδηλώσεις που παρατηρήθηκαν σε 31 πειραματικά μολυσμένους εθελοντές που αρρώστησαν ήταν όμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν παραπάνω, ενώ σε έναν εθελοντή δόθηκαν παρεντερικά υγρά επειδή έκανε εμετό 20 φορές εντός 24 ωρών. Από 16 εθελοντές που ανέπτυξαν την ασθένεια μετά από τη μόλυνση με τους ιούς Norwalk ή Hawaii , 14 ανέπτυξαν παροδική λεμφοπενία (Dolin R et al 1976). Αυτό αποδόθηκε σε μια ανακατανομή της κυκλοφορίας των λεμφοκυττάρων στην περιοχή μόλυνσης από τον ιό στο λεπτό έντερο.

Οι ασθένειες που προκαλούνται από τους ιούς Hawaii, Montgomery Country και Snow Mountain στους εθελοντές δεν μπορούν να διακριθούν κλινικά από εκείνες που προκαλούνται από τον ιό NV (Dolin R et al 1982).

Μια σύγκριση των κλινικών χαρακτηριστικών της γαστρεντερίτιδας που προκαλούνται από τους noroviruses ή sapoviruses στα νήπια της Φινλανδίας και τα μικρά παιδιά έδειξε ότι οι noroviruses προκαλούν εμετό ως κυρίαρχο κλινικό χαρακτηριστικό γνώρισμα, ενώ οι sapoviruses προκαλούν συνήθως διάρροια (Pang XL et al 2000).

1.12 ΥΠΟΘΕΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Μια ανάλυση των κοινών χαρακτηριστικών γνωρισμάτων σε 38 κρούσματα γαστρεντερίτιδας από ιό NV, δείχνει ότι μια προσωρινή διάγνωση της ασθένειας από τους Νοροϊούς μπορεί να γίνει κατά τη διάρκεια ενός ξεσπάσματος εάν τα ακόλουθα κριτήρια ικανοποιούνται: (α) δεν ανιχνεύονται βακτηριακά ή παρασιτικά παθογόνα, (β) ο εμετός εμφανίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 50% των περιπτώσεων, (γ) η μέση διάρκεια της ασθένειας κυμαίνεται από 12 ως 60 ώρες και (δ) η περίοδος επώασης είναι 24 ως 48 ώρες (Kaplan JE et al 1982).

1.13 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

1.13.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

Καθώς ένα σύστημα κυτταρικής καλλιέργειας για HuCV δεν έχει αναπτυχθεί, η EM αποτελεί ένα θεμελιώδες εργαλείο που χρησιμοποιείται από τους ερευνητές. Η άμεση εξέταση μη συμπυκνωμένου υλικού κοπράνων από τα κρούσματα γαστρεντερίτιδας (που εμφανίζονται συνήθως στα μεγαλύτερα παιδιά και στους ενήλικες), έχει περιορισμένη αξία ως διαγνωστικό εργαλείο για τους Νοροϊούς επειδή τα ιϊκά σωματίδια είναι συνήθως παρόντα σε χαμηλή συγκέντρωση και μπορούν δύσκολα να διακριθούν από άλλα ιϊκά σωματίδια παρόντα στα κόπρανα. Για αυτό το λόγο, οι Νοροϊοί πρέπει να προσδιοριστούν στα κόπρανα μέσω της ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας (IEM)(Karikian AZ et al 1980). Η μορφολογία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση μεταξύ των noroviruses και sapoviruses.

1.13.2 Ανοσοδοκιμές

Η ανάπτυξη των rVLPs έχει δώσει ώθηση στην βελτιστοποίηση διαγνωστικών δοκιμών βασισμένων σε αντισώματα ELISA (Atmar RL 2001, Jiang X et al 2000). Ανοσοδοκιμές για την ανίχνευση διαφόρων ιών, και από τις 2 γενετικές ομάδες των noroviruses και sapoviruses, έχουν αναπτυχθεί έναντι των rVLPs. Αν και αρκετά ευαίσθητες, αυτές οι τεχνικές είναι ιδιαίτερα συγκεκριμένες για την ανίχνευση των VLPs (Jiang X et al 1995). Πρόοδος έχει σημειωθεί για την ανίχνευση Νοροϊών με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Hale AD et al 2000, Kitamoto N et al 2002, Parker TD et al 2005, Yoda T et al 2003), που μπορούν να ανιχνεύσουν ιϊκά αντιγόνα στα κλινικά δείγματα, καθώς υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα kit ELISA.

Η ELISA που χρησιμοποιεί rVLPs ως αντιγόνα είναι ειδική, ευαίσθητη και αποδοτική για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των ανθρώπινων caliciviruses και έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μεγάλης κλίμακας ορο-επιδημιολογικές μελέτες. Είναι πολύ δύσκολο να προσδιοριστεί ο αντιγονικός τύπος ενός στελέχους Νοροϊού από την ορολογική ανάλυση λόγω των διασταυρούμενων αντιδράσεων των αντισωμάτων που ανιχνεύονται από την ELISA (Belliot G et al 2001).

1.13.3 Μοριακές τεχνικές

Αυτή την περίοδο, η RT-PCR είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανίχνευση των Νοροϊών (Εικόνα 13). Με αυτή τη μέθοδο οι Νοροϊοί μπορούν να ανιχνευθούν σε κλινικά δείγματα (κόπρανα ή εμετό) και σε μολυσμένα τρόφιμα, νερό

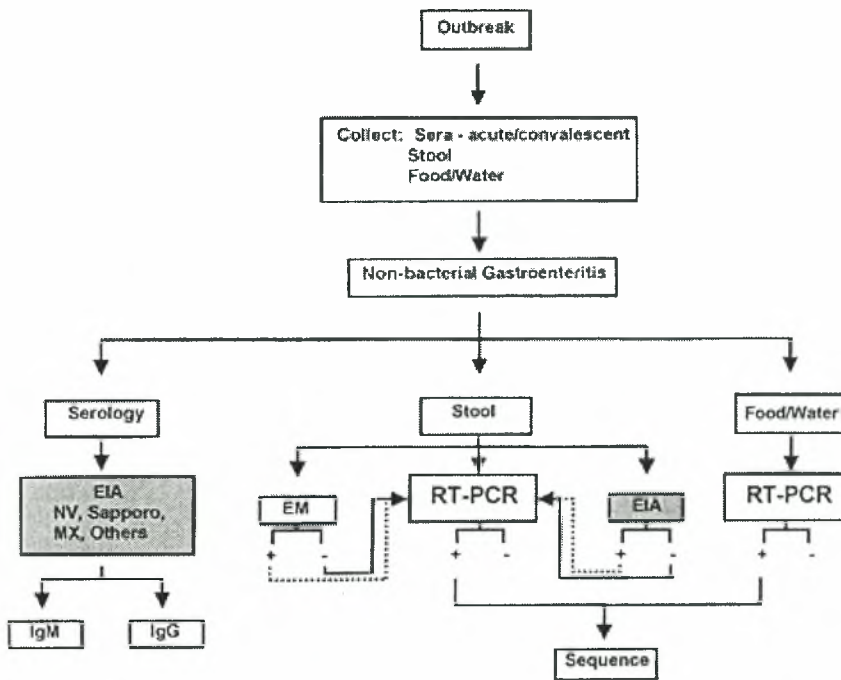
ή μολυσμένες επιφάνειες . Η εφαρμογή της real time RT-PCR επιτρέπει επίσης τη γρήγορη ανίχνευση (Kageyama T et al 2003). Υπάρχουν διάφορες εκτιμήσεις για τη βέλτιστη απόδοση των τεχνικών RT-PCR. Καταρχήν ,η διαδικασία εξαγωγής του ιϊκού RNA πρέπει να επιτρέψει τον καθαρισμό ενός προτύπου RNA χωρίς ανασταλτικούς παράγοντες(αναστολείς) της RT-PCR. Οι εσωτερικοί RNA έλεγχοι (εσωτερικά controls) μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή των κλινικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων για να αποφευχθούν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα(Parshionikar SU et al 2004). Δεύτερον , η επιλογή των εκκινητών είναι σημαντική ,επειδή υπάρχει ιδιαίτερη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των κυκλοφορούντων στελεχών. Διάφορα ζεύγη εκκινητών έχουν περιγραφεί από τις ιδιαίτερα συντηρημένες περιοχές του RNA γονιδιώματος (συνήθως η περιοχή της πολυμεράσης), (Vinje J et al 2003). Η RT-PCR, που συνδέεται με την ανάλυση της ακολουθίας των απλικονίων ,έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για να ανιχνεύσει και να χαρακτηρίσει τους Νοροϊούς στα διάφορα κρούσματα γαστρεντερίτιδας.

Μια παραλλαγή της PCR, η nested RT-PCR έχει χρησιμοποιηθεί για αύξηση της ευαισθησίας. Ο Green και λοιποί έδειξαν ότι χρησιμοποιώντας 2 γύρους της PCR, με το δεύτερο ζεύγος των εκκινητών "ένθετο" στην περιοχή που πολλαπλασιάστηκε από τον 1^ο γύρο ,μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία 10-1000 φορές και μπορεί να αυξήσει και την ειδικότητα.Η nested RT-PCR ίσως είναι η πιο εφαρμόσιμη σε περιβαλλοντικές και τροφικές αναλύσεις καθώς ο ιός βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Green et al 1998a). Όμως ο κίνδυνος επιμόλυνσης και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα είναι στο επίκεντρο.

Ένας αριθμός τεχνικών χρησιμοποιήθηκε για να επικυρωθούν και να αναλυθούν τα προϊόντα της RT-PCR. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι ένας απλός τρόπος οπτικοποίησης για να διαπιστωθεί αν τα προϊόντα DNA ενισχύθηκαν στο προβλεπόμενο μήκος(Green et al 1998a).Μη ειδική DNA ενίσχυση θα δώσει άλλες ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης ,με αποτέλεσμα τη δύσκολη ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Υπάρχει ένας αριθμός δοκιμών υβριδισμού που περιλαμβάνει dot, slot, liquid and Southern υβριδισμό.Η γενετική ποικιλομορφία των ιών NLVs σημαίνει ότι δεν υπάρχει ένας μοναδικός ανιχνευτής για όλους τους ιούς και απαιτείται πλήθος ανιχνευτών για την ενίσχυση της πλειοψηφίας των κυκλοφορούντων στελεχών(Vinje and Koopmans 1996).

Η αλληλούχιση DNA των απλικονίων προσφέρει τις περισσότερες πληροφορίες (Vinje et al 2000). Οι ακολουθίες μπορούν να συγκριθούν με αυτές που προέρχονται από άλλα δείγματα, και ίσως δώσουν μια ένδειξη για μια κοινή πηγή προέλευσης της επιδημίας γαστρεντερίτιδας. Αρκετά ολόκληρα NLV γενόματα έχουν αλληλουχηθεί (Atmar and Estes 2001, Vinje et al 2000), και η καλά συντηρημένη περιοχή της ροΙ έχει το μεγαλύτερο πλεονέκτημα καθώς μπορεί να ενισχυθεί με μικρές παραλλαγές μιας μεθόδου.



Εικόνα 13:Σχηματική αναπαράσταση των στρατηγικών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της μόλυνσης από HuCVs(Schwab KJ et al 2000).

1.13.4 Επιδημιολογικές Μέθοδοι

Απουσία εργαστηριακής επιβεβαίωσης, τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά ενός κρούσματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ανιχνευθεί η ιϊκή αιτία. Μια ομάδα κριτηρίων που προτάθηκε για το εάν ένα κρούσμα μπορεί να αποδοθεί σε ιϊκή αιτία, είναι τα εξής: (1) καλλιέργειες κοπράνων είναι αρνητικές για βακτηριακά παθογόνα, (2) μέσος χρόνος επώασης 24-48 ώρες, (3) μέση διάρκεια 12-60 ωρών, και

(4) εμφανίζεται εμετός σε >50% των περιπτώσεων. Έχει προταθεί ότι τα κριτήρια επεκτείνονται για να συμπεριλάβουν την αυξημένη συχνότητα του εμετού σχετιζόμενου με τον πυρετό σαν εναλλακτικό κριτήριο(Hedberg and Osterholm 1993). Αυτή η μέθοδος αποτίμησης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό συγκεκριμένης ιϊκής αιτιολογίας(NLV ή SLV για παράδειγμα),αλλά είναι χρήσιμο εργαλείο για την δημόσια υγεία .

1.14 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Όπως προαναφέρθηκε ,οι Νοροϊοί προκαλούν μια ήπιας μορφής γαστρεντερίτιδα η οποία υποχωρεί χωρίς περαιτέρω επιπλοκές(Dolin R 1979). Η θεραπεία μέσω αποκατάστασης των ηλεκτρολυτών είναι συνήθως επαρκής για να αντικαταστήσει την απώλεια υγρών(Crane JK et al 1995). Η παρεντερική χορήγηση υγρών μπορεί να είναι απαραίτητη, αν εμφανιστεί εμετός ή διάρροια .Όπως σημειώθηκε ,επιβάλλεται η εισαγωγή σε νοσοκομείο όταν η αφυδάτωση είναι παρατεταμένη. Επίσης έχουν αναφερθεί θάνατοι, σε εξασθενημένους ηλικιωμένους, από γαστρεντερίτιδα προκαλούμενη από Νοροϊό ή μικρά παιδιά μολυσμένα από ανθρώπινους caliciviruses. Οι ομάδες ασθενών που διατρέχουν το μεγαλύτερο κίνδυνο κλινικής παρακολούθησης από τη μόλυνση με Νοροϊό είναι οι ασθενείς με καρδιαγγειακή πάθηση, εκείνοι που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά , οι ηλικιωμένοι και αυτοί που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση .

Κατά τη διάρκεια της πειραματικά προκληθείσας ασθένειας από Νοροϊό σε ενήλικες , παρατηρήθηκε μείωση της οξύτητας και της διάρκειας των κοιλιακών κραμπών όταν μετά την έναρξη των συμπτωμάτων έγινε στοματική χορήγηση υφάλμυρου βισμούθιου. Επίσης, η μέση διάρκεια των γαστρεντερικών συμπτωμάτων μειώθηκε από 20 ως 14 ώρες. Δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την επεξεργασία ο αριθμός, το βάρος και η περιεκτικότητα σε νερό των κοπράνων όπως επίσης και η ένταση της έκκρισης των ιών.

1.15 ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

Η έλλειψη κυτταροκαλλιιεργειών για την ανάπτυξη των Νοροϊών έχει εμποδίσει την ανάλυση για την ανάπτυξη εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Επιπρόσθετα ,οι ίδιοι οι ιοί δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή για το ζωντανό ή αδρανοποιημένο εμβόλιο. Αυτό το τελευταίο πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί από τα διαθέσιμα rVLPs που αποτελούν μια άφθονη πηγή καψιδιακού αντιγόνου. Κατά την 1^η φάση των μελετών των Norwalk rVLPs ως εμβολίων, όταν αυτά χορηγούνταν από τη στοματική οδό στους ενήλικες εθελοντές ,αποδείχθηκαν ασφαλή και προκάλεσαν ικανοποιητική ανοσία (Tacket CO et al 2003). Εάν ο μηχανισμός της ανοσίας διευκρινιστεί , ίσως τα rVLPs έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο υπομονάδων .Ένα ασφαλές και αποτελεσματικό εμβόλιο θα μπορούσε να μειώσει τα ποσοστά της επιδημικής γαστρεντερίτιδας. Με ένα τέτοιο εμβόλιο θα μειωνόταν ο αριθμός των επεισοδίων γαστρεντερίτιδας στα νήπια και στα παιδιά ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες. Αν και η προκαλούμενη από Νοροϊούς γαστρεντερίτιδα είναι μια ήπια ασθένεια ,η μείωση των διαρροϊκών επεισοδίων μπορεί να είναι σημαντική για ένα εξασθενημένο, υποσιτιζόμενο νήπιο, επειδή έχει προταθεί ότι τα επαναλαμβανόμενα διαρροϊκά επεισόδια οδηγούν στον υποσιτισμό μέσω διαδοχικών βλαβών στο βλεννογόνο του εντέρου.

1.16 ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ

Οι Νοροϊοί είναι γενικά ανθεκτικοί στον καθαρισμό των επιφανειών και των μολυσμένων ουσιών με αιθανόλη (Barker J et al 2004, Duizer E et al 2004). Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην υγιεινή της επεξεργασίας των τροφίμων λαμβάνοντας υπόψη τα συχνά περιστατικά γαστρεντερίτιδας από μόλυνση τροφίμων. Μέτρα τα οποία αυξάνουν την καθαρότητα του πόσιμου νερού ,του νερού των χώρων αναψυχής(λίμνες, ποτάμια, θάλασσα, πισίνες) καθώς και ο αυστηρός ιολογικός έλεγχος των κέντρων επεξεργασίας λυμάτων θα μειώσουν σημαντικά τη συχνότητα κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας (Koopmans M 2004).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση στελεχών Νοροϊών που ανήκουν στις γενετικές ομάδες I και II(GI και GII) από κλινικά δείγματα κοπράνων ,που προέρχονται από ασθενείς με συμπτώματα γαστρεντερίτιδας.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

2.1.1 Θετικά στελέχη

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες στάλθηκαν από την Αγγλία με πηγή προέλευσης το Αφγανιστάν(από Άγγλους στρατιώτες που είχαν μολυνθεί με νοροϊνίγυ) και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ I (GI)	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ II (GII)
GI 1	GII 1
GI 2	GII 2
GI 3	GII 3

Πίνακας 2: Φαίνονται τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες

2.1.2Κλινικά δείγματα

Για τη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 29 κλινικά δείγματα κοπράνων τα οποία ήταν ύποπτα για Νοροϊούς. Τα δείγματα αυτά μαζί με τα στοιχεία και την κωδικοποίηση τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Δείγμα(κωδικοποίηση)	Στοιχεία δείγματος
A1	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A2	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A3	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A4	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A5	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A6	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A7	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A8	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A9	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων

Δείγμα(κωδικοποίηση)	Στοιχεία δείγματος
A10	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A11	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A12	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A13	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A15	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
B1	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
B2	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
B3	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
B4	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
B7	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
B8	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
B9	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
B10	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
NORO 1	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
NORO 2	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
NORO 3	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
1	Νοσοκομείο Λάρισας
2	Νοσοκομείο Λάρισας
3	Νοσοκομείο Λάρισας
4	Νοσοκομείο Λάρισας

Πίνακας 3:Φαίνονται τα στοιχεία και η κωδικοποίηση των κλινικών δειγμάτων.

2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

Πριν από τη χρήση των κοπράνων ως δειγμάτων προηγείται ειδική διαδικασία επεξεργασίας σύμφωνα με τους κανόνες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (Π.Ο.Υ).

Η επεξεργασία των κοπράνων πραγματοποιείται σε θάλαμο βιολογικής προστασίας (Biological Safety Cabinet, BSC) επιπέδου 2 (Biological Safety Level, BSL 2). Σε αριθμημένους σωλήνες φυγοκέντρωσης (πλαστικοί σωλήνες των 15 ml, τύπου falcon) προστίθενται 10 ml πλήρους διαλύματος PBS με pH=7,4. Ακολουθεί ομογενοποίηση μέσω ανάμειξης (vortex) . Στη συνέχεια οι σωλήνες αποθηκεύτηκαν στους -20° C.

Διάλυμα:

PBS με pH=7,4: (1)NaCl 0,8 g/L, (2)KCl 0,2 g/L, (3) Na₂HPO₄ .2H₂O 1,2 g/L, (4) KH₂PO₄ 0,2 g/L, (5) Thiomersal 0,2‰ .

2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΪΚΟΥ RNA

Για την εκχύλιση του ιικού RNA από τα διαλυτοποιημένα κόπρανα χρησιμοποιήθηκε το QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit της εταιρείας Quiagen, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, καθώς η μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης δεν ήταν αποδοτική .

2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ(RT-REVERSE TRANSCRIPTION)

Επειδή το γενετικό υλικό των Νοροϊών είναι RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γενώματος που μας ενδιαφέρει.

Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει random primers d(N9) (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) (50nmol/ μl) (1μl/tube), 10mM dNTPs (1μl/tube) και διπλά απιονισμένο νερό (ddH₂O) (Sigma, USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών (5μl/tube). Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρωση

και επώαση των eppendorf στους 65 °C για 5 λεπτά σε ειδικό μηχάνημα. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει 5X first strand Buffer (4μl/tube), 0,1M DTT (2μl/tube) , RNase out (20units/μl) (0,5μl/tube), ddH₂O (1μl/tube) και 0,5μl M-MLV(200units/μl) Reverse Transcriptase (Invitrogen). Στα eppendorf προστέθηκαν 8μl/tube του δεύτερου μίγματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση(σε ειδικό μηχάνημα) διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες:25° C για 10 λεπτά, 37° C για 50 λεπτά και 70° C για 15 λεπτά .

2.5 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων του ιικού γενώματος προέρχονται από την υπάρχουσα βιβλιογραφία και παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Γενετική ομάδα I(GI)

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος προϊόντος PCR	Βιβλιογραφία
JV12Y	4551	Sense	ATACCACTATGATGCAGAYTA	327 bp	Vinje and Koopmans 1996
JV13I	4878	Antisense	TCATCATCACCATAGAAIGAG		Vinje and Koopmans 1996
SRI-2	5344	Sense	AAATGATGATGGCGTCTA	315bp	D.Häfliger et al 1997
SRI-1	5659	Antisense	CCAACCCARCCATTRTACAT		D.Häfliger et al 1997
SRI-3 (seminested)	5584	Antisense	AAAAYRTCACCGGGKGTAT		D.Häfliger et al 1997
Calman-29	4868	Sense	TATGGTGATGATGAAATAGTGTC	488 bp	Jacques Rohayem et al 2004
Calman-32	5356	Antisense	ATTTCGGGCAGAAGATTG		Jacques Rohayem et al 2004
P78	1670	Sense	GGGCCCCCTGGTATAGGTAA	288 bp	Jianxiang Wang et al 1994
P80	1958	Antisense	TGGTGATGACTATAGCATCAGAC ACAAA		Jianxiang Wang et al 1994
GV6	6874	Sense	TTATCAATTNAAGCCTG	222 bp	J.Vinje et al 1999
GV7	7096	Antisense	NATCATCTCNTTNTCATG		J.Vinje et al 1999
G1SKF	5342	Sense	CTGCCCGAATTYGTAATGA	329 bp	Shigeyuki Kojima et al 2001
G1SKR	5671	Antisense	CCAACCCARCCATTRTACA		Shigeyuki Kojima et al 2001

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος προϊόντος PCR	Βιβλιογραφία
MR3 nested 1 st	4485	Sense	CCGTCAGAGTGGGTATGAA	469 bp	Shigeyuki Kojima et al 2001
MR4 nested 1 st	4954	Antisense	AGTGGGTTTGAGGCCGTA		Shigeyuki Kojima et al 2001
YURI22F nested 2 nd	4505	Sense	ATGAATGAGGATGGACCCAT	372 bp	Shigeyuki Kojima et al 2001
YURI22R nested 2 nd	4877	Antisense	CATCATCCCCGTAGAAAGAT		Shigeyuki Kojima et al 2001

Πίνακας 4: Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την γενετική ομάδα GI.

Γενετική ομάδα II (GII)

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος προϊόντος PCR	Βιβλιογραφία
JV12Y	4279	Sense	ATACCACTATGATGCAGAYTA	326 bp	Vinje and Koopmans 1996
JV13I	4605	Antisense	TCATCATCACCATAGAAIGAG		Vinje and Koopmans 1996
SRII-2	4844	Sense	TWCTCYTTYTATGGTGATGATG A	513bp	D.Häfliger et al 1997
SRII-1	5357	Antisense	CGCCATCTTCATTCACAAA		D.Häfliger et al 1997
SRII-3 (seminested)	5046	Antisense	TTWCCAAACCAACCWGCTG	202bp	D.Hafliger et al 1997

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος προϊόντος PCR	Βιβλιογραφία
P290	4568	Sense	GATTACTCCAAGTGGGACTCCA C	318 bp	Jiang et al 1999
P289	4886	Antisense	TGACAATGTAATCATCACCATA		Jiang et al 1999
Calman-1	4193	Sense	GCACACTGTGTTACACTTCC	822 bp	Jacques Rohayem et al 2004
Calman-2	5015	Antisense	ACATTGGCTCTTGTCTGG		Jacques Rohayem et al 2004
mon381	5362	Sense	CCAGAATGTACAATGGTTATGC	321 bp	Jacqueline S.Noel et al 1997
mon383	5683	Antisense	CAAGAGACTGTGAAGACATCA TC		Jacqueline S.Noel et al 1997
GV5	6700	Sense	TNTAATGGCTGGAGCTTT	195 bp	J.Vinje et al 1999
GV7	6895	Antisense	NATCATCTCNTTNTCATG		J.Vinje et al 1999
G2SKF	5058	Sense	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	343bp	Shigeyuki Kojima et al 2001
G2SKR	5401	Antisense	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACA T		Shigeyuki Kojima et al 2001
MR3 nested 1 st	4485	Sense	CCGTCAGAGTGGGTATGAA	469 bp	Shigeyuki Kojima et al 2001
MR4 nested 1 st	4954	Antisense	AGTGGGTTTGAGGCCGTA		Shigeyuki Kojima et al 2001
YURI22F nested 2 nd	4505	Sense	ATGAATGAGGATGGACCCAT	372 bp	Shigeyuki Kojima et al 2001
YURI22R nested 2 nd	4877	Antisense	CATCATCCCCGTAGAAAGAT		Shigeyuki Kojima et al 2001

Πίνακας 5: Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την γενετική ομάδα GII.

2.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Τμήματα του παραγόμενου cDNA ενισχύθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Στο πίνακες 6 και 7 παρουσιάζονται οι συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης, και επιμήκυνσης που πραγματοποιήθηκαν για κάθε ζευγάρι εκκινητών και για τις 2 γενετικές ομάδες.

2.6.1 PCR

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl cDNA του κάθε δείγματος, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 2,5 units Taq DNA πολυμεράσης (5u/μl, Paq 5000 Stratagene) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 μl (σε ορισμένες PCR προσθέσαμε επιπλέον MgCl₂ για να ενισχύσουμε την ένταση της μπάντας). Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του cDNA μορίου στόχου στους 95°C για 2 min και ακολουθεί η εφαρμογή των διαφορετικών, για κάθε ζεύγος εκκινητών, συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης (πίνακες 6 και 7). Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 5 min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

2.6.2 Semi-nested PCR

Το προϊόν της PCR με τα εκκινητικά μόρια SRI1 και SRI2 υποβλήθηκε σε semi-nested PCR χρησιμοποιώντας ως κωδικό εκκινητή τον SRI2 και εσωτερικό αντικωδικό τον SRI3. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 5 μl προϊόντος της PCR με τα εκκινητικά μόρια SRI1-SRI2, 2 μl εκκινητών SRI2-SRI3 (1 μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 2,5 units Taq DNA πολυμεράσης (5u/μl. Paq5000 Stratagene) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 μl. Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2 min και ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης (πίνακας). Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει επώαση για 5 min στους 72°C (η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και με τα ζεύγη εκκινητών SRII1-SRII2 και SRII2-SRII3 της γενετικής ομάδας II, GII).

2.6.3 Auto-nested PCR

Το προϊόν της PCR με τα εκκινητικά μόρια JV12Y και JV13I υποβλήθηκε σε autonested PCR χρησιμοποιώντας το ίδιο ζεύγος εκκινητών. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 5 μl προϊόντος της PCR με τα εκκινητικά μόρια JV12Y και JV13I, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 2,5 units Taq DNA πολυμεράσης (5u/μl, Paq 5000 Stratagene) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 μl. Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2 min και ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης (πίνακες 6 και 7). Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει επώαση για 5 min στους 72°C (η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε με όλα τα ζεύγη εκκινητών και των δύο γενετικών ομάδων, με εξαίρεση τα ζεύγη στα οποία εφαρμόστηκε semi-nested PCR).

Γενετική ομάδα I(GI)

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης(PCR)	Συνθήκες Autonested PCR
JV12Y(*) JV13I	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 1min Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 37°C για 1min και 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1 min } 20 κύκλοι	Ομοίως με PCR 35 κύκλοι
SRI-2 SRI-1 SRI-3 (seminested)	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 40 °C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec } 25 κύκλοι (SRI-2 SRI-1)	Semಿನested PCR Ομοίως με PCR 40 κύκλοι (SRI-2 SRI-3)
P290 P289	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50 °C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30sec } 25 κύκλοι	Ομοίως με PCR 40 κύκλοι
Calman-29 Calman-32	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30sec } 25 κύκλοι	Ομοίως με PCR 40 κύκλοι

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης(PCR)	Συνθήκες Autonested PCR
P78 P80	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec	Ομοίως με PCR 40 κύκλοι
GV6 GV7	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 40°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec	Ομοίως με PCR 40 κύκλοι
G1SKF(*) G1SKR	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec	Ομοίως με PCR 40 κύκλοι
MR3 nested 1 st MR4 nested 1 st	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec	-
YURI22F nested 2 nd YURI22R nested 2 nd	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec	-

Πίνακας 6: Συνθήκες PCR για τους εκκινητές της γενετικής ομάδας GI.

(*): σε αυτές τις PCR προσθέσαμε MgCl₂ για να αυξήσουμε την ένταση της μπάντας

Γενετική ομάδα II(GII)

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης(PCR)	Συνθήκες Autonested PCR
JV12Y JV13I	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 1min Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 37°C για 1min και 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1 min } 20 κύκλοι	Ομοίως με PCR 35 κύκλοι
SRII-2 SRII-1 SRII-3 (seminested)	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50 °C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec } 25 κύκλοι (SRII-2 SRII-1)	Seminested PCR Ομοίως με PCR 40 κύκλοι (SRII-2 SRII-3)
P290 P289	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec } 25κύκλοι	Ομοίως με PCR 40 κύκλοι
Calman-1 Calman-2	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30sec } 25 κύκλοι	Ομοίως με PCR 40 κύκλοι
mon381 mon383	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 43°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec } 25 κύκλοι	Ομοίως με PCR 40 κύκλοι
GV5 GV7	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 40°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72° C για 30sec } 25 κύκλοι	Ομοίως με PCR 40 κύκλοι
G2SKF G2SKR	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec } 25 κύκλοι	Ομοίως με PCR 40 κύκλοι

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης(PCR)	Συνθήκες Autonested PCR
MR3 nested 1 st MR4 nested 1 st	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec } 25 κύκλοι	-
YURI22F nested 2 nd YURI22R nested 2 nd	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec } 40 κύκλοι	-

Πίνακας 7: Συνθήκες PCR για τους εκκινητές της γενετικής ομάδας GII.

2.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ RT-PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της RT-PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 1,2 gr αγαρόζης (Invitrogen, UK) και 60ml 1X TBE (Tris-Boric acid-EDTA) προστίθενται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη και αφήνεται κρυώσει (περίπου 40°C). Προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂), ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Ύστερα από καλή ανάδευση το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει και να πολυμεριστεί η αγαρόζη.

Από το προϊόν της PCR 10 μl αναμιγνύονται με 2 μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης) και μεταφέρονται στο πήκτωμα αγαρόζης. Για τον προσδιορισμό του μήκους των RT-PCR προϊόντων χρησιμοποιείται μάρτυρας μοριακού βάρους, στη συγκεκριμένη περίπτωση ο 100bp DNA Ladder 1μg/1μl (Invitrogen, UK), ο οποίος δείχνει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε 120 Volts, 50 mA για περίπου 1 ώρα.

Στη συνέχεια το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται πάνω σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne, Hartland WI), όπου ελέγχεται και φωτογραφίζεται με Olympus digital camera.

2.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Από τα προϊόντα της κάθε RT-PCR 40μl ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Οι αντίστοιχες στα προϊόντα της RT-PCR ζώνες απομακρύνονται από το πήκτωμα και μεταφέρονται σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf των 1.5ml. Ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων της RT-PCR από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας το QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

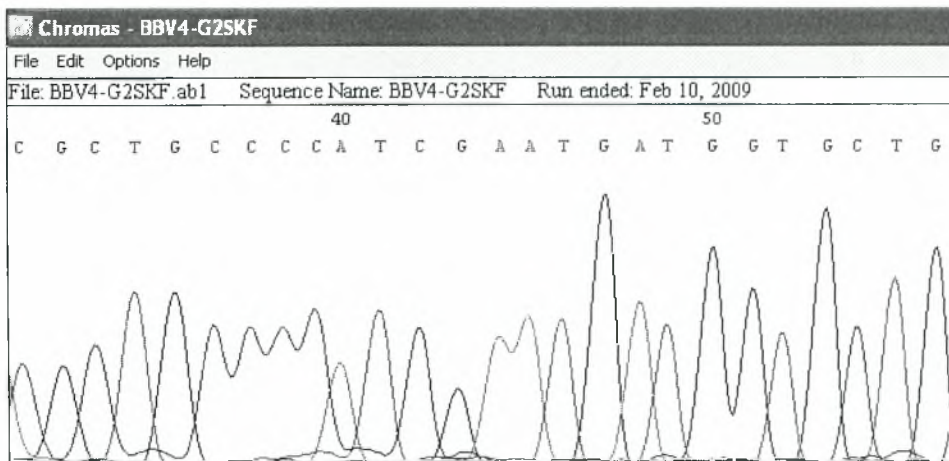
Ακολουθεί αλληλούχηση και των δυο κλώνων του καθαρού πλέον DNA από τη Macrogen Inc, (Seoul, Korea). Για κάθε αντίδραση αλληλούχησης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές των αντίστοιχων αντιδράσεων PCR.

2.9 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των κλινικών στελεχών μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα και εξελικτική τους σχέση συγκριτικά με τις αλληλουχίες προτύπων και κλινικών στελεχών Νοροϊών , που είναι καταχωρημένες στη παγκόσμια γονιδιακή τράπεζα δεδομένων (GenBank). Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε γενωμική περιοχή. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής που διατίθενται στο διαδίκτυο.

2.9.1 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παραλαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος (Εικόνα 14). Πριν την επεξεργασία των αλληλουχιών απαιτείται ο έλεγχος και η διόρθωση των πιθανών λαθών. Τέτοια λάθη μπορεί να αποτελούν πιθανά κενά στην αλληλουχία, δηλαδή κορυφές του χρωματογραφήματος που δεν έχουν διαβαστεί και υπολείπονται από το κείμενο που αντιστοιχεί στην πρωτοδιάταξη της αλληλουχίας, καθώς και κάποιες κορυφές να αναγνωρίζονται ως N, δηλαδή ως πιθανή ύπαρξη στην συγκεκριμένη θέση, οποιασδήποτε από της A, T, G ή C βάσεις. Στις περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η ασφαλής διόρθωση κάποιας αλληλουχίας, απαιτείται η επανάληψη της αλληλούχισης.



Εικόνα 14 :Χρωματογράφημα αλληλούχισης.

2.9.2 Αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας

Η αναζήτηση της κοντινότερης ή όμοιας αλληλουχίας πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (Basic Local

Alignment Search Tool), το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Ο αλγόριθμος BLAST αναζητά στη GenBank κατατεθειμένες αλληλουχίες ή τμήματα αυτών, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την υπό μελέτη αλληλουχία. Η ποιότητα κάθε στοίχισης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές στοιχίσεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης (HSPs – high scoring segment pairs) καταγράφονται με μορφή πίνακα. Ο πίνακας αυτός παρουσιάζει τελικά τις πιο «συγγενικές» αλληλουχίες, κατά σειρά μειωμένης βαθμολογίας συσχέτισης και επομένως ομολογίας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ GI

Όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση διαφορετικών περιοχών (καψίδιο, 3D-πολυμεράση, 2C-ελικάση) για την γενετική ομάδα GI.

Τα αποτελέσματα για την ανίχνευση Νοροϊών στα 29 κλινικά δείγματα που διεξήχθησαν με τη βοήθεια των AutoNested και SemiNested PCR φαίνονται στον παρακάτω πίνακα :

Δείγμα/primers	JV12Y-JV131	SRI-2/SRI-3	Calman-29/Calman 32	P78-P80	GV6-GV7	GISK F-GISK R	YURI22F-YURI22R
A6	-	-	-	+	-	-	-
A7	-	+	-	-	-	+	-
A9	-	-	-	-	-	-	-
A10	-	-	+	-	-	-	-
A12	-	-	+	-	-	+	-
A13	-	-	-	-	-	-	-
A15	-	+	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	+	-	-	-
1	-	+	+	+	-	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-
3	-	-	-	+	-	-	-
4	-	-	-	+	-	-	-

Πίνακας 8: Τα αποτελέσματα των PCR για την γενετική ομάδα GI.

Τα δείγματα: A1,A2, A3, A4, A5, A8,A11 ,B1 ,B2 ,B4 ,B7 ,B8 ,B9 ,B10, NORO 1, NORO 2 , NORO3 δοκιμάστηκαν με το ζεύγος εκκινήτων G1SKF-G1SKR και δεν έδωσαν κάποιο θετικό αποτέλεσμα και για αυτό δεν δοκιμάστηκαν περαιτέρω με τα υπόλοιπα ζεύγη εκκινήτων.

Επίσης με το ζεύγος εκκινήτων JV12Y-JV13I δοκιμάστηκαν τα εξής δείγματα:A1 και A2 χωρίς να δώσουν κάποιο θετικό αποτέλεσμα.

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ GII

Όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση διαφορετικών περιοχών (καψίδιο, 3D-πολυμεράση, 2C-ελικάση) για την γενετική ομάδα GII.

Τα αποτελέσματα για την ανίχνευση Νοροϊών στα 29 κλινικά δείγματα που διεξήχθησαν με τη βοήθεια των AutoNested και SemiNested PCR φαίνονται στον παρακάτω πίνακα :

Δείγμα/pri mers	JV12Y- JV13I	SR11- 2/SR11-3	Calman- 1/Calman 2	P289- P290	GV5-GV7	G2SK F- G2SK R	YURI22F- YURI22R
A6	-	+	+	-	-	+	+
A7	-	-	+	-	-	-	+
A9	-	-	-	-	-	+	+
A10	-	-	+	-	-	-	+
A12	-	-	+	-	-	+	-
A13	-	-	-	-	-	-	+
A15	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	-	+	-	-	+	-
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 9: Αποτελέσματα των PCR για την γενετική ομάδα GII.

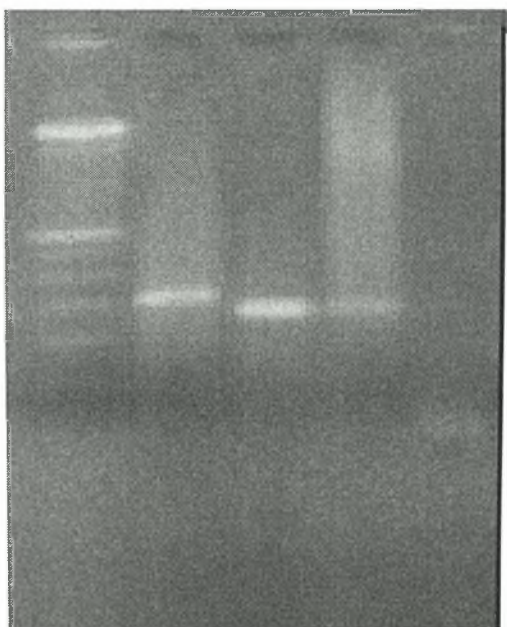
Τα δείγματα: A1,A2, A3, A4, A5, A8,A11 ,B1 ,B2 ,B4 ,B7 ,B8 ,B9 ,B10, NORO 1, NORO 2 , NORO3 δοκιμάστηκαν με το ζεύγος εκκινητών G2SKF-G2SKR και δεν έδωσαν κάποιο θετικό αποτέλεσμα και για αυτό δεν δοκιμάστηκαν περαιτέρω με τα υπόλοιπα ζεύγη εκκινητών

Επίσης με το ζεύγος εκκινητών JV12Y-JV13I δοκιμάστηκαν τα εξής δείγματα:A2 , A11, B2, B7, B8, B9 χωρίς να δώσουν κάποιο θετικό αποτέλεσμα.

Στην παρακάτω Εικόνα 15 βλέπουμε τα αποτελέσματα της AutoNested PCR για το ζεύγος εκκινητών G2SKF-G2SKR για μερικά δείγματα από το σύνολο των δειγμάτων που δοκιμάστηκαν.

G2SKF-G2SKR

M 1 2 3 4



Εικόνα 15 :Στη θέση 1 έχουμε το θετικό μάρτυρα A6, στη θέση 2 το δείγμα A12 ,στη θέση 3 το δείγμα B3 και στη θέση 4 τον αρνητικό μάρτυρα ddH₂O(M:Μάρτυρας μοριακού βάρους Invitrogen).

Από την παραπάνω εικόνα παρατηρούμε ότι τα συγκεκριμένα κλινικά δείγματα έχουν ενισχυθεί σωστά καθώς όλες οι ζώνες των προϊόντων βρίσκονται στο σωστό ύψος σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακού βάρους των 100bp της εταιρείας Invitrogen. Το σωστό και αναμενόμενο ύψος είναι 343bp.

3.3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ

Παρακάτω φαίνεται το αποτέλεσμα της επεξεργασίας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με το πρόγραμμα ClustalW. Το BBV4 αντιστοιχεί στο δείγμα Α6 (που επεξεργάστηκε με το ζεύγος εκκινητών G2SKF-G2SKR) και ο ιός Lordsdale (Accession Number GenBank X86557) αποτελεί πρότυπο στέλεχος της γενετικής ομάδας GII. Με τα αστεράκια φαίνεται η ομοιότητα μεταξύ του δείγματος Α6 και του ιού Lordsdale.

```

BBV4      -----ATGAAGATGGCGTCGA 16
Lordsdale GAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAGCTTTGTGAATGAAGATGGCGTCGA 5100
          *****

BBV4      ATGACGCTGCCCCATCGAATGATGGTGTGCCAACCTCGTACCAGAGGCCAACCAATGAGG 76
Lordsdale ATGACGCCAACCCTCTGATGGGTCCGCAGCCAACCTCGTCCCAGAGGTCAATAATGAGG 5160
          *****  *****  ***  ** ***** *****  *** *****

BBV4      TTATGGCACTCGAACCAGGTGGTGGGAGCCTCAATCGCGGCTCCTGTCGTCGGCCAACAAA 136
Lordsdale TTATGGCTCTGGAGCCCGTTGTTGGTGCCGCTATTGCGGCACCTGTGGCGGCCAACAAA 5220
          ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

BBV4      ACATAATTGACCCTGGATTAGAGAAAATTTTGTCCAAAGCACACAGGGCGAGTTTACCG 196
Lordsdale ACGTAATTGACCCTGGATTAGAAAACAATTTTGTACAAGCCCCTGGTGGAGAGTTCACAG 5280
          ** ***** ***** * ***** ***** ** ** ***** ** *

BBV4      TCTCACCGAGGAACCTCGCCTGGTGAGATGCTATTAATCTTGAATTGGGCCCAGAG---- 252
Lordsdale TGTCCCTAGAAAACGCTCCAGGTGAGATACTGTGGAGCGGCCCTTGGGCCCTGATCTGA 5340
          * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ** * * ***** **
    
```

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις ημέρες μας η διάγνωση μολύνσεων από Νοροϊούς βασίζεται στην ανίχνευση του ιϊκού RNA. Περιοχές σε διαφορετικά τμήματα του γενώματος των ιών έδωσαν τη δυνατότητα σύνθεσης μιας σειράς εκκινητικών μορίων όπως είναι οι G1SKF-G1SKR, G2SKF-G2SKR (Shigeyuki Kojima et al 2001), επιτρέποντας την ανίχνευση ενός ευρέος φάσματος διαφορετικών γενοτύπων των Νοροϊών. Έτσι στο εργαστήριο ασχοληθήκαμε με την μέθοδο της PCR (AutoNested, SemiNested, Nested) για την ειδική ανίχνευση στελεχών Νοροϊών. Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε στις δημοσιεύσεις που αναφέρονται στους πίνακες (εκκινητών), οι οποίες τροποποιήθηκαν κατάλληλα ώστε να βελτιστοποιηθούν τα αποτελέσματά της ανίχνευσης .

Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 13 ζεύγη τυπό-ειδικών εκκινητικών μορίων ,τα οποία είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να ενισχύουν ειδικά συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος των Νοροϊών (καψίδιο,3D-πολυμεράση, 2C- ελικάση). Τέλος ,ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων τμημάτων της AutoNested PCR σε πήκτωμα αгарόζης 2% και η ανίχνευση των ιϊκών στελεχών έγινε βάση του μεγέθους των ενισχυμένων προϊόντων με τη βοήθεια του μάρτυρα μοριακού βάρους της Invitrogen.

Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να βελτιώσουμε σε ένα σημαντικό βαθμό τη μέθοδο της AutoNested PCR. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ,για την επίτευξη της διαδικασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 29 κλινικά δείγματα , με τη βοήθεια των οποίων εφαρμόσαμε μια σειρά διαφορετικών συνθηκών στη μέθοδο της AutoNested PCR με βασικό στόχο να αυξήσουμε την ευαισθησία της μεθόδου για την ανίχνευση των Νοροϊών. Η αύξηση της ευαισθησίας αποτελεί σημαντικό παράγοντα καθώς δίνεται η δυνατότητα να λαμβάνονται ευδιάκριτα σήματα ενίσχυσης ακόμα και όταν το ιϊκό φορτίο βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα.

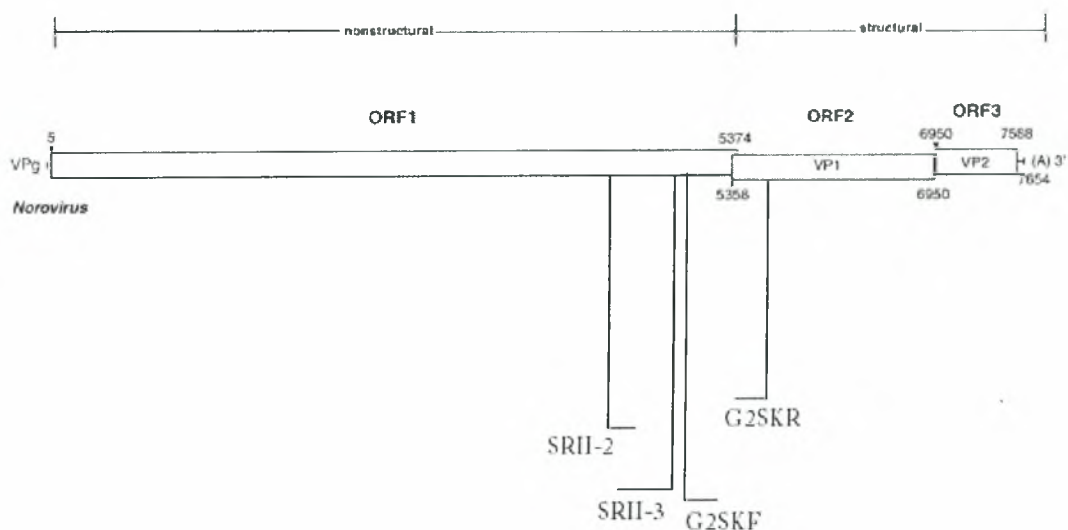
Στη συνέχεια εξετάστηκαν όλα τα κλινικά δείγματα ξεχωριστά για την ανίχνευση στελεχών Νοροϊών. Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαφορετικά για τις 2 γενετικές ομάδες GI και GII και έτσι επιδιώξαμε να ανιχνεύσουμε στα κλινικά δείγματα ,στελέχη Νοροϊών που ανήκουν σε αυτές τις 2 γενετικές ομάδες.

Συνολικά από όλη την πειραματική διαδικασία που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο τα στελέχη που ανιχνεύθηκαν από τα κλινικά δείγματα αναγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα(Πίνακας 10) .

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Δείγματα/Γενετική Ομάδα
G2SKF-G2SKR	A6/GII
G2SKF-G2SKR	B3/GII
SRII-2/SRII-3	A6/GII

Πίνακας 10: Αναφορά των δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν από τα συνολικά 29 κλινικά δείγματα.

Από τη διαδικασία ανίχνευσης στελεχών Νοροϊών στα κλινικά δείγματα, παρατηρούμε ότι από τα 29 συνολικά κλινικά δείγματα , ανιχνεύθηκαν στελέχη Νοροϊών μόνο σε 2 τα οποία ανήκουν στη γενετική ομάδα II(GII). Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται η περιοχή στο γένωμα του Νοροϊού που ανιχνεύθηκε με τα εκκινητικά μόρια G2SKF- G2SKR και SRII2-SRII3.



Σχήμα 1: Η περιοχή στο γένωμα του Νοροϊού(καψίδιο) που ανιχνεύθηκε με τα εκκινητικά μόρια G2SKF-G2SKR(343bp) και η περιοχή που ανιχνεύθηκε με τα εκκινητικά μόρια SRII-2/SRII-3(202bp).

Επίσης από τα ανωτέρω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι ένας μεγάλος αριθμός κλινικών δειγμάτων δεν έχει δώσει κανένα σήμα ενίσχυσης με κανένα ζεύγος

εκκινητών (και για τις 2 γενετικές ομάδες). Το γεγονός αυτό ίσως να συμβαίνει διότι τα δείγματα δεν φέρουν ιϊκή μόλυνση . Από την άλλη πλευρά υπάρχει πιθανότητα να μην είναι δυνατή η ανίχνευση των συγκεκριμένων στελεχών Νοροϊών που υπάρχουν στα κλινικά δείγματα βάση των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν εκκινητικά μόρια που ανιχνεύουν στελέχη Νοροϊών των γενετικών ομάδων I και II, αλλά όχι και της γενετικής ομάδας III. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η διαδικασία της AutoNested PCR που εφαρμόστηκε στο εργαστήριο με τον συγκεκριμένο αριθμό εκκινητικών μορίων ανιχνεύει ένα σημαντικό ποσοστό στελεχών Νοροϊών.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η διαδικασία της AutoNested PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς καθώς έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει τους Νοροϊούς. Η μέθοδος αυτή έχει τη δυνατότητα να ενισχύει ένα συγκεκριμένο τμήμα του ιϊκού γενώματος ακόμα και όταν το ιϊκό φορτίο είναι σε χαμηλά επίπεδα ,καθώς με τη διαδικασία της AutoNested PCR αυξάνεται η ευαισθησία του συστήματος κατά χιλιάδες φορές. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε επιπρόσθετα προβλήματα , όπως η επιμόλυνση του χώρου εργασίας μέσω της δημιουργίας “aerosols” και κατά συνέπεια τη δημιουργία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

Συμπερασματικά στη συγκεκριμένη εργασία καταφέραμε σε ένα πρώτο επίπεδο να αυξήσουμε την ειδικότητα της μεθόδου AutoNested PCR και να την εφαρμόσουμε για τον προσδιορισμό στελεχών Νοροϊών , που ευθύνονται για την εμφάνιση οξείας γαστρεντερίτιδας. Επόμενο βήμα ερευνητικού ενδιαφέροντος είναι η κλωνοποίηση των στελεχών που ανιχνεύθηκαν για την εύρεση των φυλογενετικών σχέσεων και ο σχεδιασμός εκκινητικών μορίων που θα καλύπτουν όλο το φάσμα των Νοροϊών. Η βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου και η δυνατότητά της να ανιχνεύει Νοροϊούς την καθιστά ένα σπουδαίο εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Advisory Committee on the microbiological safety of food 1998

2. **Ando T, Noel JS, Fankhauser RL.** Genetic classification of Norwalk-like viruses . *J. Infect Dis* 2000 ; 181(2):S336-348.

3. **Arness MK, Feighner BH, Canham ML, et al.** Norwalk-like viral gastroenteritis outbreak in U. S Army trainees . *Emerg Infect Dis* 2000; 6:204-207.

4. **Atmar RL , Estes MK.** Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses . *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:15-37.

5. **Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF.** Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces . *J Hosp Infect* 2004; 58: 42-49.

6. **Belliot G, Noel JS, Li JF, et al.** Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of Norwalk-like viruses. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4288-4295.

7. **Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, et al.** In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol* 2003;77:10957-10974.

8. **Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, et al.** The 3'- end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 2003;77:11603-11615.

9. **Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, et al.** Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J Virol* 2002;76:4044-4055.

10. **Beuret C, Kohler D, Luthi T.** Norwalk-like virus sequences detected by reverse transcription –polymerase chain reaction in mineral waters imported into or bottled in Switzerland. *J Food Prot* 2000; 63:1576-82.

11. **Carter MJ, Milton ID, Meanger J, et al.** The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus . *Virology* 1992; 190 :443-448.
12. **Carter , M.J., I.D. Milton, and C. R. Madeley,1991.** Caliciviruses . *Rev. Med. Virol.* 1:177-186.
13. **Center for Disease Control and Prevention 20001.**
14. **Chadwick PR, McCann R.** Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Hosp Infect* 1994;26:251-259.
15. **Chadwick PR, Walker M, Rees AE.** Airborne transmission of a small round structured virus [letter] [see comments]. *Lancet* 1994;343:171.
15. **Chadwick PR, Beards G, Brown D, Caul EO, Cheesbrough J, Clarke I, Curry A, O'Brien S, Quigley K, Sellwood J, Westmoreland D.** Management of hospital outbreaks of gastroenteritis due to small round structured viruses. *J Hosp Infect* 2000;45:1-10.
16. **Chen R, Neill JD, Estes MK, et al.** X-ray structure of a native calicivirus: Structural insights into antigenic diversity and host specificity. *PNA* 2006;103:8048-8053.
17. **Chen R, Neill JD, Noel JS.** Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol* 2004;78:6469-6479.
18. **Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, et al.** Sapporo virus: history and recent findings. *J Infect Dis* 2000;181:S303-308.
19. **Crane JK, Guerrant RL.** *Acute Watery Diarrhea.* New York: Raven Press; 1995.
20. **Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, et al.** The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* 2003;22:2852-2859.
21. **deWit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinje J, van Leusden F, Bartelds AI, van Duynhoven YT.** Sensor, , a population-based cohort study on

gastroenteritis in the Netherlands :incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001b;154:666-74.

22. Dolin R. Norwalk-like agents of gastroenteritis. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and Practices of Infectious Diseases*. New York: John Wiley and Sons, 1979:1364-1370.

23. Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis . *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1972;140:578-583.

24. Dolin R, Levy AG, Wyatt RG, et al. Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent. Jejunal histopathology and serologic response . *Am J Med* 1975;59:761-768.

25. Dolin R, Reichman RC, Fauci AS. Lymphocyte populations in acute viral gastroenteritis . *Infect Immun* 1976;14:422-428.

26. Dolin R, Reichman RC, Roessner KD, et al. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 1982;146:184-189.

27. Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, et al. Inactivation of caliciviruses . *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4538-4543.

28. Ewald D, Franks C, Thompson S, Patel MS. Possible community to small round structure virus gastroenteritis in a rural Aboriginal community. *Commun. Dis Intell.* 2000;24.

29. Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, et al. Epidemiologic and molecular trends of Norwalk-like viruses associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002;186:1-7.

30. Flewett TH, Davies H. Caliciviruses in man [letter]. *Lancet* 1976;1:311.

31. Flynn WT, Saif LJ, Moorhead PD. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 1988;49:819-825.

32. **Gaulin C, Frigon M, Poirier D, et al.** Transmission of calicivirus by a foodhandler in the pre-symptomatic phase of illness. *Epidemiol Infect* 1999;123:475-478.
33. **Glass PJ, White LJ, Ball JM, et al.** Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 2000;74:6581-6591.
34. **Glass PJ, Zeng CQ, Estes MK.** Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. *J Virol* 2003;77:3569-3577.
35. **Godoy P, Torres J, Guix S, Prat A, Alsedà M, Dominguez A, Bosch A, Salleras L.** Norwalk virus-like food poisoning after eating oysters. *Med Clin(Barcelona)* 2000;114:765-8.
36. **Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, et al.** Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Rep* 2005;6:968-972.
37. **Green J, Hensilwood K, Gallimore CI, Brown DW, Lees DN.** A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl Environ Microbiol* 1998a;64:858-63.
38. **Green J, Vinje J, Gallimore CI, Koopmans M, Hale A, Brown DW.** Capsid protein diversity among Norwalk-like viruses. *Virus Genes* 2000;20:227-36.
39. **Gutierrez-Escolano AL, Brito ZU, del Angel RM, et al.** Interaction of cellular proteins with the 5'UTR end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol* 2000;74:8558-8562.
40. **Gutierrez-Escolano AL, Vazquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J, et al.** La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:759-766.
41. **Hale AD, Tanaka TN, Kitamoto N, et al.** Identification of an epitope common to genogroup 1 Norwalk-like viruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:1656-1660.

42. **Hale A, Mattick K, Lewis D, Estes M, Jiang X, Green J, Eglin R, Brown D.** Distinct epidemiological patterns of Norwalk –like virus infection. *J Med Virol* 2000;62:99-103.
43. **Häfliger D, Gilgen M, Luthy J, Ph Hubner 1997.** Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. In *J Food Microbiol* 1997;37:27-36.
44. **Hardy M, Crone T, Brower J, et al.** Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-like proteinase. *Virus Res* 2002;89:29.
45. **Hardy ME, Tanaka TN, Kitamoto N, et al.** Antigenic mapping of the recombinant Norwalk virus capsid protein using monoclonal antibodies. *Virology* 1996;217:252-261.
46. **Hardy ME and MK Estes ,1996.** Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes* 12:289-292.
47. **Hedberg CW, Osterholm MT.** Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis . *Clin Microbiol Rev* 1993;6:199-210.
48. **Hedlund KO, Rubilar-Abreu E, Svensson L.** Epidemiology of calicivirus infections in Sweden,1994-1998. *J Infect Dis* 2000;181(2):S275-80.
49. **Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, et al.** Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: Pediatric cases and outbreak incidents. *J Infect Dis* 2000;181:S270-274.
50. **Jacqueline S. Noel, Tamie Ando, Jose Paulo Leite et al 1997.** Correlation of Patient Immune Responses with Genetically Characterized Small Round-Structured Viruses Involved in Outbreaks of Nonbacterial Acute Gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995 . *J. Med Virol* 53:372-383(1997).
51. **Jiang X, Wang J, Estes MK.** Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. *Arch Virol* 1995;140:363-374.
52. **Jiang X, Wang M, Graham DY, et al.** Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992;66:6527-6532.

- 53. Jiang X, Huang PW, Zhong WM et al 1999.** Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 83 (1-2), 145-154.
- 54. Jiang X, Wilton N, Zhong WM, et al .** Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis* 2000;181:S349-359.
- 55. Jianxiang Wang, XI Jiang, H. Paul Madore et al 1994.** Sequence diversity of small round-structured viruses in the Norwalk virus group . *Am Soc Microbiol.*
- 56. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al.** Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:1548-1557.
- 57. Kaiser WJ, Chaudhry Y, Sosnovtsev SV, et al .** Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex . *J Gen Virol* 2006;87:363-368.
- 58. Kapikian AZ, Dienstag JL, Purcell RH.** Immune electron microscopy as a method for the detection, identification and characterization of agents not cultivatable in an in vitro system . In: Rose NR, Friedman H, eds. *Manual of Clinical Immunology*, 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1980: 70-83.
- 59. Kapikian AZ, Feinstone SM, Purcell RH, et al.** Detection and identification by immune electron microscopy of fastidious agents associated with respiratory illness, acute nonbacterial gastroenteritis, and hepatitis A. *Perspectives in Virology* 1975;9:9-47.
- 60. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al.** Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972;10:1075-1081.
- 61. Kaplan JE, Goodman RA, Schonberger LB, et al.** Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis* 1982c;146:190-197.

62. **Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, et al.** Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis . *Ann Intern Med* 1982;96:756-761.
63. **Katpally, U., Wobus, C. E., Dryden, K., Virgin, H. W. IV, and Smith, T. J. (2008).** Unexpected structural differences between authentic norovirus and virus like particles. *J. Virol.*
64. **Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, et al.** Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *J Clin Microbiol* 2002;40:2459-2465.
65. **Knipe, David M. Howley, Peter M.** *Fields Virology*, 5th Edition
66. **Konig M, Thiel HJ, Meyers G.** Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 1998;72:4492-4497.
67. **Koopmans M.** Molecular Epidemiology of human enteric caliciviruses in the Netherlands . In: *Gastroenteritis Viruses* . Chichester: Wiley,2001:197-218.
68. **Koopmans M, Duizer E.** Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* 2004;90:23-41.
69. **Le Gall G, Huguet S, Vende P, et al.** European brown hare syndrome virus: molecular cloning and sequencing of the genome. *J Gen Virol* 1996;77:1693-1697.
70. **Lees D.** Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol* 2000;59:81-116.
71. **Lew JF, Valdesuso J, Vesikari T, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY.** Detection of Norwalk virus or Norwalk-like virus infections in Finnish infants and young children . *J Infect Dis* 1994;169:1364-7.
72. **Lewis D.** Norwalk agent and other small-round structured viruses in the U.K. [letter]. *J Infect* 1991;23:220-222.
73. **Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., LoBue, A.D., Cannon, J.L., Zheng, D., Vinje, J., Baric, R.S. 2008.**

74. **Liu B, Clarke IN, Lambden PR, 1996.** Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol* 70:2605-2610.
75. **Liu BL, Lambden PR, Gunther H, et al.** Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 1999;73:819-825.
76. **Liu BL, Viljoen GJ, Clarke IN, et al.** Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in *E. coli*. *J Gen Virol* 1999;80:291-296.
77. **Liu BL, IN Clarke , EO Caul, and PR Lambden,1997.** The genomic 5' terminus of Manchester calicivirus . *Virus Genes* 15:25-28.
78. **Lochridge VP, Jutila KL, Graff JW, et al.** Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions. *J Gen Virol* 2005;86:2799-2806.
79. **Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, et al.** Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9:90-96.
80. **Lynn S, Toop J, Hanger C, et al.** Norovirus outbreaks in a hospital setting: the role of infection control. *N Z Med J* 2004;117:U771.
81. **Madeley CR, Cosgrove BP.** Caliciviruses in man [letter]. *Lancet* 1976;1:199-200.
82. **Madore HP, Treanor JJ, Buja R, et al.** Antigenic relatedness among the Norwalk-like agents by serum antibody rises. *J Med Virol* 1990;32:96-101.
83. **Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, et al.** Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant . *Epidemiol Infect* 2000;124:481-487.
84. **Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, et al.** A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect* 2003;131:727-736.
85. **Mayoral CJ, Mateo RA, Pone SM et al.** Outbreak of gastroenteritis at a home for the aged in Albacete. *Rev Esp Salud Publica* 2000;74:561572.

86. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999;5:607-625.

87. Meeroff JC, Schreiber DS, Trier JS, et al. Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Ann Intern Med* 1980;92:370-373.

88. Meyers G. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J Biol Chem* 2003;278:34051-34060.

89. Meyers G, Wirblich C, Thiel H-J, et al. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* 2000;276:349-363.

90. Ministry of Agriculture Food and Fisheries 1996

91. Morales M, Barcena J, Ramirez MA, et al. Synthesis in vitro of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (-)sense genomic RNA: mapping of a subgenomic promoter. *J Biol Chem* 2004;279:17013-17018.

92. Mounts AW, Ando T, Koopmans M, et al. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000;181:S284-287.

93. Neill JD. Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides. *Virus Res* 1990;17:145-160.

94. Neill JD, Mengeling WL. Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res* 1998;11:59-72.

95. Neill JD, Meyer RF, Seal BS. The capsid protein of vesicular exanthema of swine virus serotype A48: relationship to the capsid protein of other animal caliciviruses. *Virus Res* 1998;54:39-50.

96. Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, et al. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol* 2003;77:13117-13124.

97. **Noel JS, Ando T, Leite JO, et al.** Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J Med Virol* 1997;53:372-383.
98. **Numata K, Hardy ME, Nakata S, et al.** Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. *Arch Virol* 1997;142:1537-1552.
99. **Oka T, Katayama K, Ogawa S, et al.** Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol* 2005;79:7283-7290.
100. **Pang XL, Honma S, Nakata S, et al.** Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* 2000;181:S288-294.
101. **Parker TD, Kitamoto N, Tanaka T, et al.** Identification of Genogroup I and Genogroup II broadly reactive epitopes on the norovirus capsid. *J Virol* 2005;79:7402-7409.
102. **Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, et al.** Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 1977;297:86-89.
103. **Parshionikar SU, Cashdollar J, Fout GS.** Development of homologous viral internal controls for use in RT-PCR assays of waterborne enteric viruses. *J Virol Methods* 2004;121:39-48.
104. **Ponka A, Maunula L et al.** An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. *Epidemiol Infect* 1999;123:469-74.
105. **Prasad BV, Hardy ME, Jiang X, et al.** Structure of Norwalk virus. *Arch Virol* 1996;12:S237-242.
106. **Prasad BV, Matson DO, Smith AW.** Three-dimensional structure of calicivirus. *J Mol Biol* 1994;240:256-264.
107. **Prasad BVV, Crawford S, Lawton JA, et al.** Structural studies on gastroenteritis viruses. *Novartis Found Symp* 2001;238:26-37.
108. **Rockx B, De Wit M, Vennema H, et al.** Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35:246-253.

- 109. Rohayem J, Munch J, Rethwilm A.** Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. *J Virol* 2005;79:4977-4990.
- 110. Rohayem J, S. Berger, T. Juretzek et al 2004.** A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect norovirus ,astrovirus and adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods* 118(2004)49-59.
- 111. Schreier E, Doring F, Kunkel U.** Molecular Epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany 1997/98. *Arch Virol* 2000;145:443-53.
- 112. Schvoerer E, Bonnet F, Dubois V et al.** PCR detection of human enteric viruses in bathing areas ,waste waters and human stools in Southwestern France. *Res Microbiol* 2000;151:693-701.
- 113. Schwab KJ, Estes MK et al 2000.** Norwalk and other human caliciviruses :molecular characterization ,epidemiology and pathogenesis,p.469-493. In JW Cary , JE Linz and D Bhatnagar (ed), *Microbial foodborne diseases :mechanisms of pathogenicity and toxin synthesis* . Technomic Publishing Company , Inc, Lancaster ,Pa.
- 114. Shigeyuki Kojima, Tsutomu Kageyama, Shunetsu Fukushi et al 2001.** Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses . *J Virol* 100:107-114.
- 115. Smiley JR, Chang KO, Hayes J, et al.** Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus . *J Virol* 2002;76:10089-10098.
- 116. Smith AW, Berry ES, Skilling DE, et al.** In vitro isolation and characterization of a calicivirus causing a vesicular disease of the hands and feet . *Clin Infect Dis* 1998;26:434-439.
- 117. Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, et al.** Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* 2006;80:7816-7831.

118. **Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY.** Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol* 2002;76:7060-7072.
119. **Sosnovtsev SV, Green KY.** Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* 2000;277:193-203.
120. **Sosnovtseva SA, Sosnovtsev SV, Green KY. 1999.** Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol* 1999;73:6626-6633.
121. **Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, et al.** Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol* 2003;108:241-247.
122. **Tan M, Huang P, Meller J, et al.** Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol* 2003;77:12562-12571.
123. **Vinje J, Koopmans MP.** Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* 1996;174:610-615.
124. **Vinje J, Vennema H, Maunula L, et al.** International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol* 2003;41:1423-1433.
125. **Vinje J, Koopmans MP.** Simultaneous detection and genotyping of Norwalk-like viruses by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 2000;38:2595-601.
126. **J. Vinje, J. Green, DC Lewis et al 1999.** Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of Norwalk-like viruses. *Arch Virol*(2000)145:223-241.
127. **Vinje J, Green J, Lewis DC, et al.** Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of Norwalk-like viruses. *Arch Virol* 2000;145:223-241.

128. **Wyn Jones AP, Pallin R, Dedoussis C et al** .The detection of small round structured viruses in water and environmental materials. *J Virol Methods* 2000;87:99-107.

129. **Yoda T, Suzuki Y, Terano Y, et al**. Precise characterization of norovirus (Norwalk-like virus)-specific monoclonal antibodies with broad reactivity. *J Clin Microbiol* 2003;41:2367-2371.

130. **Zahorsky J**. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease . *Arch Pediatr* 1929;46:391-5.

131. **Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al**. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312-323.

