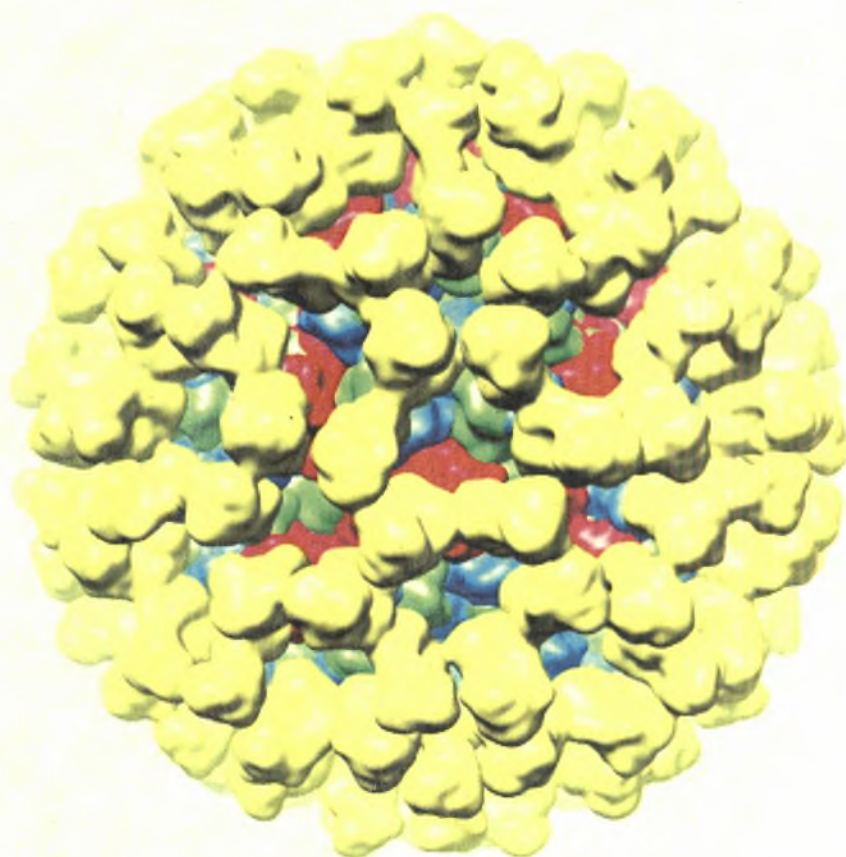


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Μοριακή και φυλογενετική ανάλυση Νοροϊών



Επιβλέπων καθηγητής: Π. Μαρκουλάτος

ΜΟΥΣΤΑΚΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

Λάρισα 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7363/1
Ημερ. Εισ.: 10-09-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΜΟΥ

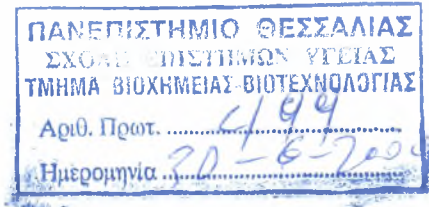
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087195

Στοιχεία Πτυχιακής Εργασίας

Επιβλέπων καθηγητής: Π. Μαρκουλάτος



Τριμελής επιτροπή:

Π. Μαρκουλάτος Καθηγητής Εφαρμοσμένης 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 Αν. 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.

Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου και την βαθύτερη εκτίμησή μου στον καθηγητή μου κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο τόσο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου για την ανάθεση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας όσο και για τις γνώσεις και τη στήριξη που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια αυτής. Είμαι βέβαιος ότι οι γνώσεις και οι συμβουλές του ήταν πάρα πολύ σημαντικές για εμένα και θα με ακολουθούν συνέχεια στην περαιτέρω σταδιοδρομία μου, ενώ το επαγγελματικό του ήθος αποτελεί πρότυπο.

Επίσης, είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων έναντι της υποψήφιας διδάκτορος Πλιάκα Βίκυς και του μεταπτυχιακού σπουδαστή Τσακογιάννη Δημήτρη, οι οποίοι μου παρείχαν χρήσιμες πρακτικές συμβουλές καθώς και την πολύτιμη βοήθειά τους στα όποια εργαστηριακά προβλήματα προέκυψαν.

Την εκ βαθέων εκτίμησή μου θα ήθελα, ακόμα, να εκφράσω στην φίλη και συνάδελφο Χριστογιάννη Ιωάννα με την οποία πραγματοποιήσαμε το μεγαλύτερο μέρος των πειραμάτων. Η βοήθειά της ήταν πολύτιμη για τη πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας, όπως και η συμπαράσταση και η εμπιστοσύνη που επέδειξε στο άτομό μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω του γονείς μου, Ιερόθεο και Δέσποινα, 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.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Ιστορική αναδρομή	7
1.2 Ταξινόμηση	10
1.3 Βιολογία των Νοροϊών	14
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	14
1.3.2 Δομή ιοσωματίου.....	16
1.3.3 Ιικές πρωτεΐνες.....	18
1.3.4 Κύκλος ζωής.....	26
1.3.5 Αντιγονικά χαρακτηριστικά.....	28
1.3.6 Ετερογένεια και Εξέλιξη.....	29
1.4 Παθογένεια	31
1.4.1 Μολυσματικός κύκλος.....	31
1.4.2 Κλινική εκδήλωση της ασθένειας.....	33
1.4.3 Ανοσοποίηση ξενιστή.....	33
1.5 Επιδημιολογία	35
1.6 Μετάδοση	36
1.6.1 Πορείες μόλυνσης.....	36
1.6.2 Τρόποι μετάδοσης.....	37
1.7 Εργαστηριακή διάγνωση	40
1.7.1 Ηλεκτρονική μικροσκοπία.....	40
1.7.2 Ανοσοδοκιμές.....	41
1.7.3 Μοριακές τεχνικές.....	41
1.8 Έλεγχος μόλυνσης	42
1.8.1 Πρόληψη και θεραπεία.....	42
1.8.2 Εμβόλια.....	43
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
2.1 Πειραματικά στελέχη	45
2.1.1 Θετικοί μάρτυρες.....	45
2.1.2 Κλινικά δείγματα.....	45
2.2 Επεξεργασία κοπράνων	46

2.3 Εκχύλιση ιικού RNA.....	46
2.4 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription – RT).....	46
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)..	47
2.5.1 Εκκινητικά μόρια.....	47
2.5.2 PCR.....	48
2.5.3 Semಿನested PCR.....	49
2.5.4 Autονested PCR.....	49
2.5.5 Συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης για την PCR, Semινested PCR και Autονested PCR.....	49
2.5.6 Autονested GoTaq PCR.....	51
2.6 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων RT – PCR και autονested GoTaq PCR.....	52
2.7 Καθαρισμός προϊόντων RT – PCR και autονested GoTaq PCR.....	52
2.8 Μοριακή κλωνοποίηση προϊόντων της autονested GoTaq PCR.....	53
2.9 Εύρεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (αλληλούχιση) κλωνοποιημένων προϊόντων της autονested GoTaq PCR.....	57
2.10 Επεξεργασία και ανάλυση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.....	57
2.10.1 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.....	57
2.10.2 Αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας.....	58
2.10.3 Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών.....	59
2.10.4 Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων.....	60
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	62
3.1 Αποτελέσματα PCR και autονested GoTaq PCR.....	62
3.2 Έλεγχος επιτυχίας μοριακής κλωνοποίησης προϊόντων autονested GoTaq PCR.....	64
3.3 Ταυτοποίηση αλληλούχισης στελεχών Νοροϊών των κλινικών δειγμάτων...	66
3.4 Εύρεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αντικαταστάσεων των στελεχών στις γενωμικές περιοχές ORF1 και ORF2.....	67
3.5 Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών των κλινικών δειγμάτων.....	74
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	84
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	88

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νοροϊοί αποτελούν το ένα από τα τέσσερα γένη της οικογένειας Caliciviridae. Τα ιικά σωματίδια δεν περιβάλλονται από φάκελο ενώ εμφανίζουν T=3 εικοσαεδρική συμμετρία, με μέγεθος περίπου ίσο με 38nm. Το γονιδίωμα των νοροϊών αποτελείται από ένα γραμμικό, μονόκλωνο, θετικής πολικότητας RNA γένωμα μήκους περίπου 7.700 βάσεων. Στο 5' άκρο του γενώματος βρίσκεται συνδεδεμένη μια πρωτεΐνη (VPg) ενώ το 3' άκρο του περιλαμβάνει ουρά πολυαδενίνης (polyA). Επίσης, το ιικό γονιδίωμα οργανώνεται σε τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Το ORF1 κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη η οποία ύστερα από ειδική ενζυμική πέψη, παράγει τις ώριμες μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Τα υπόλοιπα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF2 και ORF3) κωδικοποιούν για τις δομικές πρωτεΐνες του ιού, εκ των οποίων η VP1 είναι υπεύθυνη για τις αντιγονικές ιδιότητες του ιού.

Το γένος των Νοροϊών περιλαμβάνει σημαντικά ιατρικά παθογόνα, καθώς αποτελούν την κύρια αιτία της μη βακτηριακής οξείας επιδημικής γαστρεντερίτιδας που εμφανίζεται σε οικογενειακά κρούσματα ή σε επίπεδο κοινότητας. Οι νοροϊοί δεν προκαλούν πάντα μόνιμη ανοσοποίηση και σε συνδυασμό με την σημαντική ετερογένεια και ευμεταβλητότάτά τους, αποτελούν σημαντικό επιδημιολογικό κίνδυνο σε παγκόσμιο επίπεδο. Εξαιρετικής σημασίας σε αυτό το φαινόμενο, επίσης, είναι η δυνατότητα των ιών αυτών να μεταδίδονται εύκολα τόσο από ένα μολυσμένο άτομο σε άλλα (κοπρανο – στοματική οδός, εισπνοή αερολυμάτων από τον εκρηκτικό έμετο), όσο και από άλλες πηγές μόλυνσης, όπως μολυσμένα τρόφιμα και πόσιμο νερό.

Επομένως, η ανίχνευση των ιών αυτών και η ανάλυση των γενετικών χαρακτηριστικών τους, για παράδειγμα η δυνατότητα ανασυνδυασμού, είναι σημαντικές για την διάγνωση και την πρόληψη της νόσου. Στην παρούσα εργασία, 8 κλινικά δείγματα κοπράνων εξετάστηκαν με RT – PCR για παρουσία νοροϊών και τα ενισχυμένα γενωμικά τμήματα κλωνοποιήθηκαν για τον εντοπισμό διακριτών στελεχών. Ακολούθησε αλληλούχιση της γενωμικής περιοχής, η οποία είχε αρχικά ενισχυθεί μέσω της RT – PCR μεθόδου, των 9 κλινικών στελεχών που προέκυψαν καθώς επίσης η εντόπιση μεταλλάξεων στις περιοχές αυτές και τέλος η φυλογενετική ανάλυση των κλινικών στελεχών.

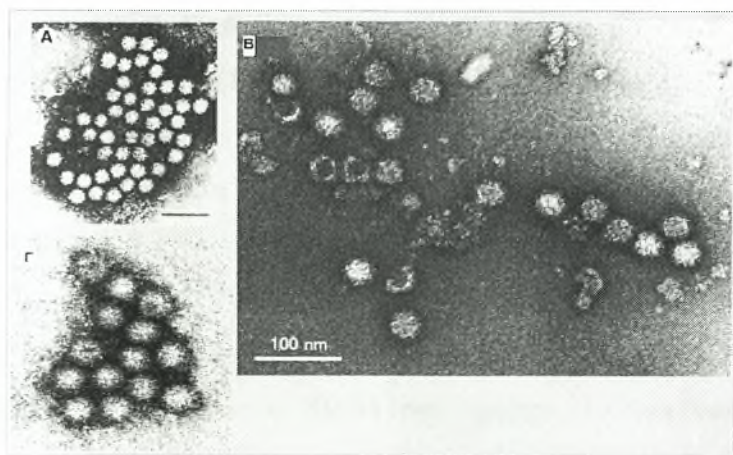
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Τα συμπτώματα που συνδέονται με τη γαστρεντερίτιδα που οφείλεται σε νοροϊό έχουν αναφερθεί στην ιατρική βιβλιογραφία εδώ και 80 χρόνια, ως η «χειμερινή εμετική ασθένεια» (Zahorsky J., 1929). Ωστόσο, στις επόμενες δεκαετίες καθιερώθηκε η υπόθεση ύπαρξης μη βακτηριακής ή μη παρασιτικής αιτίας γαστρεντερίτιδας. Μελέτες στο Οχάιο των Ηνωμένων Πολιτειών έδειξαν ότι το 75% των περιπτώσεων γαστρεντερίτιδας σε μια περίοδο 30 ετών δεν είχε επαρκή αιτιολόγηση και παρουσίαζε οξεία και μεταδοτική μορφή της ασθένειας, μη βακτηριακής προέλευσης (Hodges R.G. et al., 1956). Επακόλουθες κλινικές μελέτες στις Ηνωμένες Πολιτείες (Gordon I. et al., 1947) και την Ιαπωνία (Kojima S. et al., 1948) έδειξαν ότι ιικής φύσεως διηθητοί μολυσματικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν εντερική ασθένεια σε εθελοντές. Συγκεκριμένα, στις αναφερθείσες μελέτες, εκχυλίσματα κοπράνων τα οποία είχαν προηγουμένως φιλτραριστεί για την απομάκρυνση των βακτηρίων, χορηγήθηκαν από άρρωστα άτομα σε ενήλικους εθελοντές οι οποίοι τελικά παρουσίασαν την εντερική νόσο.

Το 1968, ένα κρούσμα οξείας γαστρεντερίτιδας στο Norwalk του Οχάιο αποτέλεσε την αρχή για την ανακάλυψη του πρώτου ιού αναφοράς για τους νοροϊούς. Το 50% των δασκάλων και μαθητών ενός δημοτικού σχολείου της περιοχής νόσησε ενώ ακολούθησε το 32% των συγγενών τους. Η ασθένεια χαρακτηριζόταν από ναυτία και έμετο σε >90% των ασθενών και από διάρροια στο 38%, ενώ η διάρκειά της συνήθως ήταν 12 έως 24 ώρες (Adler J.L. and Zickl R., 1969). Για την εξακρίβωση του αιτιολογικού παράγοντα του κρούσματος ακολούθησε η χορήγηση εκχυλισμάτων κοπράνων ελεύθερων βακτηρίων από τους προσβεβλημένους ασθενείς σε εθελοντές, καθώς και η φυσικοχημική επεξεργασία των παρασκευασμάτων που αποκάλυψε ότι πρόκειται για έναν μικρό σε μέγεθος (<36nm) αιτιολογικό παράγοντα ιικής φύσης, ο οποίος είναι ανθεκτικός στον αιθέρα (δεν περιβάλλεται από φάκελο) και είναι σχετικά σταθερός σε μέτρια θέρμανση. Προσπάθειες για αναπαραγωγή του ικού αυτού παράγοντα σε κυτταροκαλλιέργειες ή πειραματόζωα δεν ήταν επιτυχημένες (Dolin R. et al., 1972). Η ανακάλυψη του ιού Norwalk, που αποτελεί ένα πρότυπο στέλεχος νοροϊού, επιτεύχθηκε το 1972 όταν παρατηρήθηκε ο ικός αυτός παράγων μέσω ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας (IEM) (Karikian A.Z. et al., 1972). Αυτό συνέβη

όταν διηθήματα κοπράνων από τους εθελοντές που χρησιμοποιήθηκαν από το κρούσμα του Norwalk και από τους εθελοντές που ακολούθως μολύνθηκαν, εξετάστηκαν για την ύπαρξη ιών. Ιικά σωματίδια κατακρημνίστηκαν ύστερα από την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος με χρήση ορού από ασθενή σε φάση ανάρρωσης από τη νόσο (Almeida J.D. et al., 1969). Η διαδικασία αυτή βοήθησε την ανίχνευση του ιού καθώς τα ειδικά μόρια αντισώματος από τους ασθενείς σε ανάρρωση συσσωματώθηκαν με τα ιικά σωματίδια και τα κάλυψαν ώστε αυτά να εμφανίζονται σαν μονά ή διπλά σωματίδια (Karikian A.Z. et al., 1980). Τα σωματίδια του Norwalk ιού όπως εμφανίστηκαν με την IEM ήταν μικρά, σφαιρικά, με ένδειξη επιφανειακής δομής, ενώ το μέγεθος των ιικών σωματιδίων αναφέρθηκε από 27nm το μικρότερο ως 32nm το μεγαλύτερο. Επίσης, η ίδια τεχνική συνέβαλλε στην απόδειξη της συσχέτισης των σωματιδίων του Norwalk ιού με τη μόλυνση και τη νόσο ατόμων. Διηθήματα κοπράνων από τους εθελοντές επώαστηκαν με ορό από εθελοντή πριν νοσήσει καθώς και όταν εκείνος βρισκόταν σε φάση ανάρρωσης. Μετά την φυγοκέντρηση των μιγμάτων, τα ανασυσταμένα ιζήματα εξετάστηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (EM) και φάνηκε ότι η ποσότητα αντισώματος ήταν μεγαλύτερη στον ορό κατά την φάση ανάρρωσης σε σχέση με την οξεία φάση της μόλυνσης. Αυτά τα δεδομένα από την παραλλαγή της αρχικής δοκιμής σε συνδυασμό με την ικανότητα των ιικών σωματιδίων να προκαλούν ασθένεια σε εθελοντές, είχαν ως αποτέλεσμα την παραδοχή του Norwalk ιού ως τον αιτιολογικό παράγοντα του



Εικόνα 1: Απεικόνιση: (A) σωματιδίων ιού Norwalk μέσω IEM. Από Karikian A.Z. et al., 1972, (B) σωματιδίων ιού Chiba μέσω EM. Από www.glycoforum.gr.jp/.../GM02/GM02E.html, (Γ) έγχρωμου γραφήματος σωματιδίων νοροϊών από ηλεκτρονική μικροσκοπία εκπομπής (TEM). Από <http://www.images.wellcome.ac.uk/indexplus/page/Prices.html>.

κρούσματος γαστρεντερίτιδας στο Norwalk του Οχάιο (Carter M.J. et al., 1991).

Τα επόμενα χρόνια ανακαλύφθηκαν και άλλοι ιοί οι οποίοι προκαλούσαν κρούσματα γαστρεντερίτιδας και ήταν παρόμοιοι μορφολογικά με τον ιό Norwalk και χαρακτηρίστηκαν ως μικροί ιοί κυκλικής διαμόρφωσης (small round-structured viruses – SRSVs). Ανάμεσα στους ιούς αυτούς ήταν ο Hawaii ιός που εμφανίστηκε

σε ένα οικογενειακό κρούσμα στη Χονολουλού το 1971 και ο Snow Mountain ιός που εμφανίστηκε το 1976 σε κατασκήνωση αναψυχής στο Κολοράντο (Thornhill T.S. et al., 1977; Dolin R. et al., 1982). Το 1976 ανακοινώθηκε η παρουσία ιών με «τυπική» μορφολογία ιών της οικογένειας όπου ανήκουν οι νοροϊοί (Caliciviridae). Τέτοιοι ιοί, οι οποίοι αργότερα ονομάστηκαν SLVs (Sapporo-like viruses), αναγνωρίστηκαν σε κόπρανα νηπίων και μικρών παιδιών, ηλικίας από 2 έως 18 μηνών και εμφάνιζαν υψηλή μορφολογική ομοιότητα με προηγούμενα χαρακτηρισμένους ζωικούς ιούς της οικογένειας Caliciviridae. Τα επόμενα χρόνια αποδόθηκαν στους ιούς αυτούς διάφορα κρούσματα γαστρεντερίτιδας με αποτέλεσμα να αποδειχθεί πως αποτελούν ανθρώπινα εντερικά παθογόνα. Ωστόσο, οι SLVs διαχωρίστηκαν από τους νοροϊούς καθώς παρουσίαζαν μια διαφορετική μορφολογική εμφάνιση από αυτούς, ονομαζόμενη ως «αστέρι του Δαβίδ» με κοιλότητες σαν κύπελλο στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου (Caul E.O. and Appleton H., 1982).

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1980, ξεκίνησε η μοριακή ανάλυση των νοροϊών. Για ακόμα μία φορά, διηθήματα κοπράνων από το κρούσμα του Norwalk χορηγήθηκαν σε εθελοντές για την παραγωγή επαρκών ποσοτήτων ιικών σωματιδίων για τον χαρακτηρισμό του γενώματος του ιού. Χρησιμοποιώντας τα σωματίδια του Norwalk ιού από τα κόπρανα των ασθενών-εθελοντών, επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση και ο αρχικός χαρακτηρισμός του RNA γενώματος του ιού, ο οποίος εκτός των άλλων, ήταν καθοριστικός στην τελική αναγνώριση του ιού ως μέλος των Caliciviridae. Ακολούθησε, τα επόμενα χρόνια, η περαιτέρω ανάλυση του γενώματος του Norwalk ιού (Jiang X. et al., 1993) καθώς επίσης η ανάλυση των γενωμάτων και άλλων νοροϊών που εμπλέκονται στην μολυσματική γαστρεντερίτιδα. Έτσι, ανακοινώθηκε και η πλήρης αλληλουχία του Southampton ιού ο οποίος λήφθηκε από ένα παιδί 2 ετών σε ένα οικογενειακό κρούσμα γαστρεντερίτιδας στο Southampton του Ηνωμένου Βασιλείου το 1991 (Lambden P.R. et al., 1993). Ακόμα, κλωνοποιήθηκε το γένωμα και χαρακτηρίστηκαν νοροϊοί που προσβάλουν ζωικούς οργανισμούς, όπως ο SW43 των χοίρων, ο Jena των βοοειδών και ο murine norovirus-1 των ποντικών (Liu B.L. et al., 1999; Karst S.M. et al., 2003). Από την άλλη, η μοριακή ανάλυση SLVs, όπως των Plymouth και Sapporo ιών επαλήθευσε την παρατήρηση ότι οι ιοί της ομάδας αυτής είναι διακριτοί γενετικά από τους νοροϊούς, αν και έχουν ανιχνευθεί σε περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας κυρίως σε νεότερες ηλικίες (Chiba S. et al., 2000).

Πριν ολοκληρωθεί η αναφορά των κύριων σημείων της ιστορίας της ανακάλυψης των νοροϊών, θα πρέπει να αναφερθεί μια ακόμα αμφισβήτηση της ύπαρξης των νοροϊών ως μια διακριτή ομάδα μολυσματικών ιών. Ο ιός Norwalk και άλλοι μικροί κυκλικοί ιοί θεωρήθηκαν αρχικά ως πιθανά μέλη των Parvo ιών (parvovirus-like), βάσει των ιδιοτήτων και της εμφάνισής τους μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Dolin R. et al., 1972). Το 1981, ωστόσο, δεδομένα μελέτης υπέδειξαν ότι ο Norwalk ιός είχε μία δομική πρωτεΐνη εκτιμώμενου μοριακού βάρους ίσο με 59kDa και πως άνηκε στους calici ιούς (Greenberg H.B. et al., 1981). Το 1990 αναφέρθηκε η μοριακή απόδειξη της αυθεντικότητας του Norwalk ιού ως μέλος των calici ιών, όταν αποδείχθηκε πως το γένωμά του ήταν ένα θετικής πολικότητας, μονόκλωνο, πολυαδενυλιωμένο μόριο RNA (Rosen B.I. et al., 1990). Παρομοίως, μοριακές μελέτες χαρακτηρισμού του γενώματος άλλων μικρών κυκλικών ιών, έδειξαν τη γενετική συσχέτισή τους με τον Norwalk ιό και την επακόλουθη ταξινόμησή τους στην ομάδα των calici ιών (Dingle K.E. et al., 1995).

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το σύστημα ταξινόμησης που εφαρμόζεται για έναν οργανισμό συνήθως αντανακλά το επίπεδο της γνώσης η οποία έχει αποκτηθεί για τον οργανισμό ή ακόμα και την τεχνική δυνατότητα για την μελέτη του, στο χρονικό σημείο ανάπτυξης του συγκεκριμένου ταξινομικού σχήματος. Έτσι, η ταξινόμηση των νοροϊών ακολουθεί την παραπάνω διαπίστωση, καθώς ακολουθήθηκαν διάφορα ταξινομικά σχήματα μέχρι την ανάπτυξη του συστήματος κατάταξης που είναι σήμερα αποδεκτό για τους συγκεκριμένους ιούς (Green K.Y. et al., 2000). Από τη δεκαετία του 1970 ως το 1990, ο πρότυπος Norwalk ιός και άλλοι μικροί κυκλικοί ιοί (SRSVs) πέρασαν διάφορα στάδια κατάταξης σε άλλες ιικές ομάδες ώσπου τελικά να καταταχθούν στην οικογένεια των Caliciviridae. Ωστόσο, η ιική οικογένεια Caliciviridae δημιουργήθηκε το 1979 και περιλάμβανε θετικής πολικότητας RNA ιούς με τη χαρακτηριστική μορφολογική απεικόνιση των 32 κυπελλοειδών κοιλοτήτων στην επιφάνεια του ιοσωματίου, εικοσαεδρικής συμμετρίας (Matthews R.E., 1979). Η συνεχιζόμενη ανακάλυψη νέων calici ιών που ακολούθησε, οι οποίοι ήταν υπαίτιοι περιπτώσεων ανθρώπινης επιδημικής γαστρεντερίτιδας, οδήγησε τελικά στον διαχωρισμό των “human Caliciviruses” (HuCVs) σε δύο ομάδες, βάσει της μορφολογίας, τους “Norwalk-like viruses” (NLVs) και τους “Sapporo-like viruses” (SLVs) (Caul E.O. and Appleton H., 1982). Παρόλα αυτά, στην Έκτη Αναφορά της Παγκόσμιας

Επιτροπής για την Ταξινόμηση των Ιών (ICTV) το 1995, όλοι οι ιοί της οικογένειας Caliciviridae ταξινομήθηκαν σε ένα γένος, Calicivirus, αν και εμφάνιζαν ετερογένεια χαρακτηριστικών (Murphy F.A. et al, 1995).

Επομένως, ο διαχωρισμός των ιών της οικογένειας Caliciviridae σε γένη ήταν αναπόφευκτος. Το γεγονός αυτό στηρίχθηκε σε δύο ανεξάρτητες φυλογενετικές μελέτες. Στη μία μελέτη, η ανάλυση αλληλουχιών καψιδιακών γονιδίων, είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία τεσσάρων γενετικών ομάδων, που ονομάστηκαν “rabbit CV-like animal CVs,” SRSVs, “VESV-like animal CVs” και “Sapporo-like HuCVs” (Berke T. et al., 1997). Είναι αξιοσημείωτο ότι στην άλλη μελέτη, όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση αμινοξικών αλληλουχιών της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, προέκυψαν και πάλι οι εξής τέσσερις διακριτές γενετικές ομάδες (στις παρενθέσεις φαίνονται οι αντιπροσωπευτικοί ιοί κάθε ομάδας): A (FCV και VESV), B (NV και Southampton virus), C (SV και MV) και D (RHDV) (Noel J.S. et al., 1997). Παρόλο που έγινε αποδεκτή η δημιουργία τεσσάρων γενετικών ομάδων, θα έπρεπε να αναπτυχθεί και η ταξινόμηση στο επίπεδο του αντιπροσωπευτικού είδους κάθε τέτοιας ομάδας, όπως απαιτείται. Για τον σκοπό αυτό, πέραν των γονιδιακών αλληλουχιών, κρίνονται απαραίτητα και άλλα κριτήρια, όπως η αντιγονικότητα και άλλες ιδιότητες του ιού. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών αποδέχθηκε τη δημιουργία τεσσάρων γενών και ενέκρινε συγκεκριμένα αντιπροσωπευτικά είδη για τα γένη αυτά (Pringle C.R., 1998).

Όσον αφορά την ταξινόμηση σε επίπεδο μετά το είδος, για τους νοροϊούς έχουν δημοσιευθεί μελέτες με τον παραπάνω σκοπό. Αυτές περιλαμβάνουν μοριακές μεθόδους για την ανάλυση γονιδιωματικών αλληλουχιών, καθώς και ανοσολογικές δοκιμές για την εξαγωγή διακριτών ορότυπων. Ορολογικές μελέτες σε συνδυασμό με IEM βασίζονται στην αντίδραση του αντιγόνου, που αποτελείται από τα ιικά σωματίδια που βρίσκονται στα κόπρανα ασθενών, με το αντίσωμα του οποίου πηγή λήψης αποτελεί ο ορός των ίδιων μολυσμένων ατόμων, αντίστοιχα. Αποτέλεσμα τέτοιων μελετών ήταν η δημιουργία 4 διακριτών ορότυπων για τους νοροϊούς με πρότυπα στελέχη τα NV (Norwalk virus), HV (Hawaii virus), SMA (Snow Mountain agent) και TV (Taunton virus) αντίστοιχα, ενώ επακόλουθα, προτάθηκαν επιπλέον αντιγονικές ομάδες (Okada S. et al., 1990). Ωστόσο, αυτές οι προσεγγίσεις δεν είναι ικανές να προσδιορίσουν επακριβώς τους ορότυπους του ιού. Ακόμα, προσπάθειες εξέτασης των αντιγονικών σχέσεων μεταξύ νοροϊών χρησιμοποιώντας την ανοσο-ενζυμική μέθοδο (ELISA), πραγματοποιήθηκαν, κάνοντας χρήση υπεράνοσου

αντιορού έναντι VLPs (Virus-Like Particles). Με την μέθοδο αυτή, οι ιοί Norwalk, Mexico και Grimsby κατατάχθηκαν σε διαφορετικές αντιγονικές ομάδες, όπως και οι NV και Desert Shield, καθώς επίσης οι NV και HV (Lew J.F. et al., 1994). Προφανώς, απαιτείται ένα οριστικό σχήμα ταξινόμησης, καθώς ο αριθμός των ορότυπων φαίνεται να αυξάνεται. Το επόμενο βήμα, λοιπόν, είναι η γενωτυπική ταξινόμηση των νοροϊών, ώστε να παραχθεί ένα πρακτικό ταξινομικό σχέδιο για την μοριακή ανάλυσή τους. Οι νοροϊοί του ανθρώπου αρχικά είχαν διαχωριστεί σε δύο φυλογενετικές ομάδες, οι οποίες ονομάστηκαν γενετική ομάδα I (GI) και γενετική ομάδα II (GII) αντίστοιχα. Ο Norwalk ιός κατατάχθηκε στην ομάδα GI, ενώ οι ιοί Hawaii και Snow Mountain στην II (Lew J.F. et al., 1994). Τελικά, οι νοροϊοί έχουν διαιρεθεί σε πέντε γενετικές ομάδες, οι οποίες με τη σειρά τους χωρίζονται σε διάφορους γενότυπους. Αυτό το επίπεδο ταξινόμησης στηρίζεται κυρίως στην μερική ή ολόκληρη αλληλουχία της γονιδιωματικής περιοχής του καψιδίου. Σύμφωνα με κάποιες μελέτες, η γενετική ομάδα I (GI) αποτελείται από επτά γενότυπους, ενώ οι ομάδες II και III αποτελούνται αντίστοιχα από οκτώ και δύο γενότυπους (Green K. Y. et al., 2000). Οι ομάδες GIV και GV αποτελούνται από έναν γενότυπο η καθεμιά (Karst S.M. et al., 2003). Όμως, καθώς ανακαλύπτονται νέα στελέχη η κατάταξη σε αυτό το επίπεδο συνεχώς εξελίσσεται. Έχει προταθεί διαφορετική γενωτυπική ταξινόμηση, όπως η κατάταξη σε 31 γενότυπους (14 στην GI ομάδα και 17 στην II) (Kageyama T. et al., 2004). Ταυτόχρονα, σε άλλες μελέτες έχουν οριστεί 15 γενότυποι για την ομάδα II ή 8 και 17 γενότυποι για τις GI και II ομάδες, αντίστοιχα (Zheng D.P. et al., 2004).

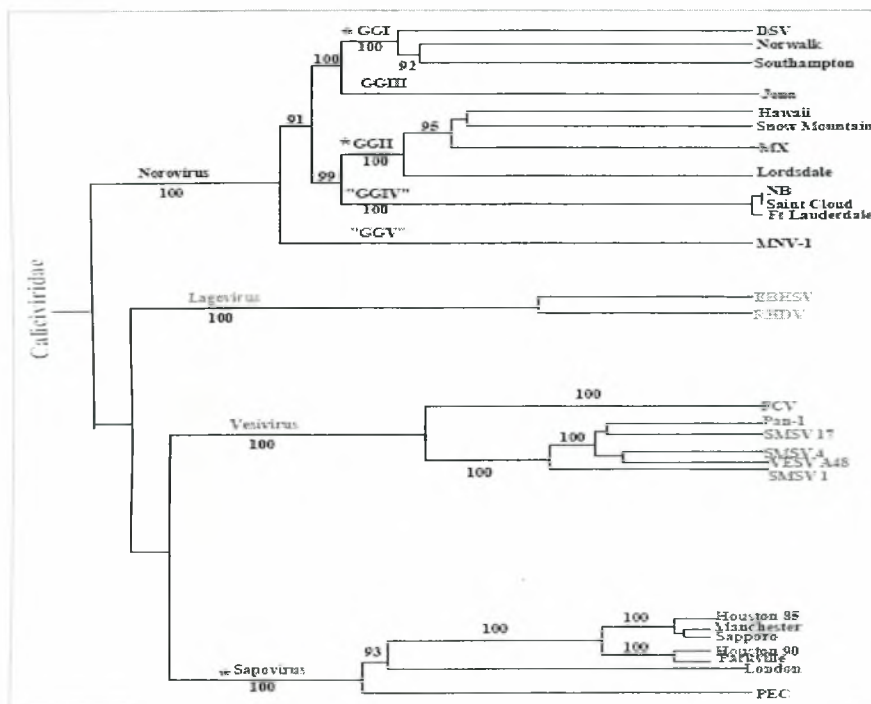
Τελικά, το ταξινομικό σχήμα όπως ισχύει σήμερα για τους ιούς της οικογένειας Caliciviridae ως το επίπεδο του είδους είναι εκείνο που περιγράφεται στον πίνακα 1.

Οικογένεια	Γένος	Είδος
Caliciviridae	Norovirus (NoV)	Norwalk virus (NV)
	Sapovirus (SaV)	Sapporo virus (SV)
	Lagovirus (LaV)	Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)
		European brown hare syndrome virus (EBHSV)
	Vesivirus (VeV)	Vesicular exanthema of swine virus (VESV)
		Feline calicivirus (FCV)

Πίνακας 1: Ταξινόμηση των ιών της οικογένειας Caliciviridae.

Σημειώνεται ότι ο εντερικός calici ιός των βοοειδών (Bovine Enteric Calicivirus – BEC), στελέχος NB, έχει προταθεί ως αντιπροσωπευτικός για ένα πιθανό πέμπτο γένος των Caliciviridae. Όπως έχει αναφερθεί, για την ταξινόμηση των νοροϊών σε επίπεδο μετά το είδος, χρησιμοποιούνται γενωτυπικά συστήματα ανάλυσης των στελεχών που κυκλοφορούν κάθε χρονική περίοδο, βασιζόμενα στη γενετική συγγένεια της κύριας καψιδιακής πρωτεΐνης (στην πλήρη ή μερική αλληλουχία), η οποία προφανώς αντιστοιχεί με την αντιγονική ιδιαιτερότητα του στελέχους. Σύμφωνα με ένα από τα πιο πρόσφατα γενωτυπικά συστήματα, του 2006, οι νοροϊοί διαιρούνται σε πέντε γενετικές ομάδες που ονομάζονται GI έως GV. Οι ομάδες GI, GII και GIII υποδιαιρούνται περαιτέρω σε 8, 19 και 2 γενότυπους αντίστοιχα, ενώ οι ομάδες GIV και GV περιλαμβάνουν από έναν μόνο γενότυπο (Zheng D.P. et al.,

2006).



Εικόνα 2: Φυλογενετική ταξινόμηση των οικογένειας Caliciviridae, βάσει σύγκρισης αλληλουχιών του καψιδιακού γονιδίου. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν παθογόνα του ανθρώπου. Από Karst S.M. et al., 2003.

Τελευταίος αλλά εξίσου σημαντικός, θα πρέπει να αναφερθεί ο τρόπος ονοματολογίας των νοροϊών μεταξύ των ερευνητών για την περιγραφή ενός στελέχους τόσο για επιδημιολογικές μελέτες όσο και για τη χρήση του σε διάφορες γενετικές βάσεις δεδομένων. Το κρυπτογράφημα που ακολουθείται για τον σκοπό αυτό, για τους ιούς της οικογένειας Caliciviridae έχει ως εξής: είδος ξενιστή από όπου ο ιός λήφθηκε αρχικά / συντομογραφία γένους / συντομογραφία είδους / όνομα του ιού / χρονολογία εμφάνισης / χώρα προέλευσης. Μια τροποποίηση αυτού του κρυπτογραφήματος είναι η προσθήκη της κατάληξης “CV” (Caliciviridae) μετά το όνομα του είδους ξενιστή, με την γενική συναίνεση των ερευνητών. Επίσης, στην περίπτωση των νοροϊών, όπου υπάρχει ένα μόνο είδος στο γένος, δεν είναι

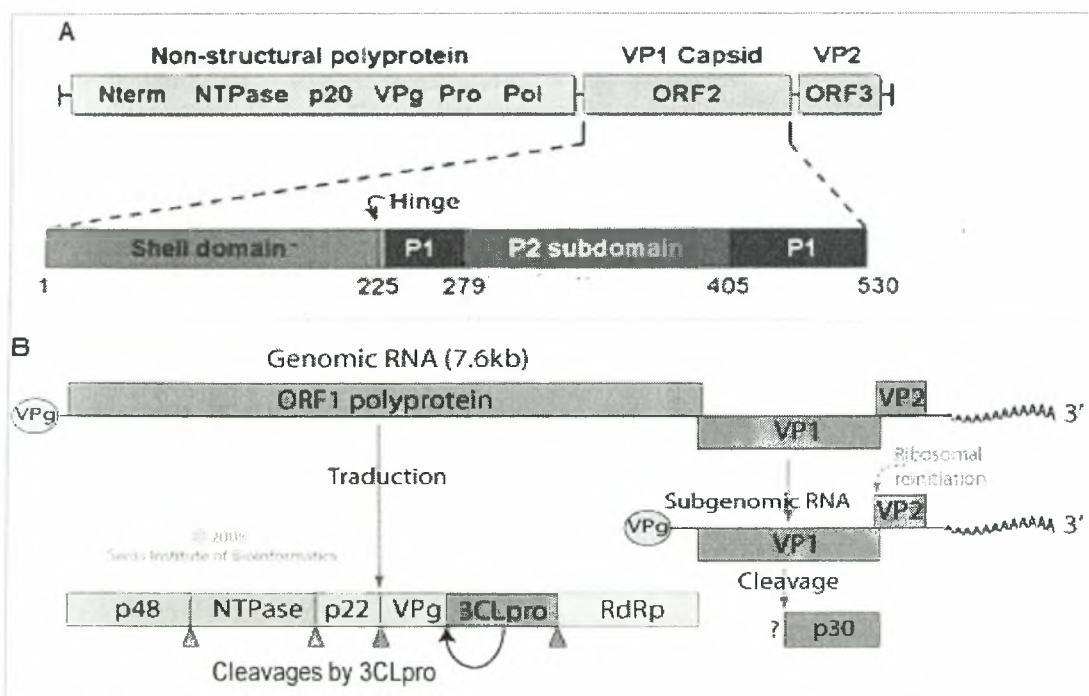
απαραίτητη η γραφή του είδους. Όμως, προστίθεται ένα ακόμα στοιχείο μετά την συντομογραφία γένους, το οποίο προσδιορίζει την γενετική ομάδα και τον γενότυπο του στελέχους νοροϊού (Green K.Y. et al., 2000). Ως παραδείγματα αναφέρονται τα κρυπτογραφήματα για τον ιό Norwalk που κατατάσσεται στην γενετική ομάδα I και στον γενότυπο 1, για τον Chiba που κατατάσσεται στην γενετική ομάδα I και στον γενότυπο 4 και για τον ιό Lordsdale που ανήκει στην ομάδα GII και στον γενότυπο 4: Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US, Hu/NoV/GI.4/Chiba/1987/JP και Hu/NoV/GII.4/Lordsdale /1993/UK, αντίστοιχα.

1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι νοροϊοί, όπως όλα τα μέλη της οικογένειας Caliciviridae, είναι μικροί ιοί εικοσαεδρικού σχήματος με διάμετρο καψιδίου από 27 έως 40nm περίπου και δεν περιβάλλονται από φάκελο, ενώ κατέχουν ένα γραμμικό, θετικής πολικότητας, μονόκλωνο RNA (ssRNA) γένωμα. Το όνομα της οικογένειας προέρχεται από τη λατινική λέξη *calix*, που σημαίνει κάλυκας ή κύπελλο, εξαιτίας της χαρακτηριστικής μορφολογίας των ιών αυτών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ενώ οι νοροϊοί οφείλουν το όνομά τους στον ιό του γένους που ανακαλύφθηκε πρώτος, τον Norwalk. Οι νοροϊοί αποτελούν σημαντικά ιατρικά και κτηνιατρικά παθογόνα. Συγκεκριμένα, αποτελούν την κυριότερη αιτία της μη βακτηριακής επιδημικής γαστρεντερίτιδας, η οποία εμφανίζεται σε οικογενειακά κρούσματα ή σε επίπεδο «κλειστής» κοινότητας, όπως για παράδειγμα μια μικρή αστική περιοχή ή ένα νοσοκομείο. Επίσης, κατέχουν σημαντικό ρόλο σε περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας σε μικρά παιδιά και νήπια. Βέβαια, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις τέτοιων κρουσμάτων από νοροϊούς σε αρκετές χώρες, με υψηλή συχνότητα και στις Ηνωμένες Πολιτείες και αλλού. Όσον αφορά τη δυνατότητα μελέτης των ιών αυτών εργαστηριακά, ένα σημαντικό στοιχείο είναι ότι μέχρι σήμερα δεν έχει αναπτυχθεί ένα πλήρως ανεκτό σύστημα κυτταροκαλλιέργειας για τους νοροϊούς που σχετίζονται με γαστρεντερίτιδα σε ανθρώπους, παρόλο που τέτοιες προσπάθειες έχουν απασχολήσει τους ερευνητές. Το μοναδικό μέλος του γένους *Noonivirus* το οποίο αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε κυτταροκαλλιέργεια είναι ο νοροϊός των ποντικών (*murine noonivirus*), ο οποίος αναπτύσσεται σε πρωτογενή καλλιέργεια μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων από ποντικό και σχηματίζει πλάκες σε RAW264.7 κύτταρα, μια συνεχή κυτταρική σειρά με μορφολογία μακροφάγων ποντικού (Wobus C.E. et al., 2004).

Το γονιδίωμα των νοροϊών είναι ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA 7.700 βάσεων περίπου και περιλαμβάνει τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Το 5' άκρο του ξεκινά συνήθως με την ακραία ακολουθία pGrU και είναι ενωμένο με μια πρωτεΐνη, ενώ το 3' άκρο είναι πολυαδενυλιωμένο. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι το γονιδίωμα του Norwalk ιού έχει μήκος 7642 νουκλεοτιδίων και καταλήγει σε μια πολυαδενυλιωμένη ουρά 110 νουκλεοτιδίων, ενώ έχει σύνθεση βάσεων 48% G+C (Jiang X. et al., 1993). Το ORF1 ξεκινά κοντά στο 5' άκρο του γενώματος και κωδικοποιεί για τις μη δομικές πρωτεΐνες. Ακολουθούν, προς το 3' άκρο, τα ORF2 και ORF3 που κωδικοποιούν για τις δομικές πρωτεΐνες VP1 και VP2 αντίστοιχα, σε μια γενωμική περιοχή που αντιστοιχεί σε ένα υπογενωμικό RNA μεταγράφημα, το οποίο ξεκινά με την ακολουθία του 5' άκρου του γενώματος που επαναλαμβάνεται εσωτερικά και καταλήγει σε πολυαδενυλιωμένη ουρά. Επίσης, αναφέρεται ότι τα ORF1 και ORF3 είναι στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης, καθώς επίσης ότι η γονιδιωματική οργάνωση επιτρέπει την επικάλυψη του κάθε ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης με το επόμενο του προς την πλευρά του 3' άκρου. Συγκεκριμένα, το ORF1 εκτείνεται και μέσα στο ORF2 για περίπου 17 νουκλεοτίδια, ενώ η πρώτη βάση του κωδικονίου έναρξης του ORF3 επικαλύπτεται με το τελευταίο κατάλοιπο του κωδικονίου τερματισμού του ORF2 (Carter M.J. et al., 1992; Clarke I.N. et al., 1998).



Εικόνα 3: (Α) Οργάνωση και (Β) έκφραση γονιδιώματος νοροϊών. Από (Α) Donaldson F. Eric et al., 2008, (Β) www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/194.html.

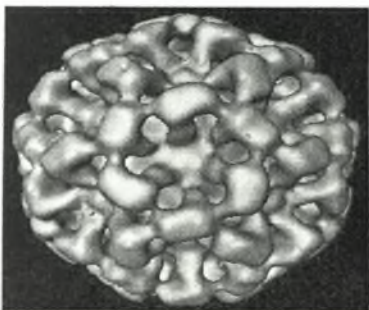
1.3.2 Δομή ιοσωματίου

Τα ιοσωμάτια των νοροϊών έχουν σχήμα εικοσάεδρου και η συμμετρία τους καθορίζεται από τον «αριθμό τριγωνισμού» (triangulation number) T ο οποίος παίρνει την τιμή 3, για τους ιούς αυτούς. Το καψίδιο περιέχει 90 διμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης, VP1, τα οποία σχηματίζουν ένα κέλυφος από όπου 90 καψομερή σχήματος αψίδας προεκβάλλουν στους κοντινούς στο καθένα και αυστηρά καθορισμένους άξονες της δίπλευρης περιστρεφόμενης συμμετρίας. Αυτές οι δομές σχήματος αψίδας διευθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε 32 μεγάλες κοιλότητες είναι ορατές στις θέσεις της τρίπλευρης και πεντάπλευρης περιστρεφόμενης συμμετρίας του εικοσάεδρου. Οι κοιλότητες αυτές είναι εκείνες οι οποίες τελικά φαίνονται σαν δομές σχήματος κυπέλλου στην επιφάνεια των νοροϊών (Prasad B.V. et al., 1994). Επίσης, εξαιτίας της αδυναμίας αναπαραγωγής του ιού εργαστηριακά, μια αρκετά χρήσιμη μέθοδος για την ανάλυση της δομής του καψιδίου είναι η παραγωγή ανασυνδυασμένων σωματιδίων που ομοιάζουν τον ιό (recombinant virus-like particles – rVLPs) τα οποία εκφράζονται μέσω ενός συστήματος με baculovirus και μπορούν να υποκαταστήσουν τα «φυσικά» ιοσωμάτια (Jiang X. et al., 2000). Επομένως, η διαδικασία αυτοσυγκρότησης της κύριας καψιδιακής πρωτεΐνης VP1 στα rVLPs είναι αποτελεσματική, καθώς δεν απαιτεί το RNA γένωμα ή την μικρότερη καψιδιακή πρωτεΐνη, την VP2 (Jiang X. et al., 1992). Χαρακτηριστικά, τα 180 αντίγραφα της ανασυνδυασμένης VP1 πρωτεΐνης από τον Norwalk ιό αυτοσυγκροτούνται σε σωματίδια μεγέθους 38nm με $T=3$ εικοσαεδρική συμμετρία. Ωστόσο, από την ίδια διαδικασία, μπορούν να σχηματιστούν μικρότερα VLPs 23nm με $T=1$ εικοσαεδρική συμμετρία που αποτελούνται το καθένα από 60 αντίγραφα της πρωτεΐνης VP1 (White L.J. et al., 1997).

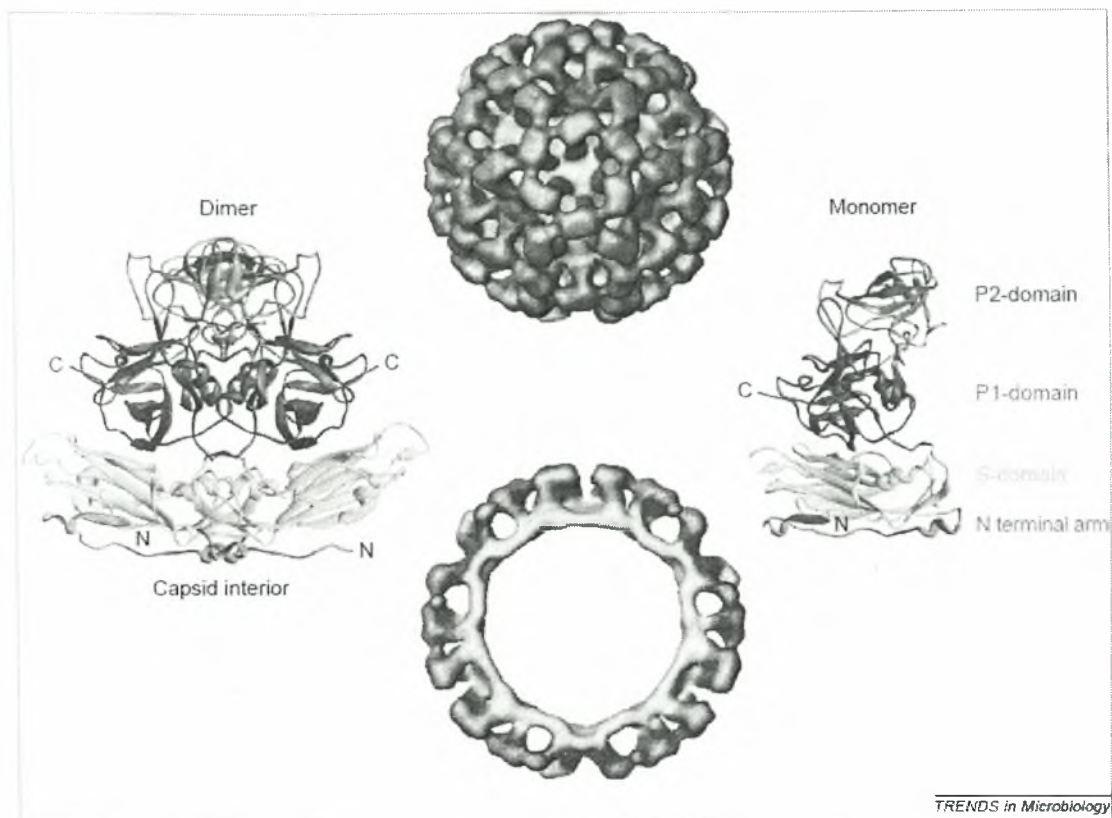
Επίσης, η ατομική δομή του rVLP του Norwalk ιού έχει προσδιοριστεί μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X, επιτρέποντας μια πιο λεπτομερή ανάλυση του τρόπου δόμησης του ιικού καψιδίου (Prasad B.V. et al., 1999). Μελέτες ηλεκτρονικής κρυσταλλογραφίας, από την άλλη, έχουν καθορίσει την ύπαρξη στην VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη, δύο κύριων λειτουργικών επικρατειών, εκείνης του κελύφους (S) και εκείνης του προεκβάλλοντος βραχίονα (P). Η επικράτεια S σχηματίζει το εσωτερικό τμήμα του καψιδίου σχήματος κελύφους το οποίο περιβάλλει το RNA γένωμα και είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των επαφών για τον σχηματισμό της εικοσαεδρικής δομής με $T=3$, ενώ η επικράτεια P είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των προεξοχών σχήματος αψίδας οι οποίες αναδύονται από τη δομή κελύφους και

εμπεριέχουν τις διμερικές επαφές. Επισημαίνοντας την αδιαμφισβήτητη σημασία της VP1 πρωτεΐνης στην δομή του ιοσωματίου, έχουν παρατηρηθεί οι επιδράσεις στο σχηματισμό rVLPs από τον ιό Norwalk όταν δεν εκφράζεται ολόκληρη η πρωτεϊνική της αλληλουχία. Συγκεκριμένα, η έκφραση μόνο της αμινοτελικής περιοχής της πρωτεΐνης η οποία αντιστοιχεί στην επικράτεια S (αμινοξέα 1-227) είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό σχεδόν ομαλών σωματιδίων με διάμετρο περίπου ίση με 30nm. Ωστόσο, έκφραση μόνο των αμινοξικών αλληλουχιών που αντιστοιχούν στην επικράτεια P δεν απέδωσε VLPs. Τελικά, μόνο η αφαίρεση των πρώτων 20 αμινοξικών καταλοίπων από την ακραία αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης δεν επηρέασε την διαδικασία αυτοσυγκρότησης της VP1 και επέτρεψε την παραγωγή σωματιδίων φυσιολογικού μεγέθους 38nm με T=3 εικοσαεδρική συμμετρία (Bertolotti-Ciarlet A. et al., 2002).

Συγκρίσεις της καψιδιακής δομής τόσο των νοροϊών με άλλους calici ιούς όσο και των νοροϊών μεταξύ τους, έχουν πραγματοποιηθεί ώστε να παρατηρηθούν οι μικρές διαφορές στην εμφάνιση του ιοσωματίου. Μελέτες ηλεκτρονικής κρυομικροσκοπίας και επεξεργασίας εικόνας με υπολογιστή σε συνδυασμό με την κλασική για τους calici ιούς ηλεκτρονική μικροσκοπία αρνητικής χρώσης, έχουν αποκαλύψει ότι ο ιός Norwalk, ως αντιπροσωπευτικός των νοροϊών, διαφέρει στο μήκος και το σχήμα της κορυφής της προεξέχουσας επικράτειας σχήματος ασπίδας σε σύγκριση με μέλη άλλων γενών της οικογένειας Caliciviridae και συγκεκριμένα εμφανίζει μια «πτερωτή» εμφάνιση σε σχέση με τις οξείες εσοχές των άλλων γενών. Όμως, δυσδιάκριτες διαφορές στην καψιδιακή δομή εμφανίζονται και μεταξύ των νοροϊών, όπως αποκαλύφθηκε με τη σύγκριση της δομής του ιού Norwalk γενετικής ομάδας GI με εκείνη του ανθρώπινου νοροϊού Grimsby γενετικής ομάδας GII. Παρόλο που η αρχιτεκτονική των δύο ιών ήταν σχεδόν όμοια, ο Grimsby ιός παρουσίαζε πιο ομαλές εσοχές και πιο εκτεταμένες προεξέχουσες κυρτώσεις σχήματος ασπίδας (Prasad B.V. et al., 1994).



Εικόνα 4: Ανακατασκευή εικόνας του Norwalk VLP από κρυοηλεκτρονική μικροσκοπία. Από www.scientificblogging.com/news/und.



Εικόνα 5: Δομή VLP του ιού Norwalk (πάνω, ολόκληρη και κάτω, εγκάρσια τομή) και η VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη (δεξιά, η μονομερής πρωτεΐνη σε διάγραμμα κορδέλας όπου απεικονίζονται οι επικράτειες και αριστερά, η διμερής καψιδιακή υπομονάδα – καψομερές). Η δομή του ισοματίου έχει προσδιοριστεί βάσει κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X μέχρι και 3,4Å. Από *Hutson M. Anne et al., 2004*.

1.3.3 Ιικές πρωτεΐνες

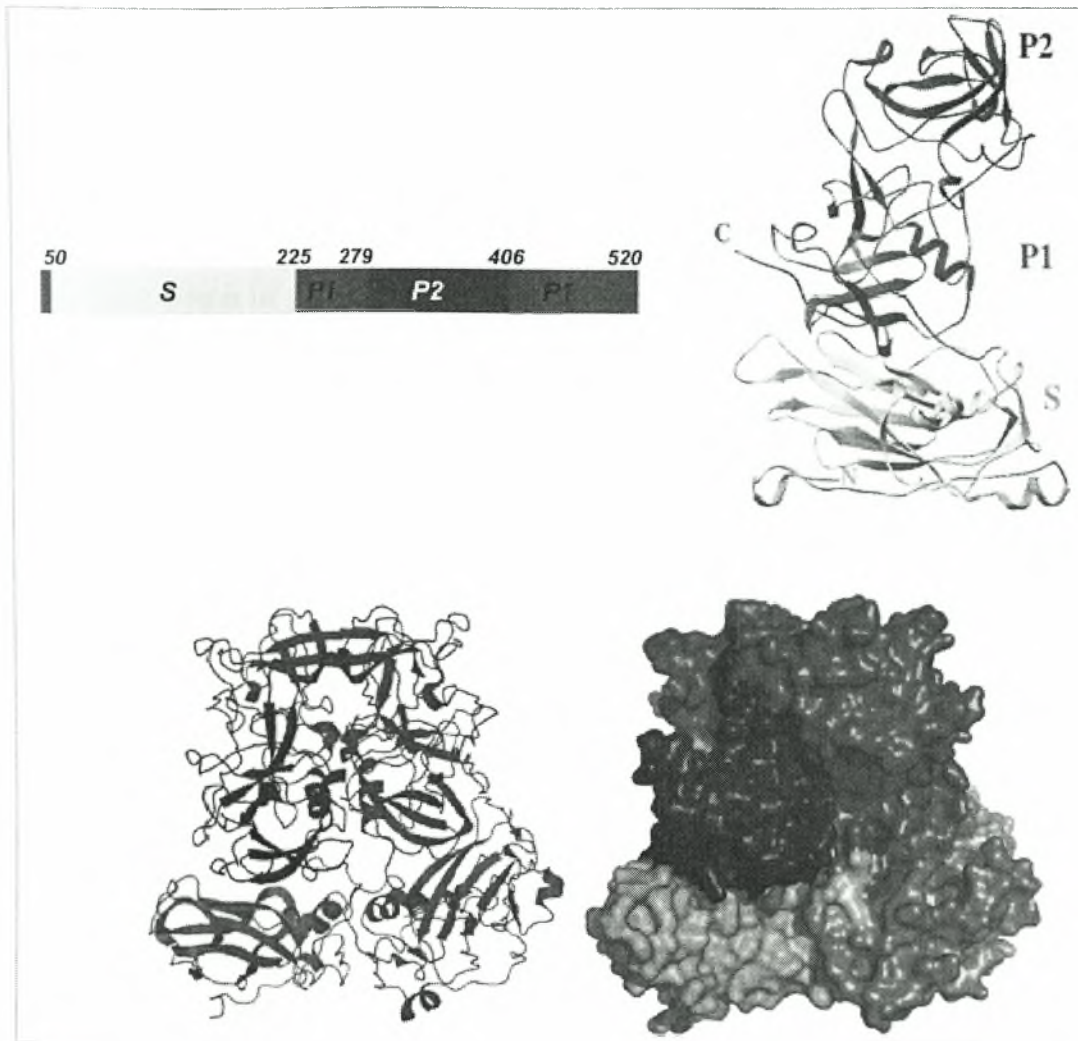
A. Δομικές πρωτεΐνες

Στο ώριμο ισομάτιο των νοροϊών απαντώνται τρεις πρωτεΐνες, οι VP1, VP2 και VPg. Η πρωτεΐνη VPg είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του γενωμικού RNA το οποίο δεν έχει καλύπτρα στο άκρο αυτό, αλλά και στο υπογενωμικό RNA στα προσβεβλημένα κύτταρα. Αν και η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί ένα ελάσσων συστατικό του ιικού σωματιδίου, καθώς υπάρχει σε ένα ή δύο αντίγραφα ανά σωματίο, μάλλον κατατάσσεται στις μη δομικές πρωτεΐνες εξαιτίας άλλων λειτουργιών που επιτελεί κυρίως κατά την αναπαραγωγή του ιού, όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Η κύρια δομική πρωτεΐνη είναι η VP1, περίπου 60000Da, η οποία είναι παρούσα σε 180 αντίγραφα ή 90 διμερή ανά ισομάτιο. Η κεφαλαιώδους σημασία της για την δόμηση του καψιδίου αντικατοπτρίζει τον κυρίαρχο ρόλο της και στις αντιγονικές ιδιότητες του ιού. Επίσης, όπως έχει αναφερθεί, η VP1 περιέχει δύο

κύριες επικράτειες, την επικράτεια κελύφους (S) και την επικράτεια προεξέχοντος βραχίονα (P). Ωστόσο, μια πιο λεπτομερής ανάλυση των επικρατειών αυτών, έχει αποκτηθεί σύμφωνα με κρυσταλλογραφικές μελέτες του καψιδίου. Ο συνολικός αριθμός αμινοξέων της VP1 του ιού Norwalk είναι 530 και η ελάχιστη αμινοξική αλληλουχία που απαιτείται για τον σχηματισμό καψιδίου εντοπίζεται στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης. Έτσι, το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί σε όλη την επικράτεια S και περιλαμβάνει τα αμινοξέα 1 έως 225, είναι σχετικά συντηρημένο ανάμεσα στους νοροϊούς σε συγκρίσεις αλληλουχιών και περιλαμβάνει δύο περιοχές. Οι περιοχές αυτές είναι ο αμινοτελικός βραχίονας που αποτελείται από τα αμινοξέα 10 έως 49 και συνιστά το εσωτερικό μέρος του καψιδίου, καθώς επίσης το τμήμα της επικράτειας S που αποτελείται από τα αμινοξέα 50 έως 225 και σχηματίζει μια δομή κλασσικής αντιπαράλληλης βήτα-επιφάνειας από 8 έλικες, ώστε να δομηθεί η περιοχή σχήματος κελύφους. Επίσης, η επικράτεια S συνδέεται με την επικράτεια P μέσω μιας εύκαμπτης άρθρωσης. Από την άλλη, το καρβοξυτελικό τμήμα της VP1 περιλαμβάνει την επικράτεια P η οποία διαχωρίζεται σε δύο υποεπικράτειες, την P1 και P2 υποεπικράτεια. Η υποεπικράτεια P1 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 226 έως 278 και 406 έως 520, ενώ η P2 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 279 έως 405. Ολόκληρη η επικράτεια P εμφανίζει μια σχετική μεταβλητότητα ανάμεσα στους νοροϊούς συγκριτικά με την S επικράτεια, ωστόσο η υποεπικράτεια P2 αντιστοιχεί στην περιοχή της VP1 που εμφανίζει την υψηλότερη μεταβλητότητα αλληλουχίας ανάμεσα στα μέλη του γένους των νοροϊών. Η P1 υποεπικράτεια περιλαμβάνει β πτυχώσεις και μια α έλικα και τα δύο τμήματά της σχηματίζουν τις πλευρές της «αψίδας» των καψομερών και τοποθετούν την υποεπικράτεια P2 στην κορυφή της «αψίδας». Η έκθεση της μεταβλητής περιοχής της VP1 στην επιφάνεια του ιοσωματίου είναι σύμφωνη με τον αναμενόμενο ρόλο της στη διαμόρφωση μιας κύριας αντιγονικής θέσης και στην πρόσδεση στον υποδοχέα (White L.J. et al., 1996). Μάλιστα, έχει προταθεί το μοντέλο που περιγράφει την αρκετά συντηρημένη επικράτεια S να λειτουργεί σαν ένα εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό ικρίωμα με τον αμινοτελικό βραχίονα να προσφέρει το μέσο για την ανάπτυξη της κατάλληλης κύρτωσης, ενώ η επικράτεια P θα μπορούσε να αποτελεί μια μονάδα με δυνατότητα αντικατάστασης ώστε να είναι δυνατή η διαφοροποίηση στελεχών και η αντιγονική εξειδίκευση. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν υποδείξει ότι η υποεπικράτεια P2 είναι μια σημαντική θέση για εξειδίκευση στην πρόσδεση του υποδοχέα και στις αντιγονικές ιδιότητες των νοροϊών (Nilsson M. et al.,

2003).



Εικόνα 6: (Πάνω) Οι επικράτειες της VP1 καψιδιακής πρωτεΐνης και δομική αναπαράσταση του μονομερούς της πρωτεΐνης. Από *Hardy E.M., 2005*, (Κάτω) Δομική αναπαράσταση του καψιδιακού μονομερούς (διμερές VP1). Από *Donaldson F. Eric et al., 2008*.

Η πρωτεΐνη VP2 αποτελεί την ελάσσονα δομική πρωτεΐνη καθώς είναι παρούσα σε ένα έως δύο αντίγραφα ανά ιοσωμάτιο. Ο αριθμός αμινοξέων που την αποτελούν κυμαίνεται από 208 έως 268 και το μοριακό της βάρος υπολογίζεται από 22000 έως 29000Da, ενώ εμφανίζει εκτεταμένη μεταβλητότητα αλληλουχίας μεταξύ των στελεχών (Glass P.J. et al., 2000). Η ακριβής λειτουργία της δεν είναι πλήρως γνωστή, αν και διάφορα δεδομένα συνηγορούν στην απαίτηση της πρωτεΐνης αυτής για την παραγωγή ώριμων μολυσματικών ιών. Μια πειραματική απόδειξη αποτελεί το αποτέλεσμα της εισαγωγής ενός κωδικονίου τερματισμού στο αναγνωστικό πλαίσιο της VP2 σε έναν cDNA κλώνο από μολυσματικό calici ιό των αιλουροειδών, η οποία είχε ως αποτέλεσμα τη μη παραγωγή της πρωτεΐνης. Η αντιγραφή του RNA γονιδιώματος δεν παρεμποδίστηκε, όμως μολυσματικοί ιοί δεν μπορούσαν να

παραχθούν χωρίς την παρουσία άθικτης πρωτεΐνης VP2 (Sosnovtsev S.V. et al., 2005). Αν και η πρωτεΐνη VP1 είναι ικανή να αυτοσυναρμολογείται στα rVLPs ανεξάρτητα από την παρουσία της VP2, η παρουσία της ελάσσοнос δομικής πρωτεΐνης ίσως αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της VP1 και ενισχύει τη σταθερότητα των σωματιδίων ομοιάζοντων στον ιό που παράγονται σε ένα σύστημα έκφρασης με baculovirus (Bertolotti-Ciarlet A. et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα, η VP2 είναι μια πρωτεΐνη πλούσια σε βασικά αμινοξέα με ισοηλεκτρικό σημείο υπολογισμένο πάνω από 10. Επίσης, ύστερα από την συναρμολόγηση των rVLPs απουσία RNA, έχει παρατηρηθεί ότι δεν υπάρχουν σπές ικανού μεγέθους ώστε να εγκλωπωθεί το γένωμα κατόπιν της συναρμολόγησης, συνεπώς το RNA γένωμα συσκευάζεται στο ιοσωμάτιο ταυτόχρονα με το σχηματισμό του καψιδίου. Συμπερασματικά, ο πιθανότερος ρόλος της VP2 πρωτεΐνης είναι η συμμετοχή της στο πακετάρισμα του γενώματος, όπως υποδεικνύει και η χημική της φύση που επιτρέπει την σύνδεσή της με το αρνητικά φορτισμένο RNA.

B. Μη δομικές πρωτεΐνες

Οι νοροϊοί, όπως και όλοι οι ιοί της οικογένειας Caliciviridae, παράγουν τις ώριμες μη δομικές τους πρωτεΐνες με πρωτεολυτική διάσπαση μιας μεγάλης πολυπρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το ORF1. Το μήκος της μη πρωτεολυμένης πρόδρομης πολυπρωτεΐνης είναι περίπου 200000Da. Αυτή η μεγάλη πρόδρομη μορφή δεν έχει παρατηρηθεί ποτέ, πιθανότατα επειδή η πρωτεολυτική επεξεργασία είναι γρήγορη και πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την μετάφραση. Η πρωτεόλυση της πρόδρομης πολυπρωτεΐνης διεκπεραιώνεται από μια πρωτεάση κυστεΐνης που κωδικοποιείται από το ιικό γένωμα, την 3CL (3 cystein-like) πρωτεάση. Οι διπεπτιδικές θέσεις διάσπασης που αναγνωρίζονται από την πρωτεάση είναι σύμφωνες με εκείνες που περιγράφονται για την 3C πρωτεάση κυστεΐνης των picorna ιών. Οι θέσεις διάσπασης των νοροϊών και γενικά των calici ιών που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα περιέχουν είτε ένα αρνητικά φορτισμένο γλουταμικό οξύ (E) ή μια φορτισμένη γλουταμίνη (Q) στην πρώτη θέση, που περιγράφεται ως P1. Περισσότερη ποικιλομορφία υπάρχει στη δεύτερη θέση της διπεπτιδικής περιοχής διάσπασης, η οποία ορίζεται ως P1'. Μελέτες ειδικότητας του υποστρώματος της πρωτεάσης των caliciviridae έχουν παρουσιάσει ανθεκτικότητα του ενζύμου στη θέση P1' σε ορισμένες θέσεις διάσπασης (Hardy M. et al., 2002). Ακόμα, η διαμόρφωση της πρωτεΐνης που περιβάλλει την περιοχή αναγνώρισης διπεπτιδίου είναι σημαντική για την αποδοτική διάσπαση από την πρωτεάση.

Οι θέσεις των περιοχών διάσπασης της πολυπρωτεΐνης στο ORF1 που καθορίζουν τα όρια των τελικών μη δομικών πρωτεϊνικών προϊόντων της διάσπασης έχουν καθοριστεί για στελέχη calici ιών τα οποία αντιπροσωπεύουν τα 4 γένη της οικογένειας, συμπεριλαμβανομένων των νοροϊών (Liu B. et al., 1996; Liu B.L. et al., 1999). Για τους νοροϊούς λοιπόν, πέντε θέσεις διάσπασης στο ORF1 της πολυπρωτεΐνης έχουν χαρτογραφηθεί ώστε να απελευθερώνονται 6 ώριμα προϊόντα, όπως έχει μελετηθεί χαρακτηριστικά ο ιός Southampton. Ένας αριθμός πρόδρομων πρωτεϊνών έχει περιγραφεί επίσης για τους caliciviridae και πιθανότατα αυτές οι πρωτεΐνες έχουν καθορίσει λειτουργίες στην αντιγραφή (Belliot G. et al., 2003).

Η διαθεσιμότητα των χαρτών πρωτεολυτικής διάσπασης της μη δομικής πρόδρομης πολυπρωτεΐνης των calici ιών έχει προωθήσει μελέτες οι οποίες αποσαφηνίζουν τις λειτουργίες καθώς και τις τρισδιάστατες δομές των επιμέρους ώριμων δομικών πρωτεϊνών. Οι μη δομικές πρωτεΐνες των νοροϊών στο ORF1 κωδικοποιούνται με τη σειρά NH₂ - p48 - NTPase - p22 - VPg - Pro - RdRp - COOH. Επίσης, οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται απλούστερα NS (non structural) 1 έως 7, αφού σε όλα τα άλλα γένη της οικογένειας Caliciviridae πλην των νοροϊών, η πρωτεΐνη p48 αντιστοιχεί σε δύο πρωτεολυτικά προϊόντα. Αρχικά, οι λειτουργίες τριών μη δομικών πρωτεϊνών των νοροϊών προέκυψαν με βάση ανάλογες ακολουθίες αλληλουχιών των picorna ιών οι οποίες περιλαμβάνουν την 2C ελικάση, την 3C πρωτεάση και την 3D RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (Neill J.D. et al., 1990). Βιοχημικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τις ομόλογες δραστηριότητες στις πρωτεΐνες των νοροϊών που αντιστοιχούν στις NS3^{NTPase}, NS6^{Pro} και NS7^{Pol} πρωτεΐνες, αντίστοιχα. Συνήθως, πρωτεΐνες που απαντώνται στην ίδια θέση σε διάφορες ικές οικογένειες, εμφανίζουν ομοιότητες αλληλουχίας και επιτελούν παρόμοιες λειτουργίες. Ωστόσο, αν και η γονιδιακή σειρά των μη δομικών πρωτεϊνών και η ισχυρή ομολογία σε ορισμένα μοτίβα των αλληλουχιών τους προτείνουν έναν κοινό πρόγονο για τους calici και picorna ιούς, είναι εντυπωσιακό ότι διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες κωδικοποιούνται σε τμήματα του ORF1 των νοροϊών εμφανίζουν ελάχιστη ή καμία ανιχνεύσιμη συγγένεια ακολουθίας με τους picorna ιούς. Αυτές περιλαμβάνουν τις N-τελικές πρωτεΐνες NS1 και NS2, που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες 2A και 2B των picorna ιών, την NS4, αντίστοιχη της 3A πρωτεΐνης των picorna ιών και την NS5, η οποία αντιστοιχεί στην VPg πρωτεΐνη.

Πιο συγκεκριμένα, η p48 μη δομική πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το αμινοτελικό άκρο του ORF1, το οποίο είναι σχετικά μεταβλητό στο μήκος και την

αλληλουχία ανάμεσα στους νοροϊούς της γενετικής ομάδας I και εκείνους της GII ομάδας. Η αμινοξική ακολουθία συντηρείται περισσότερο προς το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Μια θέση αναγνώρισης για πρωτεολυτική πέψη έχει αναγνωριστεί μέσα στην κωδικοποιούσα περιοχή της p48 για το Camberwell στέλεχος νοροϊού γενετικής ομάδας II, η οποία θα μπορούσε να παράγει δύο πρόσθετες πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 15 και 22 kDa, αντίστοιχα (Seah E.L. et al., 1999). Αντίθετα, καμία περαιτέρω επεξεργασία δεν έχει παρατηρηθεί στην p48 στους νοροϊούς γενετικής ομάδας I ή στο στέλεχος MD-145 που ανήκει στην γενετική ομάδα II, όταν μελετήθηκαν τα στελέχη αυτά σε συστήματα μετάφρασης απουσία κυττάρων. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η πρωτεολυτική επεξεργασία στις περιπτώσεις αυτές να συμβαίνει σε μικρό, μη ανιχνεύσιμο επίπεδο (Belliot G. et al., 2003; Hardy M.E. et al., 2002). Όπως αναφέρθηκε, η πρωτεΐνη αυτή δεν εμφανίζει κάποια κοινά δομικά μοτίβα με άλλες ιικές πρωτεΐνες, ωστόσο περιέχει το μοτίβο αλληλουχίας των καταστολέων όγκων H box/NC. Τέτοια μοτίβα είναι παρόντα σε μια οικογένεια κυτταρικών πρωτεϊνών, η οποία περιλαμβάνει τους H-rev107 και TIG3, παράγοντες που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ωστόσο ακριβής συσχέτιση των αλληλουχιών αυτών με κάποια λειτουργία της p48 δεν έχει διαπιστωθεί (Hughes P.J. et al., 2000). Επίσης, μια υδροφοβική περιοχή κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της p48 έχει προβλεφθεί μέσω σύγκρισης αμινοξικών ακολουθιών, που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 360 έως 379 (Ettayebi K. and Hardy M.E., 2003). Η περιοχή αυτή πιθανόν προσδίδει τη ιδιότητα στην πρωτεΐνη για μετατόπιση στο σύστημα Golgi, όπως υποδείχθηκε μετά την εισαγωγή της καρβοξυτελικής αυτής, πιθανόν διαμεμβρανικής περιοχής, σε κυτταρική πρωτεΐνη σύντηξης που κατέληξε στην μεταφορά του μορίου στο σύστημα Golgi από την ευρεία κατανομή του στο κυτοσόλιο και τον πυρήνα. Μια ακόμα ιδιότητα η οποία προσδίδεται στην πρωτεΐνη p48 σχετικά με το σύστημα Golgi είναι η αποσυναρμολόγησή του ύστερα από υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε πειραματικό σύστημα (Fernandez-Vega V. et al., 2004). Παρόλα αυτά, σε ένα πλήρως μολυσματικό σύστημα μελέτης, θα μπορούσε να εξακριβωθεί εάν η διαδικασία όπου εμπλέκεται η p48 στα κυτταρικά μονοπάτια μεταφοράς αποτελεί μέρος ενός ενεργού μηχανισμού που απαιτείται για την αναπαραγωγή των νοροϊών. Μια τελευταία ιδιότητα που εμφανίζει η p48 μη δομική πρωτεΐνη και συνδέεται με τους κυτταρικούς μηχανισμούς μετατόπισης είναι η αλληλεπίδρασή της με τον ρυθμιστή SNARE πρωτεϊνών, τον VAP-A (Vesicle Associated Protein A) ο οποίος συμμετέχει στην

κυστιδιακή σύντηξη που διαμεσολαβούν SNARE πρωτεΐνες και ρυθμίζει την διαθεσιμότητα συστημάτων αγκυροβόλησης και σύντηξης (Weir M.L. et al., 1998). Δεδομένου ότι η αντιγραφή του γενώματος RNA των νοροϊών συμβαίνει στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες, η p48 συντάσσεται με την VAP-A για την αγκυροβόληση στην μεμβράνη των συμπλόκων αντιγραφής ή ακόμα η ίδια πρωτεΐνη ίσως λειτουργεί σαν μια πρωτεΐνη ικρίωμα για την συναρμολόγηση του ιικού συμπλόκου αντιγραφής.

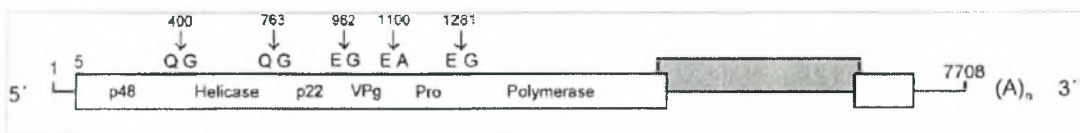
Όσον αφορά την p41 μη δομική πρωτεΐνη ή NTPase (τριφωσφατάση νουκλεοσιδίων), το μοτίβο πρόσδεσης νουκλεοτιδίων GPPGIGKT έχει βρεθεί να κωδικοποιείται από το γένωμα του calici ιού των αιλουροειδών σε αντίστοιχη θέση με εκείνου της 2C πρωτεΐνης των picorna ιών και σε συνδυασμό με την ύπαρξη στην p41 τριών ειδικών μοτίβων, αυτή η μη δομική πρωτεΐνη κατατάχθηκε στην υπερικογένεια των RNA ελικασών (Neill J.D., 1990). Σημειώνεται ότι για τους νοροϊούς, το προαναφερθέν μοτίβο αμινοξικής αλληλουχίας έχει την μορφή GxxGxGKT/S. Επίσης, πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν την ικανότητα της NTPase να υδρολύει ATP, αλλά και την ανικανότητά της να ξετυλίξει ένα τεχνητά κατασκευασμένο ετεροδιμερές μόριο RNA:DNA. Συμπερασματικά, η πρωτεΐνη αυτή έχει ενεργότητα φωσφατάσης τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων και μάλιστα για όλα τα είδη νουκλεοτιδίων, όμως δεν εμφανίζει ενεργότητα ελικάσης (Pfister T. and Wimmer E., 2001).

Η p22 είναι μια μικρή μη δομική πρωτεΐνη των νοροϊών της οποίας η λειτουργία παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Έχει αναφερθεί ότι είναι παρούσα κατά το πρωτεολυτικό μονοπάτι ως μέρος της p22-VPg-Pro ενδιάμεσης πρόδρομης πολυπρωτεΐνης (Belliot G. et al., 2003). Πιθανολογείται ότι η πρωτεΐνη p22 εμπλέκεται στην διαδικασία της μεμβρανικής εντόπισης του συμπλόκου αντιγραφής. Η ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας προβλέπει την ύπαρξη ενός υδροφοβικού τμήματος με την ιδιότητα σύνδεσης στη μεμβράνη κοντά στην κεντρική επικράτεια της πρωτεΐνης, όμως καμία πειραματική ένδειξη για μεμβρανική εντόπιση δεν έχει αναφερθεί.

Η VPg πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος περίπου ίσο με 15kDa και μια πρωταρχική της λειτουργία, η οποία έχει ήδη αναφερθεί, είναι ότι υποκαθιστά την έλλειψη 5'καλύπτρας από το γενωμικό και υπογενωμικό RNA των νοροϊών, στα οποία συνδέεται ομοιοπολικά στο 5'άκρο. Επίσης, η πρωτεΐνη αυτή κατέχει πιθανότατα κάποιο ρόλο στην αντιγραφή, ενώ απαιτείται και για την μετάφραση του ιικού RNA, καθώς συμμετέχει στη στρατολόγηση του ριβοσώματος του κυττάρου

ξενιστή στο ιικό RNA. Ο ρόλος αυτός της VPg υποδεικνύεται και από τα δεδομένα τα οποία έχουν προκύψει για αυτήν. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται άμεσα με τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF3, ενώ είναι παρούσα και σε σύμπλοκα με άλλους ευκαρυωτικούς παράγοντες έναρξης (eIFs). Η VPg παρέχει ένα πλεονέκτημα στον ιό, αφού έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τη μετάφραση των mRNA που απαιτούν διαφορετικούς eIFs για την συναρμολόγηση λειτουργικού συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης (Daughenbaugh K.F. et al., 2003).

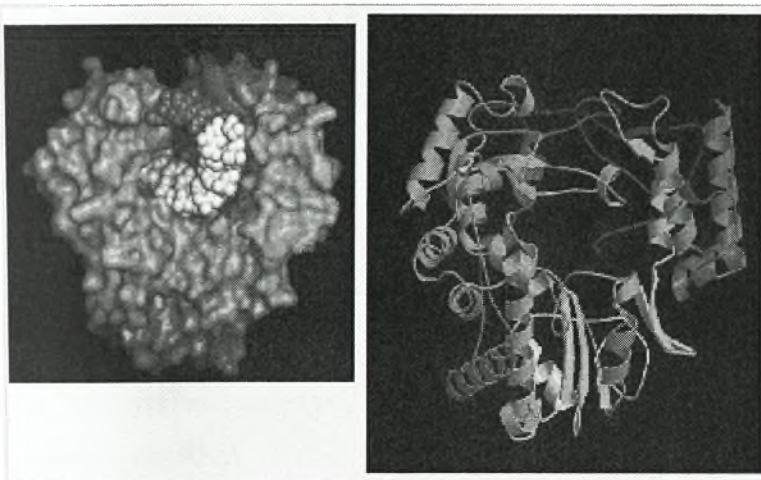
Η πρωτεάση των νοροϊών ή 3CL^{Pro}, όπως διαφορετικά ονομάζεται λόγω της αντιστοιχίας της με την 3C πρωτεάση των picornaviridae, είναι υπεύθυνη για την πρωτεολυτική ωρίμανση της πρόδρομης πολυπρωτεΐνης. Πειραματικές προσεγγίσεις με χρήση κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης αποκάλυψαν την ύπαρξη ενός πυρηνόφιλου καταλοίπου μέσα στο συντηρημένο μοτίβο αμινοξικής αλληλουχίας GDCCG, το οποίο είναι σύνηθες για τις chymotrypsin-like 3C πρωτεάσες (Liu B. et al., 1996). Ακόμα, προσδιορίστηκαν αμινοξικά κατάλοιπα απαραίτητα για τον σχηματισμό του ενεργού κέντρου και συγκεκριμένα προτάθηκε η ύπαρξη μιας καταλυτικής διάδας αποτελούμενης από τα αμινοξέα His30 και Cys139 (Someya Y. et al., 2002), καθώς επίσης η σημασία ενός καταλοίπου γλουταμικού οξέος στη θέση 1154, σύμφωνα με την αλληλουχία της ολόκληρης πολυπρωτεΐνης, για αποδοτική ενεργότητα πρωτεόλυσης (Hardy M.E. et al., 2002). Μια επιπλέον ιδιότητα έχει αποδοθεί στην πρωτεάση των νοροϊών και περιλαμβάνει την ικανότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης να πρωτεολύει την PABP (polyA binding protein) in vitro, κατέχοντας πιθανόν έναν άμεσο ρόλο στην αναστολή της σύνθεσης κυτταρικών πρωτεϊνών στα μολυσμένα κύτταρα, γεγονός σημαντικό για τον συντονισμό της έκφρασης των ιικών και κυτταρικών γονιδίων (Kuyumcu-Martinez M. et al., 2004).



Εικόνα 7: Θέσεις πρωτεολυτικής διάσπασης στο ORF1 του Southampton ιού (γενετικής ομάδας GI). Από Clarke I.N. and Lambden P.R., 2000.

Τελευταία αλλά εξίσου σημαντική, αναφέρεται η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp), η οποία κωδικοποιείται από το αμινοξύ 1281 έως το καρβοξυτελικό άκρο του ORF1 (η αρίθμηση είναι σύμφωνα με το γένωμα του Norwalk ιού). Είναι πιθανό η ενεργός μορφή του ενζύμου κατά την ιική μόλυνση να είναι η πρόδρομος πρωτεΐνη «πρωτεάση (Pro) – πολυμεράση (RdRp)», καθώς η

παρουσία της πρωτεάσης αυξάνει εντυπωσιακά την δραστικότητα της πολυμεράσης, όπως έχει διαπιστωθεί (Belliot G. et al., 2003). Από την άλλη, η κρυσταλλική δομή της RdRp των νοροϊών επέδειξε καταλυτικά και δομικά στοιχεία χαρακτηριστικά της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης άλλων θετικής πολικότητας RNA ιών, όπως και γενικότερα όλων των πολυμερασών και αυτά περιλαμβάνουν τις επικράτειες των δακτύλων, της παλάμης και του αντίχειρα. Αξιόλογες διαφοροποιήσεις της δομής του ενζύμου των νοροϊών ήταν εμφανείς στο καρβοξυτελικό τμήμα οι οποίες



Εικόνα 8: Χωροπληρωτικό μοντέλο της νοροϊκής RdRp (αριστερά) και διάγραμμα κορδέλας του ίδιου ενζύμου (δεξιά). Από www.lightsource.ca/media/norwalk.php και www.biomarker.cdc.go.kr.

περιλαμβάνουν πρωταρχικά την εντόπιση της επικράτειας αυτής στην οπή του ενεργού κέντρου κοντά στο καταλυτικό κατάλοιπο ασπαρτικού. Η συγκεκριμένη εντόπιση της μικρής αυτής επικράτειας ίσως λειτουργεί με

παρόμοιο τρόπο όπως και σε άλλους RNA ιούς, δημιουργώντας μια θηλιά για τη σταθεροποίηση των εκκινητών για την έναρξη της σύνθεσης RNA (Ng K.K. et al., 2004).

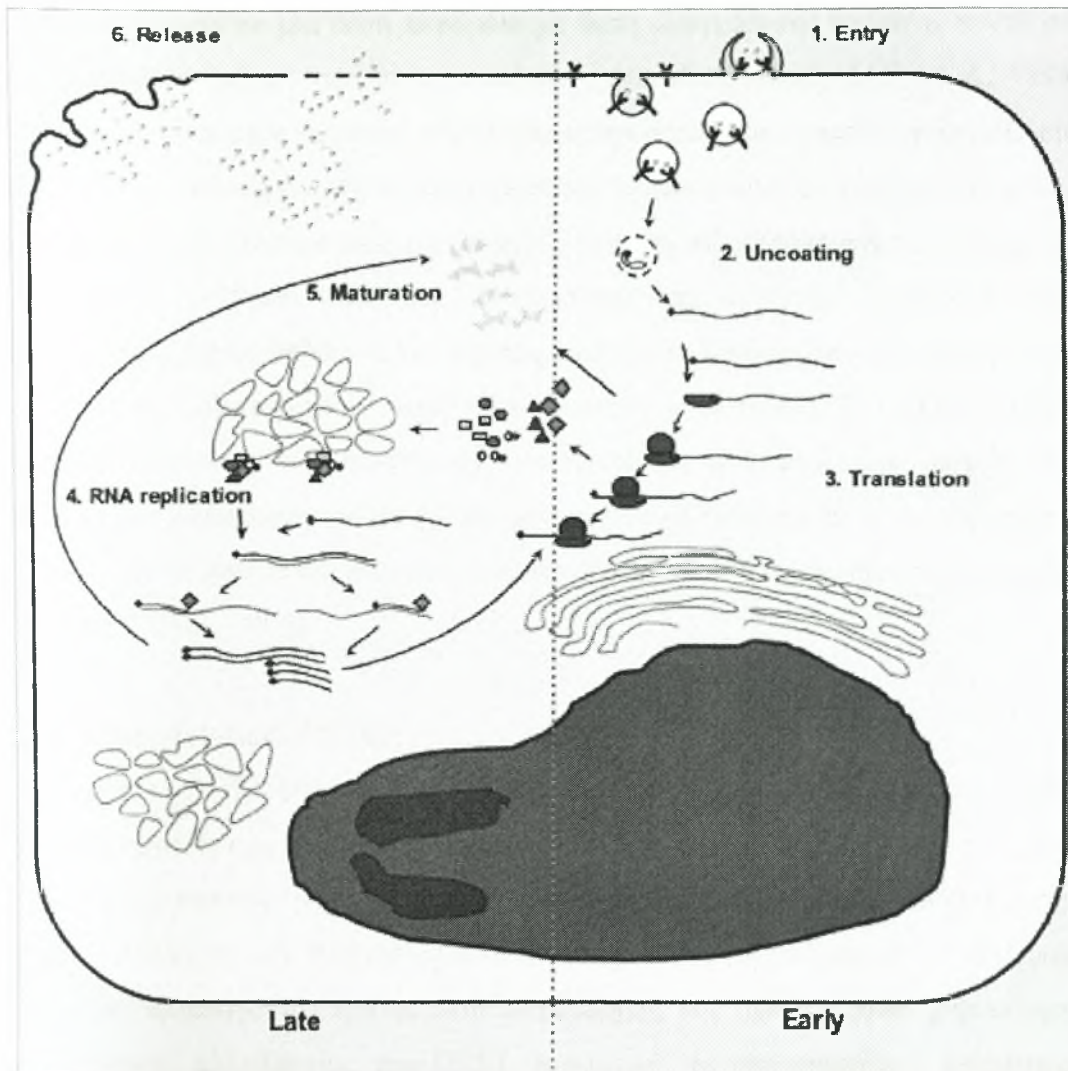
1.3.4 Κύκλος ζωής

Ο κύκλος ζωής των νοροϊών μοιράζεται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με άλλους RNA ιούς θετικής πολικότητας. Αρχικά, το ισοστάσιο πρέπει να αλληλεπιδράσει με το κύτταρο ξενιστή, πιθανότατα μέσω αλληλεπίδρασης του ιού με ειδικό υποδοχέα, ακολουθεί η είσοδος του ιικού σωματιδίου και επακόλουθα, το RNA γένωμα απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα (απέκδυση του ιού). Οι αρχικές αυτές διαδικασίες αλληλεπίδρασης του ιού με τα κύτταρα ξενιστές δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένες για τους νοροϊούς και τους calici ιούς γενικότερα, ωστόσο η αναγνώριση υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων είναι ένα απαραίτητο πρωταρχικό βήμα για την είσοδο του ιού. Συγκεκριμένα, η σύνδεση των νοροϊών με τα κύτταρα ξενιστές περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασή τους με ειδικούς

υδατανθρακικούς υποδοχείς, οι οποίοι έχουν βρεθεί στις βλεννογόνες επιφάνειες του εντέρου, καθώς επίσης στα ερυθροκύτταρα και σωματικά υγρά, όπως η σίελος (Marionneau S. et al., 2002).

Μετά την είσοδο του (sense) θετικής πολικότητας RNA, απαιτείται η αλληλεπίδραση της συνδεδεμένης στο γένωμα VPg πρωτεΐνης με την κυτταρική μηχανή μετάφρασης για την έναρξη της έκφρασης του ORF1 (Gutierrez-Escolano A.L. et al., 2000) με αποτέλεσμα την παραγωγή της πολυπρωτεΐνης και επακολούθως την πρωτεολυτική ωρίμανσή της στις μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Έπειτα, ξεκινά η σύνθεση RNA αρνητικής πολικότητας (antisense) με εκμαγείο το γενωμικό RNA και σημείο έναρξης το 3' άκρο του, ενώ ίσως συμμετέχουν και αλληλεπιδράσεις με κυτταρικές πρωτεΐνες. Με τη σειρά του, το antisense RNA λειτουργεί ως εκμαγείο για την παραγωγή δύο ειδών RNA μορίων, του γενωμικού RNA πλήρους αλληλουχίας και του υπογενωμικού RNA. Η μεταγραφή από το σημείο έναρξης του υπογενωμικού RNA έχει βρεθεί να απαιτεί 50 νουκλεοτίδια ανοδικά του σημείου αυτού για πλήρη δραστηριότητα πολυμεράσης σε *in vitro* μελέτες (Morales M. et al., 2004). Το υπογενωμικό RNA, το οποίο βρίσκεται πλέον σε περίσσεια, αποτελεί για την μεταφραστική μηχανή ένα δικοιστρονικό μήνυμα για την παραγωγή των δύο δομικών ιικών πρωτεϊνών. Η VP2 πρωτεΐνη παράγεται μόλις στο 20% των επιπέδων παραγωγής της VP1 και η ρύθμιση της μετάφρασης του ORF3 προφανώς περιλαμβάνει κάποιον μηχανισμό τερματισμού και επανεκκίνησης στον οποίο αλληλουχίες κοντά στο τέλος της κωδικοποιούσας περιοχής για την VP1 περιέχουν κάποιο ειδικό σήμα για την μετάφραση του επόμενου κοιστρονικού μηνύματος που κωδικοποιεί για την VP2 πρωτεΐνη (Meyers G., 2003). Όπως σε όλους τους θετικής πολικότητας RNA ιούς, η αντιγραφή του ιικού γενώματος συνδέεται με τις κυτταρικές μεμβράνες του ξενιστή.

Τα επόμενα στάδια της συναρμολόγησης του ιικού σωματιδίου, της ωρίμανσης και της απελευθέρωσης από το κύτταρο ξενιστή δεν είναι πλήρως κατανοητά. Έχει αποδειχθεί ότι τα VPg-συνδεδεμένα γενωμικά και υπογενωμικά RNA μόρια δεν συσκευάζονται μαζί στο ίδιο ιοσωμάτιο, αφού βρέθηκε να υπάρχει το κάθε είδος μορίου σε σωματίδια διαφορετικών πυκνοτήτων, σε πειραματικές προσεγγίσεις (Neill J.D., 2002). Για την παραγωγή μολυσματικών ιών είναι απαραίτητη η VP2 μη δομική πρωτεΐνη, ενώ η απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων χρησιμοποιεί κάποιον μηχανισμό που συνδέεται με την μεταβολή μέσω απόπτωσης των κυτταρικών μεμβρανών.



Εικόνα 9: Κύκλος ζωής των νοροϊών. Απεικονίζονται τα 6 στάδια της πρώιμης και όψιμης φάσης. Από Sosnovtsev S.V. et al., 2005.

1.3.5 Αντιγονικά χαρακτηριστικά

Οι αντιγονικές περιοχές των νοροϊών εδράζονται στην κύρια δομική πρωτεΐνη, την VP1. Από τις αρχικές μελέτες σε εθελοντές με τον ιό Norwalk, όπου τα διηθήματα κοπράνων από ασθενείς (αντιγόνα) αναμίχθηκαν με τα αντισώματα από τον ορό ατόμων σε ανάρρωση, ανοσοκατακρημνίστηκαν τόσο η VP1 όσο και μια διαλυτή πρωτεΐνη με εκτιμώμενα μοριακά βάρη περίπου 59 και 30kDa, αντίστοιχα. Η ύπαρξη της μικρότερης διαλυτής πρωτεΐνης ίσως εξηγείται από την μεταγενέστερη παρατήρηση της ύπαρξης μιας 32kDa διαλυτής πρωτεΐνης σε βιολογικό υλικό κοπράνων από μολυσμένα με τον Norwalk ιό άτομα. Η διαλυτή αυτή πρωτεΐνη, λοιπόν, φάνηκε να αποτελεί προϊόν πρωτεολυτικής διάσπασης το οποίο προέρχεται

από πρωτεόλυση σε μια θέση παρόμοια με θέση αναγνώρισης θρυψίνης κοντά στο καρβοξυτελικό τμήμα της κύριας καψιδιακής πρωτεΐνης (Hardy M.E. et al., 1995). Εκτενέστερη ανάλυση των αντιγονικών χαρακτηριστικών των νοροϊών παρακολουθείται τόσο από την αδυναμία τους να αναπαραχθούν εργαστηριακά σε κυτταροκαλλιέργεια όσο και από την έλλειψη ενός ενοποιημένου συστήματος ορολογικής ανάλυσης των ιών αυτών. Βέβαια, διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις χρησιμοποιώντας ανοσοδοκιμές έχουν υποδείξει την ύπαρξη αρκετών διαφορετικών ορότυπων για τους νοροϊούς που αντιστοιχούν στους διαφορετικούς γενότυπους. Η έκφραση rVLPs αντιπροσωπευτικών των γενότυπων αυτών και η σύγκριση των μεταξύ τους αντιγονικών ιδιοτήτων ίσως οδηγήσει στην ανάπτυξη ενδιάμεσων συστημάτων αντιγονικής ταξινόμησης έως ότου γίνουν διαθέσιμες δοκιμές οροεξουδετέρωσης (Kamata K. et al., 2005).

1.3.6 Ετερογένεια και Εξέλιξη

Οι νοροϊοί αποτελούν μια εξαιρετικά ετερογενή ομάδα ιών με μεγάλη γενετική ποικιλομορφία, η οποία τους επιτρέπει, όπως συμβαίνει με όλους τους RNA ιούς, να εξελίσσονται με γοργό ρυθμό. Διάφορες μελέτες μοριακής επιδημιολογίας έχουν αποκαλύψει την γενετική ετερογένεια των κυκλοφορούντων στον πληθυσμό στελεχών, καταλήγοντας επίσης στην παρατήρηση της σχετικής συντηρητικότητας της γενετικής αλληλουχίας του ORF1 συγκριτικά με την σημαντικά μεγαλύτερη ποικιλομορφία της αλληλουχίας των ORF2 και ORF3. Η παρατήρηση αυτή σαφώς υποδεικνύεται από την ύπαρξη αντιγονικής πίεσης στις κωδικοποιούσες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών. Η γενετική παρέκκλιση των κυκλοφορούντων στον πληθυσμό στελεχών αναδεικνύεται αντιπροσωπευτικά σε μια μοριακή επιδημιολογική μελέτη των GI.4 στελεχών νοροϊών, κυρίαρχων σε παγκόσμιο επίπεδο στις αρχές της δεκαετίας του 2000. Στη μελέτη αυτή, η σύγκριση γονιδιακών και αμινοξικών αλληλουχιών μεταξύ των στελεχών αποκάλυψε μια αμινοξική ένθεση στην P2 υποεπικράτεια της VP1 κύριας δομικής πρωτεΐνης, υποδεικνύοντας μια πιθανή αλλαγή στον αντιγονικό φαινότυπο (Dingle K.E., 2004). Βέβαια, γενετική ετερογένεια έχει εντοπιστεί και σε άλλες περιοχές του γενώματος, όπως την περιοχή της πολυμεράσης, σε συνδυασμό ωστόσο με ταυτόχρονη παρέκκλιση της αλληλουχίας της VP1.

Ο γοργός εξελικτικός ρυθμός αυτών των RNA ιών, όπως αντανάκλαται από την σημαντική γενετική τους ετερογένεια, οφείλεται τόσο στις μεταλλάξεις που

συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του ιικού RNA όσο και στον μοριακό ανασυνδυασμό ανάμεσα σε δύο ιικά γενώματα σε περίπτωση ταυτόχρονης μόλυνσης. Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή του ιικού RNA οφείλεται στην επιρρεπή σε λάθη RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση η οποία υπολογίζεται ότι ενσωματώνει 10^{-4} έως 10^{-5} νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής. Σε συνδυασμό με την έλλειψη επιδιορθωτικής ενεργότητας του ιικού ενζύμου αντιγραφής, αυτές οι σημειακές μεταλλάξεις, αν δεν είναι σιωπηλές, οδηγούν σε αμινοξικές αλλαγές. Κάτι τέτοιο αποδείχθηκε όταν βρέθηκαν 32 αμινοξικές αλλαγές στην καψιδιακή πρωτεΐνη ενός στελέχους νοροϊού, το οποίο είχε εξαπλωθεί για πάνω από ένα χρόνο από ανοσοκατεσταλμένο ασθενή (Nilsson M. et al., 2003). Από την άλλη, ο ανασυνδυασμός στελεχών επιτρέπει την παραγωγή και εξάπλωση επωφελών χαρακτηριστικών και την εξάλειψη «φθοροποιών» γονιδίων, παρέχοντας έτσι ένα εξελικτικό πλεονέκτημα στο ανασυνδυασμένο στέλεχος. Αν και ο ακριβής μηχανισμός του ανασυνδυασμού δεν είναι γνωστός, πιστεύεται ότι σε ταυτόχρονη μόλυνση, η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση κατά την αντιγραφή μεταπηδά από το ένα RNA μόριο σε ένα άλλο εξαιτίας της παρόμοιας αλληλουχίας των δύο μορίων που επιτρέπει την αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Ταυτόχρονη μόλυνση σε ένα άτομο ή ένα κρούσμα με πάνω του ενός στελέχους έχει παρατηρηθεί, ενώ έχει καταγραφεί και σημαντική γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών που εμφανίζονται σε μια δεδομένη «κλειστή» κοινότητα, όπως ένα παιδιατρικό νοσοκομείο (Kirkwood C.D. et al., 2005). Επομένως, τέτοιες συνθήκες ταυτόχρονης μόλυνσης με ποικιλόμορφα στελέχη επιτρέπουν τον γενετικό ανασυνδυασμό μεταξύ των RNA γενωμάτων. Σημαντικές πηγές ανασυνδυασμένων στελεχών θα μπορούσαν επίσης να αποτελούν τα μολυσμένα θαλασσινά και το νερό. Σε μια έρευνα για τον εντοπισμό caliciϊών σε αγορά στρειδιών, ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες νοροϊών από στέλεχη που έχουν βρεθεί σε βοοειδή και χοίρους, υποδεικνύοντας μια πιθανή ταυτόχρονη μόλυνση ύστερα από την κατανάλωση τέτοιων μολυσμένων θαλασσινών (Costantini V. et al., 2006). Τέλος, σε μελέτη ανασυνδυασμένων νοροϊών, προσδιορίστηκαν κάποια γενωμικά σημεία αναστολής του ανασυνδυασμού στην περιοχή ανάμεσα στο ORF1 και το ORF2, επιβεβαιώνοντας τη σημασία της περιοχής αυτής για το φαινόμενο, ωστόσο περαιτέρω μελέτη απαιτείται για την εκτενή ανάλυση του μοριακού μηχανισμού και του ρόλου του ανασυνδυασμού στους νοροϊούς (Ambert-Balay K. et al., 2005).

1.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

1.4.1 Μολυσματικός κύκλος

Οι νοροϊοί εισέρχονται στο σώμα κυρίως μέσω της στοματικής οδού. Τα ιικά σωματίδια είναι ανθεκτικά σε όξινες συνθήκες, γεγονός που τους επιτρέπει να επιβιώσουν από το πέρασμά τους στον στόμαχο. Ακόμα, έμμεσα στοιχεία από επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι οι ιοί αυτοί μπορούν να εισέλθουν επίσης μέσω αερολυμάτων, όπως εκείνα που παράγονται κατά τον εκρηκτικό έμετο (υπό μορφή ρουκέτας) που εμφανίζεται συχνά κατά τη διάρκεια της ασθένειας (Marks P.J. et al., 2003). Η περίοδος επώασης του ιού μέχρι την εμφάνιση των συμπτωμάτων, μπορεί να διαρκέσει από 10 έως 51 ώρες με μέσο όρο τις 24 ώρες, όπως καταγράφηκε σε μελέτες εθελοντών με τον Norwalk ιό (Blacklow N.R. et al., 1972). Σε φυσικά προκλημένες περιπτώσεις νοροϊκής γαστρεντερίτιδας, στα 20 από τα 22 κρούσματα που μελετήθηκαν, η επώαση διήρκησε από 24 έως 48 ώρες με εύρος από 4 έως 77 ώρες (Kaplan J.E. et al., 1982).

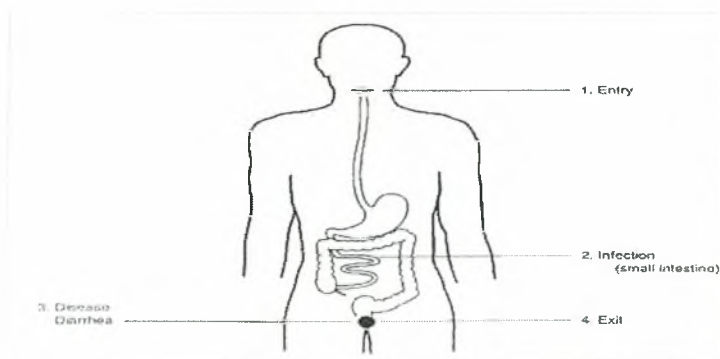
Όσον αφορά τη θέση της αρχικής αναπαραγωγής του ιού, πιστεύεται πως συμβαίνει στην άνω εντερική οδό. Βιοψίες νήστιδας από εθελοντές που παρουσίασαν γαστρεντερίτιδα μετά από στοματική χορήγηση των Norwalk και Hawaii ιών έδειξαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις (Agus S.G. et al., 1973). Παρατηρήθηκε άμβλυνση και διεύρυνση των λαχνών στο εγγύς λεπτό έντερο αν και ο βλενογόνος παρέμεινε ιστολογικά άθικτος. Επίσης, παρατηρήθηκε διείσδυση μονοπύρηνων λευκοκυττάρων και κενотоποίηση κυτταροπλάσματος. Τα επιθηλιακά κύτταρα, όπως παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία εκπομπής, ήταν άθικτα, αλλά παρατηρήθηκε βράχυνση των μικρολαχνών. Βιοψίες οι οποίες λήφθηκαν κατά τη φάση ανάρρωσης ήταν φυσιολογικές, ενώ μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας δεν εντοπίστηκαν ιοί στα επιθηλιακά κύτταρα του βλενογόνου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η χαρακτηριστική αλλοίωση της νήστιδας παρατηρήθηκε και στους εθελοντές στους οποίους χορηγήθηκε Norwalk και Hawaii ιός αλλά δεν νόσησαν (Schreiber D.S. et al., 1973). Σε εθελοντές, όμως, για πρόκληση γαστρεντερίτιδας από τον ιό Norwalk, δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές αλλοιώσεις στον γαστρικό πυθμένα, το ιγμόρειο άντρο ή τον ορθικό βλενογόνο (Widerlite L. et al., 1975).



Εικόνα 10: (Α) Φυσιολογική εμφάνιση ιστού νήστιδας από βιοψία ασθενούς πριν μολυνθεί με ιό Norwalk, (Β) Αλλοίωση εντερικών λαχνών σε βιοψία ιστού νήστιδας από τον ίδιο εθελοντή. Από Agus S.G. et al 1973.

Επιπροσθέτως, σε ασθενείς με νοροϊκή γαστρεντερίτιδα παρατηρήθηκε μια παροδική δυσαπορρόφηση λιπών, D-ξυλόζης και λακτόζης. Τα επίπεδα των ενζύμων τρεχαλάση και αλκαλική φωσφατάση στις ψυκτροειδείς παρυφές του λεπτού εντέρου ήταν μειωμένα σε σύγκριση με τις φυσιολογικές τιμές, ενώ η ενεργότητα αδενυλικής κυκλάσης στη νήστιδα δεν επηρεάστηκε. Δεν επηρεάστηκε επίσης η γαστρική έκκριση υδροχλωρικού οξέος, πεψίνης και ενδογενούς παράγοντα, όμως παρατηρήθηκε μια καθυστέρηση στην εκκένωση του στομάχου σε ασθενείς με την τυπική αλλοίωση του βλενογόννου της νήστιδας. Αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός, θεωρείται πως αυτή η ανώμαλη γαστρική λειτουργία είναι υπεύθυνη για την αίσθηση ναυτίας και εμέτου των νοροϊκών ασθενών (Meeroff J.C. et al., 1980). Από την άλλη, οι πληροφορίες για τον κυτταρικό και ιστικό τροπισμό των νοροϊών είναι περιορισμένες. Ραδιοσημασμένα rVLPs δεσμεύονται σε ποικίλους τύπους κυττάρων, αν και σε ορισμένα κύτταρα εσωτερικεύονται με χαμηλή απόδοση (White L.J. et al., 1996).

Μετά την αναπαραγωγή των ικών σωματιδίων, οι ιοί απελευθερώνονται από το σώμα μέσα από την εντερική οδό στα κόπρανα. Επίσης, οι νοροϊοί έχουν ανιχνευθεί στον έμετο μέσω IEM και αντίστροφης μεταγραφής – αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) (Kilgore P.E. et al., 1996). Η IEM ανίχνευσε την διάδοση των ιών από νοσούντα άτομα ως μια διαδικασία ταυτόχρονη με την εκδήλωση της ασθένειας που δεν ξεπερνά τις 72 ώρες από τα αρχικά συμπτώματα. Ωστόσο, πιο ευαίσθητες μοριακές τεχνικές αποκάλυψαν ότι η διάδοση αυτή μπορεί να ξεκινήσει πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων και να συνεχιστεί και μετά από αυτά σε μια συνολική περίοδο έως δύο εβδομάδων (Okhuysen P.C. et al., 1995).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της πορείας μόλυνσης. Από www.netlibrary.com.

1.4.2 Κλινική εκδήλωση της ασθένειας

Απουσία άλλων παραγόντων, η γαστρεντερίτιδα από νοροϊό είναι ήπια και αυτοπεριοριζόμενη. Η εκδήλωση της ασθένειας είναι απότομη, συνήθως μέσα σε 24 έως 28 ώρες μετά την έκθεση και η διάρκειά της είναι σχετικά μικρή, από 12 μέχρι 60 ώρες. Περιστασιακά, η ασθένεια μπορεί να είναι δριμεία, κυρίως σε άτομα με άλλη ασθένεια και να απαιτείται ιατρική παρέμβαση (Mattner F. et al., 2006). Σε 38 κρούσματα νοροϊκής γαστρεντερίτιδας που μελετήθηκαν, οι ασθενείς εμφάνιζαν κατά μέσο όρο τα εξής συμπτώματα: ναυτία (79%), έμετο (69%), διάρροια (66%), κοιλιακές συσπάσεις (30%), πονοκέφαλο (22%), πυρετό (37%), ρίγος (32%), μυαλγίες (26%) και ερεθισμένο λαιμό (18%). Αιματούχα κόπρανα δεν αναφέρθηκαν. Ο έμετος εμφανιζόταν συχνότερα από τη διάρροια στα παιδιά, ενώ στους ενήλικες παρατηρήθηκε το αντίστροφο (Karlan J.E. et al., 1982). Εκτός των προαναφερθέντων συμπτωμάτων, σε μια άλλη μελέτη με εθελοντές ασθενείς, αναφέρθηκε και παροδική λεμφοπενία, η οποία αποδόθηκε στην ανακατανομή των λευκοκυττάρων της κυκλοφορίας στη θέση της ιικής μόλυνσης στο λεπτό έντερο (Dolin R. et al., 1976). Αξίζει τέλος, να σημειωθεί ότι η υψηλή συχνότητα εκρηκτικού εμέτου στους ενήλικες είναι ένα κλινικό χαρακτηριστικό της νοροϊκής ασθένειας, το οποίο την διαχωρίζει από άλλες νόσους που προκαλούνται από εντερικούς ιούς ή βακτηριακά παθογόνα, όπως *Salmonella*, *Shigella* και *S.aureus*.

1.4.3 Ανοσοποίηση ξενιστή

Η ανοσία έναντι νοροϊών είναι ανεπαρκώς μελετημένη και δεν φαίνεται να ομοιάζει με κάποιο γνωστό πρότυπο άλλων ιών. Οι ενήλικες επιδεικνύουν υψηλό βαθμό ευπάθειας στην ασθένεια είτε εκείνη προκαλείται φυσικά είτε πειραματικά. Πάνω από το 80% και 50% των ενηλίκων που μολύνθηκαν αντίστοιχα φυσικά ή εθελοντικά με νοροϊό νόσησαν (Karlan J.E. et al., 1982). Καθώς εξουδετερωτικά αντισώματα για νοροϊούς από τον ορό αίματος ή τις εντερικές εκκρίσεις δεν μπορούν να μετρηθούν σε κυτταροκαλιέργεια, η πλειοψηφία των πληροφοριών για την ανοσία έναντι αυτών των ιών προέρχεται από μελέτες με εθελοντικά μολυσμένα άτομα. Τέτοιες μελέτες έχουν καταδείξει δύο είδη ανοσίας, την βραχυπρόθεσμη και την μακροπρόθεσμη (Parrino T.A. et al., 1977). Η βραχυπρόθεσμη ανοσία ακολουθεί το παραδοσιακό πρότυπο και προφανώς είναι οροτυπικά ειδική. Έτσι, εθελοντές οι οποίοι νόσησαν από τον ιό Norwalk είναι ανθεκτικοί σε δεύτερη μόλυνση με τον ίδιο ιό, 6 με 14 εβδομάδες αργότερα, όμως δεν συμβαίνει το ίδιο σε περίπτωση μόλυνσης

στο ίδιο χρονικό διάστημα με άλλο στέλεχος, οροτυπικά διακριτό, όπως ο ιός Hawaii. Η βραχυπρόθεσμη ανοσία είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της νοροϊκής μόλυνσης καθώς οι νοσήσαντες παραμένουν ευαίσθητοι σε επόμενη μόλυνση σε όλη τη ζωή τους, σε αντίθεση με άλλους παράγοντες όπως οι rotavirus που προκαλούν ισχυρή ανοσία και έτσι η ασθένεια εμφανίζεται κυρίως σε μικρά παιδιά. Από την άλλη, η μακροπρόθεσμη ανοσία παρεκκλίνει από το παραδοσιακό πρότυπο. Εθελοντές οι οποίοι μολύνθηκαν με τον Norwalk ιό σε ένα διάστημα 27 έως 42 μηνών και στους οποίους ακολούθησε δεύτερη μόλυνση, παρουσίασαν δύο διαφορετικά πρότυπα ανθεκτικότητας. Οι μισοί παρουσίασαν γαστρεντερική νόσο που ακολούθησε την αρχική μόλυνση, ύστερα από επαναμόλυνση 27 έως 42 μήνες αργότερα. Αντίθετα, οι άλλοι μισοί δεν νόσησαν ύστερα από την δεύτερη μόλυνση στο ίδιο διάστημα με τους πρώτους, ενώ παρέμειναν ανθεκτικοί και σε επόμενη μόλυνση 31 με 34 μήνες αργότερα. Εξήγηση για την διαφοροποίηση ως προς την ευαισθησία σε δεύτερη μόλυνση ανάμεσα στις δύο ομάδες δεν εξήχθη από ορολογικές μεθόδους μέτρησης αντισωμάτων έναντι του Norwalk ιού στον ορό πριν τη δεύτερη μόλυνση με χρήση IEM και ραδιοανοσοδοκιμής (RIA). Παραδόξως, στους εθελοντές που δεν νόσησαν δεν ανιχνεύθηκαν αντισώματα στα δείγματα ορού πριν τη μόλυνση ούτε παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη ορολογική απάντηση μετά τη μόλυνση, ωστόσο στην άλλη ομάδα παρατηρήθηκε η αναμενόμενη ορολογική απάντηση μετά από κάθε μόλυνση. Συμπερασματικά, η ανθεκτικότητα στην ασθένεια δεν αντιστοιχεί στην ύπαρξη ή μη αντισωμάτων έναντι του ιού Norwalk στον ορό. Έχει παρατηρηθεί, όμως, ότι η ανάπτυξη μιας γρήγορης IgA ανοσολογικής απόκρισης στον εντερικό βλενογόνο, σχετίζεται με την ανοσία σε νέα μόλυνση από τον ίδιο ιό (Lindesmith L. et al., 2003).

Εξαιρετική σημασία στην ανάπτυξη ανοσίας έναντι των νοροϊών ίσως αποδειχθεί ότι κατέχουν γενετικοί παράγοντες. Για χρόνια εικάζεται ότι η γενετικά καθορισμένη ποικιλότητα στους ικούς υποδοχείς της εντερικής οδού είναι υπεύθυνη για την μακροπρόθεσμη ανοσία. Μελέτες έχουν υποδείξει την ύπαρξη ενός μηχανισμού ο οποίος περιλαμβάνει τα ABH υδατανθρακικά αντιγόνα τα οποία είναι παρόντα και στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Tan M. and Jiang X., 2005). Η ανακάλυψη της ικανότητας σύνδεσης των Norwalk VLPs στα αντιγόνα της επιφάνειας των κυττάρων του αίματος που εκφράζονται στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπου, υπέδειξε τον παραπάνω μηχανισμό (Marionneau S. et al., 2002). Η συσχέτιση των αντιγόνων των κυττάρων του αίματος με την

ευαισθησία στον Norwalk ιό επιβεβαιώθηκε και σε περίπτωση χορήγησης του ιού στοματικά σε άτομα, από τα οποία νόσησαν εκείνα που εξέφραζαν στην επιφάνεια των κυττάρων τους το αντιγόνο H, ενώ όσοι δεν εξέφραζαν το αντιγόνο αυτό ήταν ανθεκτικοί στη μόλυνση. Επίσης, όσοι εκφράζουν το B αντιγόνο εμφανίζουν σπάνια μόλυνση και ασθένεια από τον παραπάνω ιό (Hutson A.M. et al., 2002). Ωστόσο, αντίθετα με την περίπτωση του Norwalk ιού, η μόλυνση εθελοντών με τον ιό Snow Mountain δεν φάνηκε να σχετίζεται με την ύπαρξη ή όχι των αντιγόνων ABH για την εκδήλωση ασθένειας (Lindesmith L. et al., 2005). Συμπερασματικά, είναι πιθανή η ύπαρξη ποικιλότητας ανάμεσα στους νοροϊούς στην αναγνώριση υδατανθρακικών δομών στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή και σίγουρα, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για τη σημασία των ABH αντιγόνων στη φυσική ιστορία των ιών αυτών.

Τέλος, αναφέρεται πως οι νοροϊοί συνδέονται με παρατεταμένη μόλυνση ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, επισημαίνοντας τη σημασία της κατάστασης ανοσίας ενός ατόμου για την εκδήλωση νοροϊικής νόσου. Για παράδειγμα, ασθενής με μεταμόσχευση καρδιάς και χρόνια διάρροια, ο οποίος ακολουθούσε ανοσοκατασταλτική αγωγή, βρέθηκε ότι διέδιδε ένα GIΙ στέλεχος για πάνω από δύο χρόνια, ενώ παιδιά προσβεβλημένα από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) με διαρροϊκή νόσο φαίνεται πως διατρέχουν υψηλό κίνδυνο μόλυνσης από νοροϊό (Nilsson M. et al., 2003).

1.5 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι νοροϊοί αποτελούν έναν από τους κυριότερους παράγοντες της επιδημικής γαστρεντερίτιδας σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς επίσης την πιο σημαντική αιτία κρουσμάτων μη βακτηριακής γαστρεντερίτιδας. Σε μια ανάλυση, από τα 233 κρούσματα μη βακτηριακής γαστρεντερίτιδας που καταγράφηκαν από τον Ιούλιο του 1997 έως τον Ιούνιο του 2000, τα 217 (93%) σχετίζονταν με νοροϊό (Fankhauser R.L. et al., 2002). Σε μια μεγαλύτερη ανάλυση 3714 κρουσμάτων από την Ευρώπη μεταξύ του 1995 και 2000, το 85% των περιπτώσεων σχετίζονταν με νοροϊό (Lorphan B.A. et al., 2003). Τα κρούσματα μπορεί να διαφέρουν σε μέγεθος, περιλαμβάνοντας από μια οικογένεια μέχρι χιλιάδες προσβεβλημένων ατόμων, ανάλογα με τις τοπολογικές συνθήκες όπου εμφανίζονται. Είναι εντυπωσιακό ότι ένα κρούσμα σε σχολείο της Ιαπωνίας περιλάμβανε έναν εκτιμώμενο αριθμό προσβεβλημένων παιδιών ίσο με 5 εκατομμύρια (Matsuno S. et al., 1997).

Τα περισσότερα άτομα τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις αναπτυγμένες χώρες δυνητικά μπορούν να μολυνθούν από νοροϊό πριν την ενηλικίωση, γεγονός που αντανακλά την παγκόσμια κατανομή και την ενδημική φύση των ιών αυτών. Μελέτες ανίχνευσης αντισωμάτων για GI και GII νοροϊούς, κατέδειξαν ότι η εξάπλωση των αντισωμάτων για κάθε ομάδα με βάση την ηλικία αυξήθηκε χαρακτηριστικά πιο βαθμιαία στις αναπτυγμένες σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες χώρες (Jiang X. et al., 2000). Η εξάπλωση, ακόμα, των αντισωμάτων έναντι των GII νοροϊών είναι μεγαλύτερη από εκείνη για τους GI, γεγονός που καταδεικνύει την επικράτηση των GII στελεχών στην κυκλοφορία στον πληθυσμό.

Οι νοροϊοί ευθύνονται για περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας σε άτομα όλων των ηλικιών, αν και τα περισσότερα κρούσματα εμφανίζονται σε συνθήκες όπου περιλαμβάνονται ηλικιωμένοι και παιδιά. Θεωρείται ότι η σημασία τους στους παιδιατρικούς πληθυσμούς είναι μεγάλη με κυρίαρχο ρόλο στην οξεία γαστρεντερίτιδα, ακολουθώντας τους rota ιούς. Μεγάλη σημασία έχει επίσης η μόλυνση από νοροϊούς στους ηλικιωμένους που ζουν σε ιδρύματα ή κλινικές. Ουσιαστικά, η εκτίμηση της ηλικιακής κατανομής της ασθένειας στηρίζεται στην ύπαρξη ή μη κάποιου προγράμματος επιτήρησης στα ιατρεία ή την κοινότητα και στο τμήμα του πληθυσμού που συμμετέχει σε αυτό.

Τέλος, όσον αφορά την εποχικότητα της ασθένειας, φαίνεται ότι αυτή κορυφώνεται τους χειμερινούς μήνες αν και δεν αποκλείονται περιπτώσεις σποραδικών κυρίως περιπτώσεων οξείας γαστρεντερίτιδας σε όλη την περίοδο του έτους. Εξάλλου, από τον πρώτο χαρακτηρισμό της νοροϊικής νόσου ως τη «χειμερινή εμετική ασθένεια» ξεκαθαρίστηκε η εποχικότητά της. Στην Ευρώπη, τα κρούσματα της ασθένειας αρχίζουν να αυξάνονται τον Οκτώβριο ή Νοέμβριο, κορυφώνονται τον Ιανουάριο και ελαχιστοποιούνται τον Μάιο με Ιούνιο (Mounts A.W. et al., 2000).

1.6 ΜΕΤΑΔΟΣΗ

1.6.1 Πορείες μόλυνσης

Μελέτες σε εθελοντές κατέδειξαν ότι οι ιοί Norwalk, Hawaii, Montgomery Country και Snow Mountain προκάλεσαν γαστρεντερική νόσο όταν η χορήγηση έγινε από τη στοματική οδό, με μια μέση περίοδο επώασης 24 ωρών (Johnson P.C. et al., 1990). Μετάδοση μέσω της αναπνευστικής οδού, από την άλλη, δεν έχει τεκμηριωθεί για αυτούς τους ιικούς παράγοντες παρόλο που ίσως συμβαίνει σε συγκεκριμένες συνθήκες (Marks P.J. et al., 2000). Ακόμα, νοροϊός ανιχνεύθηκε στον έμετο από

προσβεβλημένους εθελοντές, γεγονός που αποδεικνύει μια πηγή μετάδοσης σημαντική σε ορισμένες συνθήκες. Όμως, ρινοφαρυγγικές εκπλύσεις από εθελοντή με πειραματικά προκληθείσα γαστρεντερίτιδα δεν προκάλεσαν ασθένεια σε άλλους εθελοντές (Dolin R. et al., 1972).

1.6.2 Τρόποι μετάδοσης

Οι νοροϊοί προκαλούν επιδημίες γαστρεντερίτιδας εξαιτίας της γρήγορης και εύκολης μετάδοσής τους. Συνήθως, τα κρούσματα της ασθένειας προκαλούνται από περισσότερους από έναν τρόπο μετάδοσης και είναι δύσκολο να αποδοθούν σε έναν μόνο από αυτούς. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν έξι κύριοι τρόποι μετάδοσης οι οποίοι περιγράφονται παρακάτω.

A. Μετάδοση από άτομο σε άτομο

Αυτός ο τρόπος μετάδοσης είναι ο πιο κοινός για την εμφάνιση κρούσματος γαστρεντερίτιδας και περιλαμβάνει δύο πορείες. Η μία αποτελεί την κοπρανο – στοματική οδό και η άλλη τον σχηματισμό αερολυμάτων που ακολουθεί τον εκρηκτικό έμετο των ασθενών. Η αποτελεσματικότητα της πρώτης πορείας στην μετάδοση της ασθένειας οφείλεται στην έκκριση μικρών μολυσματικών δόσεων του ιού στα κόπρανα των ασθενών από περίπου 12 ώρες πριν μέχρι και 2 εβδομάδες μετά την εκδήλωση της νόσου. Επίσης, κρούσματα γαστρεντερίτιδας σε συνθήκες «κλειστής κοινότητας» έχουν αποδοθεί στη μετάδοση του νοροϊού μέσω της δημιουργίας αερολυμάτων. Ένα παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση εμέτου ενός ατόμου το οποίο δειπνούσε σε ένα εστιατόριο (Marks P.J. et al., 2000). Ανάλυση αλληλουχίας απέδειξε την ύπαρξη νοροϊκών στελεχών στα κόπρανα των δειπνούντων ατόμων που νόσησαν περίπου 36 ώρες αργότερα. Περίπτωση μόλυνσης φαγητού αποκλείστηκε και τα άτομα τα οποία βρίσκονταν κοντά στον δειπνούντα που εκδήλωσε έμετο διέτρεχαν υψηλό κίνδυνο μόλυνσης. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με έλλειψη δυνατότητας μετάδοσης νοροϊών μέσω του αναπνευστικού συστήματος, υποδεικνύουν ως αιτία της διάδοσης της μόλυνσης την κατάποση του αερολυμένου ιού μέσω εισπνοής του και επακόλουθης μόλυνσης του εντέρου.

B. Μετάδοση μέσω τροφής

Η εκτίμηση της σημασίας της τροφικής μετάδοσης των νοροϊών διαφέρει από χώρα σε χώρα. Ανεξάρτητα από τις διαφορές αυτές, η μόλυνση μέσω τροφής αποτελεί ένα σημαντικό μέσο μετάδοσης στη σύγχρονη πραγματικότητα όπου η παγκοσμίου επιπέδου διακίνηση τροφίμων επιτρέπει στους ιούς να διαδίδονται σε

ευρή πληθυσμό. Τυπικά, τα μέσα μετάδοσης της ιικής μόλυνσης μέσω τροφής εμπίπτουν σε τρεις μορφές, τα μολυσμένα δίθυρα μαλάκια, τα μολυσμένα τρόφιμα από διακινούντες υπαλλήλους και τα φρούτα ή λαχανικά που μολύνονται κατά το πότισμα ή το πλύσιμο.

Τα δίθυρα μαλάκια τρέφονται φιλτράροντας την τροφή τους. Αν και οι νοροϊοί δεν αναπαράγονται στο έντερο των οστρακόδερμων, οι οργανισμοί αυτοί συσσωρεύουν και συμπυκνώνουν ιούς από νερά μολυσμένα με βοθρολύματα. Καθώς τα στρείδια καταναλώνονται συνήθως ωμά ή ελαφρώς μαγειρεμένα, είναι ιδιαιτέρως επικίνδυνα για την πρόκληση μόλυνσης. Από την άλλη, δείγματα στρειδιών εξετάζονται σε μηνιαία βάση στην σάρκα τους για την παρουσία βακτηρίων, όμως καμία ιική ανίχνευση δεν περιλαμβάνεται. Οι ιοί επιβιώνουν για μεγαλύτερο διάστημα σε θαλάσσιο περιβάλλον σε σχέση με τα βακτηριακά παθογόνα και έτσι, δείγματα τα οποία ικανοποιούν τα επίπεδα ασφαλείας για τα βακτήρια μπορεί να μην είναι ασφαλή για ιική μόλυνση. Οι διαδικασίες καθαρισμού, επίσης, που ακολουθούνται για την απαλλαγή από βακτήρια δεν είναι αποδοτικές στην απομάκρυνση των ιών. Μια ακόμα σημαντική ιδιότητα των οστρακόδερμων στη μετάδοση αποτελεί η δυνατότητά τους να διαδίδουν ανασυνδυασμένα στελέχη. Καθώς αυτοί οι θαλάσσιοι οργανισμοί τυπικά μολύνονται από βοθρολύματα, μπορούν να «φιλοξενούν» διάφορα στελέχη νοροϊών και γενικότερα ανθρώπινων calici ιών τα οποία κυκλοφορούν στην κοινότητα και είναι ικανά να ανασυνδυάζονται υπό αυτές τις συνθήκες.

Τα προϊόντα που έχουν μολυνθεί από άτομα που επεξεργάζονται τα τρόφιμα λειτουργούν ως μέσα μεταφοράς της ιικής μόλυνσης και είναι τυπικά εκείνα τα τρόφιμα τα οποία καταναλώνονται ωμά, όπως οι σαλάτες ή εκείνα τα οποία δεν μαγειρεύονται μετά την ετοιμασία τους, όπως η «γέμιση» των σάντουιτς. Οι νοροϊοί καταστρέφονται ύστερα από επαρκές μαγείρεμα, τυπικά για πάνω από 1min στους 90°C. Θα ήταν δύσκολο να εφαρμοστούν προληπτικές μετρήσεις πέραν της γενικής υγιεινής σε περιπτώσεις προσυμπτωματικών ατόμων που επεξεργάζονται τρόφιμα. Οι τυπικές κατευθυντήριες οδηγίες προτείνουν ότι οι χειριστές τροφής θα πρέπει να επιστρέφουν στην εργασία τους μετά τη συμπλήρωση 48 με 72 ωρών από την εκδήλωση των συμπτωμάτων και με επιβεβαιωμένη μη ύπαρξη ασθένειας των οικογενειακών και κοντινών τους προσώπων. Μεγαλύτερες περιόδους απουσίας θεωρούνται υπερβολικές αν και η διάδοση του ιού μπορεί να ξεπεράσει την προαναφερθείσα χρονική διάρκεια.

Τέλος, τα φρούτα και τα λαχανικά είναι δυνατό να μολυνθούν μέσω του νερού που χρησιμοποιείται για την άρδυσή τους. Επίσης, η μόλυνση αυτή μπορεί να οφείλεται στο πλύσιμο ή τον ψεκάσμο των προϊόντων αυτών ή ακόμα από μολυσμένους διακινητές τροφής οι οποίοι εμπλέκονται στη συγκομιδή.

Γ. Μετάδοση μέσω νερού

Το πόσιμο νερό μπορεί να αποτελέσει πηγή μόλυνσης για κρούσματα νοροϊκής γαστρεντερίτιδας υπό σχεδόν όλες τις συνθήκες. Αιτία πρόκλησης τέτοιων κρουσμάτων μπορεί να είναι η μόλυνση ιδιωτικών πηγαδιών, δημόσιων πηγαδιών καθώς και κοινοτικών συστημάτων ύδρευσης μικρής ή μεγάλης κλίμακας. Έτσι, στα αποθέματα πόσιμου νερού είναι δυνατό να διεισδύσει μολυσμένο νερό σε περιόδους υψηλής βροχόπτωσης με πλημμύρες. Επίσης, η διαρροή των αστικών λυμάτων και βόθρων καθώς επίσης η απορροή τους σε πηγές και χείμαρρους μπορεί να αποτελέσει την αιτία μόλυνσης. Επιπρόσθετα, μόλυνση εμφιαλωμένου νερού και πάγου για εμπορική χρήση μπορεί να οδηγήσει σε κρούσματα νοροϊκής ασθένειας σε παγκόσμιο επίπεδο.

Δ. Μετάδοση μέσω άλλης περιβαλλοντικής μόλυνσης

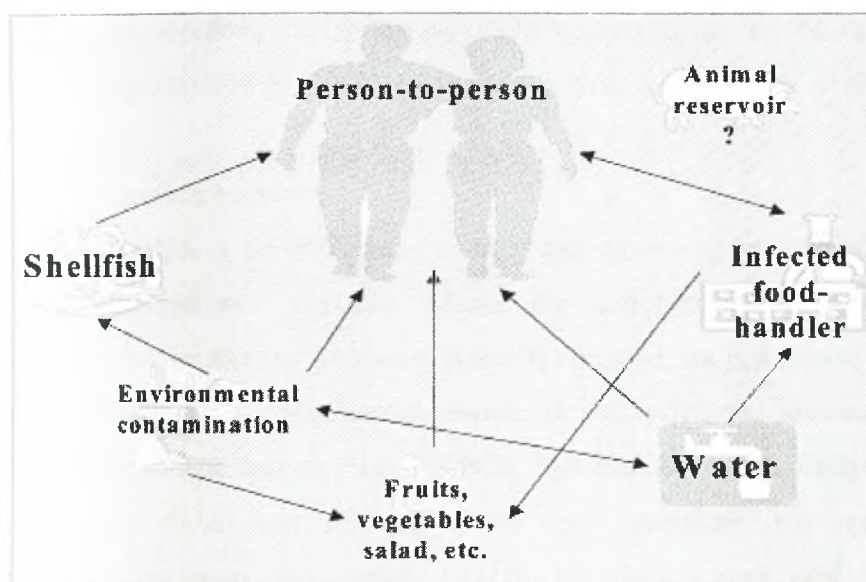
Η σημασία της περιβαλλοντικής μόλυνσης από νοροϊούς οφείλεται στην αντοχή των ιών αυτών μέσω διαδικασιών αδρανοποίησης με χλώριο σε σχέση με άλλα παθογόνα. Εξαιτίας αυτού, οι νοροϊοί έχουν ανιχνευθεί σε ένα ευρύ φάσμα τοποθεσιών της ανθρώπινης δραστηριότητας. Πιο συγκεκριμένα, έχουν ανιχνευθεί μέσω RT-PCR σε νερά ψυχαγωγικών πάρκων και σε βοθρολύματα, αλλά και στην επιφάνεια διαφόρων αντικειμένων (Schvoeeger E. et al., 2000). Σε νοσοκομειακά κρούσματα, ιοί ανιχνεύθηκαν ακόμα και σε ντουλάπια και κουρτίνες. Εκτός από «ύποπτα» για μόλυνση σημεία, όπως χαλιά και τουαλέτες, αντικείμενα όπως τραπέζια και φωτιστικά περιέχουν στις επιφανειές τους ανιχνεύσιμα επίπεδα των ιών.

Ε. Ζωονόσοι

Οι calici ιοί, γενικά, αποτελούν και ζωικά παθογόνα, εκτός από ανθρώπινα. Οι νοροϊοί είναι αρκετά ειδο-ειδικοί μολυσματικοί παράγοντες και ίσως η δια-ειδική μετάδοση να είναι σπάνιο γεγονός. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί, ενώ υπάρχουν ενδείξεις για μετάδοση μέσω ζωνόσων. Συγκεκριμένα, έχει αποκαλυφθεί ομοιότητα αλληλουχίας μεταξύ στελεχών των χοίρων και βοοειδών με εκείνα των ανθρώπων, υποδεικνύοντας τον ρόλο των ζώων στην μετάδοση των calici ιών στον άνθρωπο ως μια «δεξαμενή» νέων μολυσματικών στελεχών (van Der Poel et al., 2000).

ΣΤ. Μετάδοση σε νοσοκομεία και κλινικές

Ο ιός στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να εισαχθεί μέσω μολυσμένων τροφίμων, του πόσιμου νερού ή ενός εξωτερικού επισκέπτη, ο οποίος έχει μολυνθεί και ίσως δεν εμφανίζει κλινικές εκδηλώσεις. Δεδομένου του περιορισμού στις προσωπικές καθημερινές συνήθειες του κάθε ατόμου και της προσωπικής υγιεινής τόσο λόγω των προβλημάτων υγείας όσο και της ακράτειας συνήθως σε ηλικιωμένους, οι συνθήκες αυτές στα θεραπευτικά ιδρύματα είναι οι κατάλληλες για μετάδοση από άτομο σε άτομο. Από την άλλη, εκτός των ασθενών, σημαντική είναι επίσης η μόλυνση του προσωπικού καθώς είναι πολύ πιθανό να μεταδώσουν την μόλυνση και σε άλλα σημεία, τόσο εντός όσο και εκτός των ιδρυμάτων αυτών. Βέβαια, ασθένεια των εργαζομένων έχει ως αποτέλεσμα την ανεπάρκεια προσωπικού και οικονομικές απώλειες.



Εικόνα 12:
Συνοπτική απεικόνιση των πορειών μετάδοσης και η αλληλεπίδρασή τους. Από *Lorman B.A. et al., 2002.*

1.7 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

1.7.1 Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία παραμένει και σήμερα ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για την ιική γαστρεντερίτιδα καθώς είναι μια γρήγορη μέθοδος και απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Ωστόσο, η άμεση παρατήρηση δειγμάτων μη συμπυκνωμένων κοπράνων ασθενών από κρούσματα γαστρεντερίτιδας δεν είναι αρκετά αποδοτική για χρήση ως διαγνωστικό εργαλείο ρουτίνας για τους νοσοκόμους, εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης των ικών σωματιδίων στα δείγματα αυτά καθώς και της δυσκολίας διαχωρισμού τους από άλλα μικρά σφαιρικά αντικείμενα που είναι παρόντα στα κόπρανα. Για τον λόγο αυτό, τα «φερόμενα» ως νοροϊκά σωματίδια θα

πρέπει να ανιχνεύονται στα κόπρανα μέσω της IEM ή της ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας στερεής φάσης (SPIEM) (Karikian A.Z. et al., 1980). Ο χρόνος, τέλος, της συλλογής των κλινικών δειγμάτων είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την επιτυχή ανίχνευση του ιού και η προτεινόμενη χρονική προθεσμία είναι μέχρι τις 72 ώρες μετά την εκδήλωση της ασθένειας.

1.7.2 Ανοσοδοκιμές

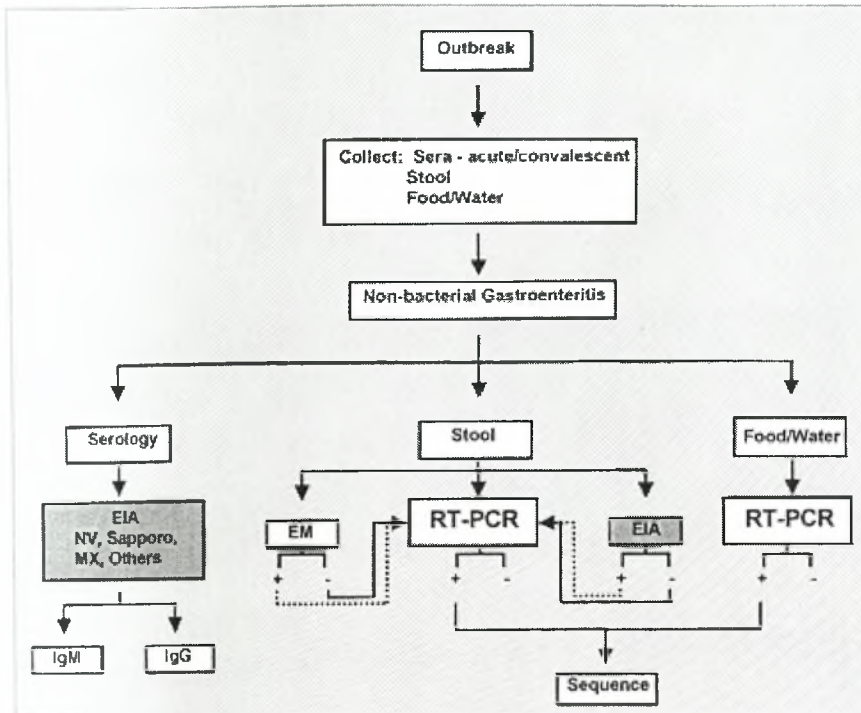
Η δυνατότητα παραγωγής rVLPs έχει σημαντική θετική επίδραση στην ανάπτυξη διαγνωστικών ανοσοδοκιμών, όπως η ELISA. Τα rVLPs είναι αντιγονικά παρόμοια με τα φυσικά ιοσωμάτια και μπορούν να παραχθούν σε σημαντικές ποσότητες. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί ανοσοδοκιμές που χρησιμοποιούν υπεράνοσους αντιορούς έναντι των rVLPs. Τέλος, έχουν αναπτυχθεί μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για νοροϊούς για χρήση σε ELISA τεχνικές με τις οποίες είναι δυνατή η ανίχνευση του ιικού αντιγόνου σε κλινικά δείγματα (Kamata K. et al., 2005).

1.7.3 Μοριακές τεχνικές

Σήμερα, η RT-PCR ίσως είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανίχνευση των νοροϊών. Μέσω της μεθόδου αυτής, οι ιοί μπορούν να ανιχνευθούν σε κλινικά δείγματα, έμετο ή κόπρανα, σε μολυσμένο νερό ή φαγητό ή οποιαδήποτε άλλη μολυσματική ουσία. Η εφαρμογή της ποσοτικής πραγματικού χρόνου (real-time quantitative) RT-PCR έχει διαδοθεί καθώς επιτρέπει την γρήγορη ανίχνευση αλλά και την σύγκριση των επιπέδων του ιικού RNA, ενώ πραγματοποιούνται πειραματικές μελέτες για την βέλτιστη εκτέλεση των RT-PCR τεχνικών.

Επίσης, οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν αλλάξει μορφή με τη χρήση της RT-PCR η οποία συνδυάζεται με ανάλυση της αλληλουχίας των αμπλικονίων. Η μοριακή επιδημιολογία, λοιπόν, είναι χρήσιμη στην ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό στελεχών τα οποία είναι υπεύθυνα σε διάφορα κρούσματα γαστρεντερίτιδας, ενώ έχει αποκαλύψει και σημαντικά γενετικά γνωρίσματα των κυκλοφορούντων στον πληθυσμό νοροϊικών στελεχών. Εξαιτίας της μεγάλης ευαισθησίας των RT-PCR τεχνικών, έχουν περιγραφεί ελάχιστες δοκιμές υβριδισμού για την ανίχνευση νοροϊών. Μια τέτοια περίπτωση αποτελεί η χρήση σημασμένων με ³²P cDNAs που υβριδίζονται σε μια περιοχή του γενώματος όμοια με εκείνη που ενισχύει μια RT-PCR τεχνική. Συγκριτικά αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι η δοκιμή υβριδισμού

ανίχνευσε 100 φορές λιγότερο ιικό RNA και σε συχνότητα 27% μικρότερη από την RT-PCR, οδηγώντας στο συμπέρασμα της μη καταλληλότητας της πρώτης μεθόδου για ανίχνευση μικρού ιικού τίτλου σε κλινικά δείγματα (Jiang X. et al., 1992).



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση των στρατηγικών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της μόλυνσης από νοροϊούς. Από Schwab K.J. et al., 2000.

1.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

1.8.1 Πρόληψη και θεραπεία

Για την πρόληψη της μόλυνσης και της ασθένειας από τους νοροϊούς δεν υπάρχουν συγκεκριμένες μέθοδοι. Η διαχείριση των κρουσμάτων εστιάζεται κυρίως στην αποφυγή της εξάπλωσης σε άλλες περιοχές μέσω άρρωστων ή εκτεθειμένων ατόμων, στο συχνό πλύσιμο χεριών και σε αποτελεσματική απολύμανση χώρων. Οι ιοί αυτοί είναι ανθεκτικοί στον καθαρισμό επιφανειών και μολυσματικών ουσιών με καθαριστικά ή αιθανόλη και απαιτείται περαιτέρω χημική απολύμανση. Αποτελεσματικά απολυμαντικά θεωρούνται όσα περιέχουν υποχλωριώδες σε συγκέντρωση τουλάχιστον 5000ppm, καθώς επίσης εκείνα που βασίζονται για την απολυμαντική τους ιδιότητα στο υπεροξείδιο του υδρογόνου ή τα φαινολικά παράγωγα (Barker J. et al., 2004).

Όπως έχει αναφερθεί, οι νοροϊοί χαρακτηριστικά προκαλούν μια ήπιας μορφής και αυτοπεριοριζόμενη γαστρεντερίτιδα η οποία φυσιολογικά λύεται χωρίς επιλοκές. Για την αναπλήρωση των χαμένων υγρών συστήνεται η δια στόματος χορήγηση υγρών και θεραπεία αποκατάστασης ηλεκτρολυτών. Ωστόσο, ίσως είναι

απαραίτητη η παρεντερική χορήγηση των υγρών σε περιπτώσεις επίμονου και παρατεταμένου εμέτου ή διάρροιας. Τέλος, αν και σπάνια, σε περίπτωση αφυδάτωσης απαιτείται νοσηλεία του ατόμου (Crane J.K. and Guerrant R.L., 1995).

1.8.2 Εμβόλια

Ένα από τα κύρια εμπόδια για την δημιουργία στρατηγικής για την ανοσοποίηση έναντι των νοροϊών αποτελεί η ανεπαρκής γνώση των μηχανισμών ανοσίας για τους ιούς αυτούς. Η έλλειψη δυνατότητας κυτταροκαλλιέργειάς τους επίσης εμποδίζει την ανάλυση του ρόλου των οροεξουδετερωτικών αντισωμάτων, ενώ οι ίδιοι οι ιοί δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή για ζωντανό ή αδρανοποιημένο εμβόλιο. Αυτό το τελευταίο πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί από τα διαθέσιμα rVLPs που αποτελούν μια άφθονη πηγή καψιδιακού αντιγόνου. Αν διασαφηνιστούν πλήρως οι μηχανισμοί ανοσίας και αποδειχθεί ο ρόλος των αντισωμάτων στην πρόληψη της ασθένειας, το rVLP θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο υπομονάδας. Έτσι, η ανάπτυξη εμβολίου θα ήταν ικανή να μειώσει τη συχνότητα της επιδημικής ιικής γαστρεντερίτιδας, με μεγάλη σημασία σε άτομα σε συγκεκριμένους χώρους όπως κολλέγια, νοσοκομεία και τον στρατό. Εξαιρετικής σημασίας επίσης είναι η ανάπτυξη εμβολίου για τα παιδιά και τα νήπια ιδίως σε αναπτυσσόμενες χώρες όπου οι συνθήκες υγιεινής είναι πιο περιορισμένες. Τέλος, σε εξουθενωμένα νήπια έχει παρατηρηθεί πως ο υποσιτισμός τους οφείλεται στην βλάβη του εντερικού βλεννογόνου ύστερα από συνεχείς διάρροιες, με συνέπεια την απαίτηση στις περιπτώσεις αυτές εμβολιασμού για την απόκτηση ανοσίας (Estes M.K. et al., 2000).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μοριακή και φυλογενετική ανάλυση στελεχών νοροϊών που κυκλοφορούν στον ελληνικό πληθυσμό, τα οποία ανιχνεύθηκαν σε κλινικά δείγματα κοπράνων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

2.1.1 Θετικοί μάρτυρες

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες στάλθηκαν από την Αγγλία, με πηγή λήψης στρατιώτες στο Αφγανιστάν οι οποίοι είχαν μολυνθεί από νοροϊό. Η κωδικοποίησή τους παρουσιάζεται 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: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες.

2.1.2 Κλινικά δείγματα

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 8 κλινικά δείγματα κοπράνων, ύποπτα για νοροϊό. Τα στοιχεία των δειγμάτων και η κωδικοποίησή τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Κωδικοποίηση δείγματος	Προέλευση δείγματος
A6	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A7	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A10	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A12	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A15	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
B3	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
1	Νοσοκομείο Λάρισας
2	Νοσοκομείο Λάρισας

Πίνακας 3: Κωδικοποίηση και προέλευση των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

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 φυγοκέντρησης (πλαστικοί σωλήνες των 15ml, τύπου falcon) προστίθενται 10ml 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 ΙΙΚΟΥ RNA

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

2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (REVERSE TRANSCRIPTION – RT)

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 τυχαίους εκκινητές (random primers) d(N9) (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) (50nmol/μl, 1μl/tube), 10mM δεοξυτριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs, 1μl/tube, Invitrogen, UK) 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 ιικού RNA). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65°C για 5min 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 αντιοξειδωτικό διθειοθρεϊτόλη (DTT, 2μl/tube), αναστολέα ριβονουκλεασών (RNase out, 20units/μl, 0,5μl/tube), ddH₂O (1μl/tube) και 0,5μl αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase) M-MLV

(200units/μl, Invitrogen, UK). Στα eppendorf προστέθηκαν 8μl/tube του δεύτερου μίγματος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση (σε ειδικό μηχάνημα) διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 25°C για 10min, 37°C για 50min και 70°C για 15min.

2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION – PCR)

Τμήματα του παραγόμενου cDNA ενισχύθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

2.5.1 Εκκινητικά μόρια

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 JV13I	4551	Sense	ATACCACTATGAT GCAGAYTA	327 bp	Vinje and Koopmans, 1996
	4878	Antisense	TCATCATCACCAT AGAAIGAG		
SRI-2 SRI-1 SRI-3 (seminested)	5344	Sense	AAATGATGATGG CGTCTA	315bp	D. Häfliger et al., 1997
	5659	Antisense	CCAACCCARCCAT TRTACAT		
	5584	Antisense	AAAAYRTCACCG GGKGTAT		
Calman-29 Calman-32	4868	Sense	TATGGTGATGATG AAATAGTGTC	488 bp	Jacques Rohayem et al., 2004
	5356	Antisense	ATTCGGGCAGA AGATTG		
P78 P80	1682	Sense	GGGCCCCCTGGT ATAGGTAA	288 bp	Robert L. Atmar and Mary K. Estes, 2001
	1943	Antisense	TGGTGATGACTAT AGCATCAGACAC AAA		

Πίνακας 4: Ζεύγη εκκινητών ειδικών για την γενετική ομάδα GI, που χρησιμοποιήθηκαν.

Γενετική ομάδα II (GII)

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'→3')	Μήκος προϊόντος PCR	Βιβλιογραφία
JV12Y	4279	Sense	ATACCACTATGATGC AGAYTA	326 bp	Vinje and Koopmans, 1996
JV13I	4605	Antisense	TCATCATCACCATAG AAIGAG		
SRII-2	4844	Sense	TWCTCYTTYTATGGT GATGATGA	513bp	D. Häfliger et al., 1997
	5357	Antisense	CGCCATCTTCATTCA CAAA		
SRII-1 SRII-3 (seminested)	5046	Antisense	TTWCCAAACCAACC WGCTG	202bp	
mon381	5362	Sense	CCAGAATGTACAATG GTTATGC	321 bp	Jacqueline S. Noel et al., 1997
mon383	5683	Antisense	CAAGAGACTGTGAA GACATCATC		
G2SKF	5058	Sense	CNTGGGAGGGCGAT CGCAA	343bp	Shigeyuki Kojima et al., 2002
G2SKR	5401	Antisense	CCRCCNGCATRHCCR TTRTACAT		

Πίνακας 5: Ζεύγη εκκινητών ειδικών για την γενετική ομάδα GII, που χρησιμοποιήθηκαν.

2.5.2 PCR

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR το μίγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3μl cDNA του κάθε δείγματος, 2μl εκκινητών (1μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), 5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5μl μίγματος δεοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 0,5μl Taq DNA πολυμεράσης (5u/μl, Paq5000, Strategene, USA) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50μl, ενώ σε ορισμένες PCR προσθέσαμε επιπλέον MgCl₂ για να ενισχύσουμε την ποσότητα του προϊόντος. Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του cDNA μορίου στόχου στους 95°C για 2min και ακολουθεί η εφαρμογή των διαφορετικών, για κάθε ζεύγος εκκινητών, συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 5min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

2.5.3 Seminested PCR

Το προϊόν της PCR με τα εκκινητικά μόρια SRI-1 και SRI-2 υποβλήθηκε σε seminested PCR χρησιμοποιώντας ως κωδικό εκκινητή τον SRI-2 και εσωτερικό αντικωδικό τον SRI-3. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελείται από 5μl προϊόντος της PCR με τα εκκινητικά μόρια SRI-1 – SRI-2, 2μl εκκινητών (1μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), 5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5μl μίγματος δεοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 0,5μl Taq DNA πολυμεράσης (5u/μl, Paq5000, Strategene, USA) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50μl. Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2min και ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει επώαση για 5min στους 72°C. Η διαδικασία που περιγράφηκε πραγματοποιήθηκε και με τα ζεύγη εκκινητών SRII-1 – SRII-2 και SRII-2 – SRII-3 της γενετικής ομάδας II, GII.

2.5.4 Autonested PCR

Το προϊόν της PCR με τα εκκινητικά μόρια JV12Y και JV13I υποβλήθηκε σε autonested PCR χρησιμοποιώντας το ίδιο ζεύγος εκκινητών. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελείται από 5μl προϊόντος της PCR με τα εκκινητικά μόρια JV12Y και JV13I, 2μl εκκινητών (1μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), 5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5μl μίγματος δεοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 0,5μl Taq DNA πολυμεράσης (5u/μl, Paq5000, Strategene, USA) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50μl. Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2min και ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει επώαση για 5min στους 72°C. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε με όλα τα ζεύγη εκκινητών και των δύο γενετικών ομάδων, με εξαίρεση τα ζεύγη στα οποία εφαρμόστηκε seminested PCR.

2.5.5 Συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης για τις PCR, Seminested PCR και Autonested PCR

Οι συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης οι οποίες πραγματοποιήθηκαν για κάθε ζεύγος εκκινητών και για τις δύο γενετικές ομάδες, παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες.

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 (SRI-2 SRI-1)	25 κύκλοι Ομοίως με PCR 40 κύκλοι (SRI-2 SRI-3)
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
P78 P80	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

Πίνακας 6: Συνθήκες PCR, seminested PCR και autonested PCR με τους εκκινητές της γενετικής ομάδας GI. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει ότι στις αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν με αυτούς τους εκκινητές προστέθηκε στο μίγμα αντίδρασης 1μl MgCl₂ 50mM, ενώ η ποσότητα των dNTPs που προστέθηκε ήταν 6μl.

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 (SRII-2 SRII-1)	25 κύκλοι Ομοίως με PCR 40 κύκλοι (SRII-2 SRII-3)
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
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

Πίνακας 7: Συνθήκες PCR, seminested PCR και autonested PCR με τους εκκινητές της γενετικής ομάδας GII.

2.5.6 Autonested GoTaq PCR

Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για την μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων των autonested και seminested PCR (θετικών δειγμάτων), η οποία ακολούθησε. Έτσι, η autonested GoTaq PCR πραγματοποιήθηκε για την περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των προϊόντων, καθώς επίσης για την προσθήκη συμπληρωματικών με την περιοχή ένθεσης του φορέα κλωνοποίησης poly(A) μονόκλωνων άκρων, μια ιδιότητα του ενζύμου πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την αντίδραση.

Το μίγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3μl προϊόντος της autonested ή seminested PCR το οποίο έχει καθαριστεί από πήκτωμα αγαρόζης (όπως περιγράφεται παρακάτω), 2μl των αντίστοιχων κάθε φορά εκκινητών (1μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), 10μl 5x ρυθμιστικού διαλύματος (Colorless Go Taq Flexi Buffer), 5μl μίγματος δεοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 0,25μl GoTaq Flexi DNA πολυμεράση (1,25u/tube, 5u/μl, Promega, USA), 4μl MgCl₂ solution 25mM και ddH₂O ελεύθερου νουκλεασών (Sigma, USA) μέχρι τελικό όγκο 50μl. Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2min και ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης στους 95°C για 1min, υβριδοποίησης για 30sec (η θερμοκρασία εξαρτάται από το ζεύγος των εκκινητών, σύμφωνα με τον πίνακα 8) και επιμήκυνσης στους 72°C για 1min, για 20 κύκλους. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει επώαση για 5min στους 72°C.

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Θερμοκρασία υβριδοποίησης (°C)
JV12Y JV13I	37
SRI-2 SRI-3	40
Calman-29 Calman-32	50
P78 P80	50
SRII-2 SRII-3	50
mon381 mon383	43
G2SKF G2SKR	55

Πίνακας 8: Θερμοκρασία υβριδοποίησης για τις αντιδράσεις autonested GoTaq PCR.

2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΩΝ RT-PCR ΚΑΙ AUTONESTED GoTaq PCR

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

Από το προϊόν των autonested και seminested PCR και της autonested GoTaq PCR αντίστοιχα, 10μl αναμιγνύονται με 2μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης) και μεταφέρονται στο πήκτωμα αγαρόζης, σε πηγαδάκια (wells) τα οποία έχουν σχηματιστεί κατά την πήξη της αγαρόζης με την προσθήκη ειδικής χτένας στο ένα άκρο της θήκης ηλεκτροφόρησης. Η κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης των αρνητικά φορτισμένων DNA προϊόντων είναι από την κάθοδο (αρνητικός πόλος) προς την άνοδο (θετικός πόλος) της συσκευής. Για τον προσδιορισμό του μήκους των επιθυμητών προϊόντων χρησιμοποιείται μάρτυρας μοριακού βάρους, στη συγκεκριμένη περίπτωση ο 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK) σε συγκέντρωση 1μg/μl, ο οποίος εμφανίζει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένταση 120Volts, 50mA για περίπου 1h. Τέλος, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται πάνω από τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne, Hartland WI), όπου ελέγχεται και φωτογραφίζεται με Olympus digital camera.

2.7 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΩΝ RT-PCR ΚΑΙ AUTONESTED GoTaq PCR

Από τα προϊόντα της κάθε autonested ή seminested PCR, 40μl ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, το οποίο περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Για τον προσδιορισμό του μήκους των επιθυμητών

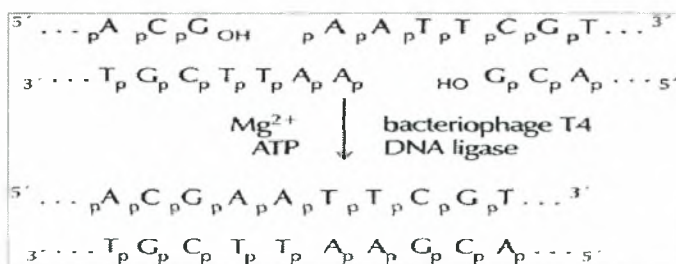
προϊόντων χρησιμοποιείται μάρτυρας μοριακού βάρους, ο 100bp DNA Ladder σε συγκέντρωση 1μg/μl, ο οποίος εμφανίζει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένταση 120Volts, 50mA για περίπου 1h. Οι αντίστοιχες στα προϊόντα των autonested ή seminested PCR ζώνες απομακρύνονται από το πήκτωμα και μεταφέρονται σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf των 1,5ml. Ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας το QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αναφερθείσα διαδικασία επαναλήφθηκε και για τα προϊόντα της autonested GoTaq PCR.

2.8 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ AUTONESTED GoTaq PCR

Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε, ουσιαστικά, για την αραίωση του ιικού τίτλου κάθε κλινικού δείγματος κοπράνων, καθώς υπήρχε η υποψία για ταυτόχρονη μόλυνση των ασθενών με πάνω του ενός στελέχους νοροϊών. Έτσι, κάθε κλώνος μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων που προέκυψε, περιέχει κλωνοποιημένο το γενωμικό τμήμα από ένα μόνο διακριτό στέλεχος. Για την πραγματοποίηση της μοριακής κλωνοποίησης των προϊόντων της autonested GoTaq PCR και την οπτική επιβεβαίωση της διαδικασίας ακολουθήθηκαν τέσσερα διαδοχικά βήματα, τα οποία περιγράφονται παρακάτω. Σημειώνεται ότι λόγω του αριθμού των δειγμάτων ολόκληρη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές, με τα μισά δείγματα κάθε φορά.

A. Αντίδραση λιγάσης

Η αντίδραση αυτή επιτρέπει την ενσωμάτωση του ενισχυμένου γενωμικού τμήματος από τις αντιδράσεις PCR στο πλασμίδιο - φορέα κλωνοποίησης. Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι ο pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA), ο οποίος χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση PCR προϊόντων. Ο φορέας αυτός περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη (polylinker) όπου υπάρχει η θέση ενσωμάτωσης με



Εικόνα 14: Η αντίδραση που καταλύει η λιγάση.

μονόκλωνες ουρές poly(T). Τα προϊόντα PCR που κλωνοποιήθηκαν έχουν στα άκρα τους poly(A) μονόκλωνες ουρές (συμπληρωματικά άκρα) από την αντίδραση autonested GoTaq PCR. Συνεπώς, η T4 DNA Ligase βακτηριοφάγου (Promega, USA) που χρησιμοποιήθηκε καταλύει την σύνδεση των συμπληρωματικών άκρων, η συμπληρωματικότητα των οποίων επιτρέπει στα δύο δίκλινα μόρια DNA να ενωθούν μέσω των φωσφοδιεστερικών δεσμών που δημιουργεί η λιγάση ανάμεσα στο 3' υδροξύλιο και την διπλανή 5' φωσφορική ομάδα του DNA, καταλήγοντας στην ένθεση του προϊόντος PCR στην περιοχή ένθεσης του φορέα κλωνοποίησης.

Η αντίδραση λιγάσης έλαβε χώρα στους 25°C για 2h. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 1μl pGEM[®]-T Easy Vector 50ng, προϊόν autonested GoTag PCR 3μl, 1μl T4 DNA Ligase (3u/μl) και 2x Rapid Ligation Buffer 5μl.

B. Παραγωγή δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο (γλωριούχο ασβέστιο - CaCl₂)

Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E.coli DH5α, ένα στέλεχος ανίκανο για ανασυνδυασμό και κατασταλτικό μεταλλάξεων amber. Επίσης, η φ80 lacZ ΔM15 μετάλλαξη στην αλληλουχία του γενόματός του, επιτρέπει α-συμπληρωματικότητα με το αμινοτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης (τμήμα α) που κωδικοποιείται από τον φορέα κλωνοποίησης. Το τμήμα Ω της β-γαλακτοσιδάσης κωδικοποιείται από το βακτηριακό γένωμα, ωστόσο απαιτείται και το τμήμα α για τον σχηματισμό ενεργούς ενζύμου, το οποίο κωδικοποιείται από τον φορέα και μέσα στο οποίο υπάρχει η περιοχή πολυσυνδέτη, η παρουσία της οποίας όμως δεν διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο.

Αρχικά, από απόθεμα γλυκερόλης στους -80°C συλλέχθηκαν βακτηριακά κύτταρα και μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε 1ml αποστειρωμένου μέσου ανάπτυξης LB Broth (20g/L, Sigma, USA) ακολουθώντας επώαση για 16h (overnight) στους 37°C στις 210 στροφές/λεπτό. Εν συνεχεία, 1ml από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 50ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 2h στους 37°C στις 210 στροφές/λεπτό (ανανέωση καλλιέργειας). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε λήψη 1ml από την καλλιέργεια έτσι ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση σε OD₆₀₀ και να σταματήσουμε την κυτταρική ανάπτυξη όταν τα κύτταρα βρεθούν σε εκθετική φάση αύξησης, δηλαδή όταν η απορρόφησή τους φτάσει στα 0,450-0,550A. Όταν τα κύτταρα έφτασαν στο κατάλληλο σημείο ανάπτυξης τοποθετήθηκαν στον πάγο για 10min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις

4000rpm για 10min στους 4°C και στο τέλος της φυγοκέντρησης αποχύθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια διαλυτοποιήσαμε το ίζημα σε 10ml παγωμένου CaCl₂ συγκέντρωσης 0,1M και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min στους 4°C, στο τέλος της οποίας αποχύθηκε το υπερκείμενο. Τέλος, διαλυτοποιήθηκε το ίζημα σε 2ml παγωμένου CaCl₂ 0,1M.

Διάλυμα 0,1M CaCl₂: 0,55g CaCl₂ (Sigma, USA) διαλύονται σε ddH₂O μέχρι όγκο 50ml.

Γ. Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Η διαδικασία ενσωμάτωσης του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης στα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα ξεκινά με τη μεταφορά, για κάθε δείγμα, 200μl από τα δεκτικά κύτταρα σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια (microfuge tubes). Ακολούθησε προσθήκη του μισού ποσού της αντίδρασης λιγάσης κάθε δείγματος στο αντίστοιχο μικροσωληνάριο και ύστερα από ήπια ανάδευση, τοποθετήθηκαν τα μικροσωληνάρια στον πάγο για 30min. Έπειτα τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 42°C για 90sec ακριβώς και ακολούθως μεταφέρθηκαν γρήγορα στον πάγο για 2min (heat shock). Στη συνέχεια, 200μl των μετασηματισμένων δεκτικών κυττάρων μεταφέρθηκαν σε falcon με 800μl LB Broth και επώαστηκαν στους 37°C στις 180 στροφές/λεπτό για 1h (επαναφορά πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων – «επούλωση»). Εν συνεχεία, 300μl από την κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκαν σε τριβλίο που περιείχε LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και αμπικιλίνη 1,5μl/ml LB Agar (6,6mg/ml) και προστέθηκαν 12μl X-gal (50mg/ml, Promega, USA), ενώ ακολούθησε επώαση για 16h στους 37°C.

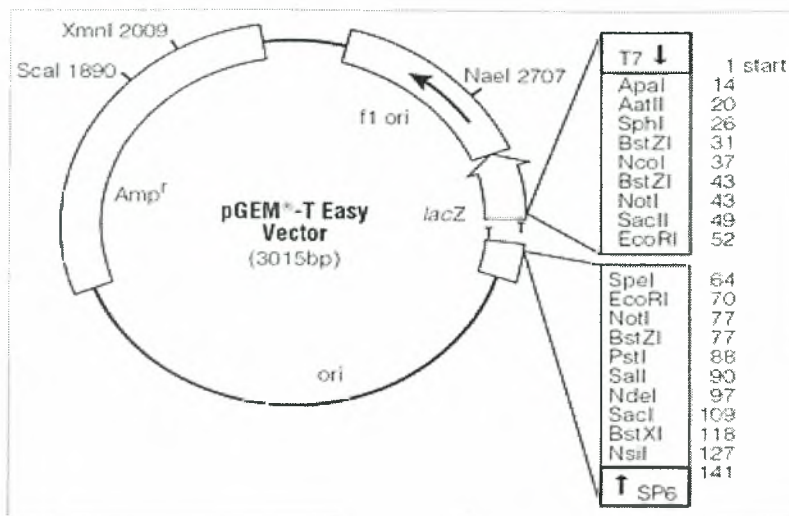
Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, η οποία παρεμβαίνει στη διασύνδεση των μονάδων πεπτιδογλυκάνης και αναστέλλει τη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος. Έτσι, αποκλείεται η ανάπτυξη άλλων βακτηριακών κυττάρων στο τριβλίο καλλιέργειας πέραν όσων έχουν μετασηματιστεί με τον φορέα κλωνοποίησης. Επίσης, στα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν, όταν αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την άχρωμη χημική ουσία 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολ-β-D-γαλακτοσίδιο (X-gal), η διάσπαση της ουσίας αυτής από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος. Έτσι, όταν στον φορέα κλωνοποίησης δεν έχει εισαχθεί στην περιοχή πολυσυνδέτη το επιθυμητό ένθεμα, το τμήμα α της β-γαλακτοσιδάσης παράγεται, σχηματίζεται το ενεργό ένζυμο και το X-gal διασπάται παράγοντας αποικίες μπλε χρώματος. Όταν όμως έχει γίνει ένθεση του προϊόντος PCR στην περιοχή πολυσυνδέτη, το αναγνωστικό πλαίσιο του

τιμήματος α της β-γαλακτοσιδάσης διαταρράσσεται, δεν παράγεται ενεργό ένζυμο και οι αποικίες είναι άχρωμες (λευκές).

Βάσει της παραπάνω αρχής, έγινε συλλογή λευκών αποικιών και συγκεκριμένα τριών από κάθε τριβλίο καλλιέργειας, δηλαδή από κάθε δείγμα. Έπειτα, κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε 2ml LB Broth (20g/L) με αμπικιλίνη 1,5μl/ml LB Broth (6,6mg/ml) και ακολούθησε επώαση για 16h στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό. Τέλος, ακολούθησε εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, έτσι ώστε να απομονωθεί ο ανασυνδυασμένος φορέας που περιείχαν οι λευκές αποικίες.

Δ. Πέψη με EcoRI

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, του οποίου θέσεις αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 4μl από το εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 2μl 10x H Buffer, 1μl Restriction Enzyme EcoRI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και 13μl ddH₂O έτσι ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl. Ακολούθησε επώαση η οποία πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 2h, ενώ με το πέρας της επώασης προστέθηκαν 3μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση. Τα 23μl που προκύπτουν ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Για τον προσδιορισμό του μήκους των επιθυμητών προϊόντων χρησιμοποιείται μάρτυρας μοριακού βάρους, ο 100bp DNA Ladder σε συγκέντρωση 1μg/μl, ο οποίος εμφανίζει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένταση 120Volts, 50mA για περίπου 1h. Τέλος, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται πάνω από την τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, όπου ελέγχεται και φωτογραφίζεται με Olympus digital camera.



Εικόνα 15: Ο φορέας κλωνοποίησης pGEM®-T Easy Vector System. Φαίνονται τα γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και β-γαλακτοσιδάσης καθώς και οι θέσεις κοπής της EcoRI. Από www.promega.com.

2.9 ΕΥΡΕΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ) ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ AUTONESTED GoTaq PCR

Η αλληλούχιση των κλωνοποιημένων προϊόντων της autonested GoTaq PCR πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία MacroGen Inc. (Seoul, Korea), με εκκινητές τους προαγωγείς T7 και SP6 του φορέα κλωνοποίησης οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης.

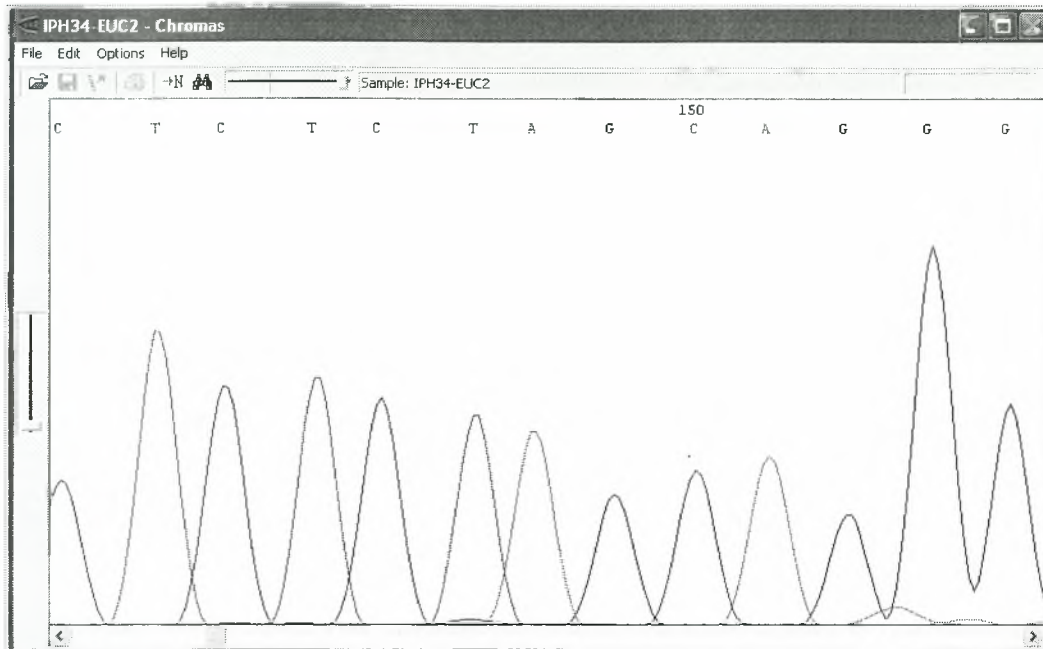
2.10 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των κλινικών στελεχών μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα και εξελικτική τους σχέση συγκριτικά με τις αλληλουχίες προτύπων και κλινικών στελεχών νοροϊών, οι οποίες είναι καταχωρημένες στην 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.

2.10.1 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παραλαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος. 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 αλληλούχησης.



Εικόνα 16: Τυπική εμφάνιση χρωματογραφήματος. Διακρίνονται οι «κορυφές» που αντιστοιχούν στις διαφορετικές βάσεις της αλληλουχίας του DNA.

2.10.2 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 στοιχίσης 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, κι επομένως ομολογίας.

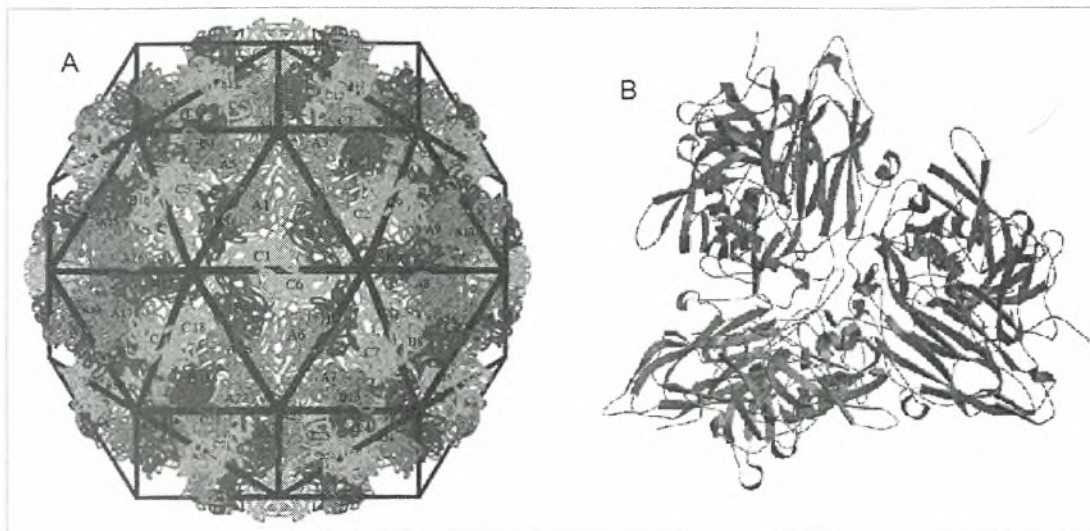
2.10.3 Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών

Το πρώτο βήμα στην ανάλυση των αλληλουχιών και την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων είναι η στοίχιση των υπό μελέτη γενωμικών τμημάτων. Στη παρούσα εργασία η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW, το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>). Επίσης, ιδιαίτερη σημασία έχει η διαχείριση των κενών. Στη παρούσα εργασία η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με τη παρουσία των κενών, καθώς τα αποτελέσματα του ClustalW χρησιμοποιήθηκαν για φυλογενετική μελέτη, η οποία απαιτεί τοπολογική ομολογία. Αυτό σημαίνει ότι τα νουκλεοτίδια που παρατηρούνται σε μία συγκεκριμένη θέση στις διάφορες ταξινομικές βαθμίδες «κατάγονται» από μία συγκεκριμένη θέση ενός κοινού προγόνου. Όταν λοιπόν, δύο ή περισσότερες, υποθετικά ομόλογες αλληλουχίες έχουν διαφορετικό μήκος, τότε η τοποθέτηση των κενών επιτρέπει την ανάκτηση αυτής της τοπολογικής ομολογίας.

Επίσης, με το πρόγραμμα ClustalW πραγματοποιήθηκαν οι στοιχίσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των νοροϊκών στελεχών των κλινικών δειγμάτων που μελετήθηκαν, με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των στελεχών με τα οποία εμφανίζουν την υψηλότερη ομοιότητα αλληλουχίας το καθένα, καθώς επίσης με των προτύπων στελεχών Norwalk (AF093797.1) ή Chiba (AB042808.1) όταν αναμένεται το στέλεχος να ανήκει στην γενετική ομάδα GI και Lordsdale (X86557.1) όταν αναμένεται να ανήκει στην γενετική ομάδα GII. Πραγματοποιήθηκαν ακόμα, οι αντίστοιχες στοιχίσεις μεταξύ αμινοξικών αλληλουχιών για εύρεση των αντικαταστάσεων αμινοξέων. Μέσω των νουκλεοτιδικών στοιχίσεων ανιχνεύθηκαν σημειακές μεταλλάξεις της αλληλουχίας, ενώ σε συνδυασμό με τις αμινοξικές στοιχίσεις, επιβεβαιώθηκε εάν οι μεταλλάξεις αυτές ήταν σιωπηλές ή οδηγούσαν σε αμινοξική αντικατάσταση.

Επιπρόσθετα, το πρόγραμμα Gene Runner V. 3.05 χρησιμοποιήθηκε για την ανάκτηση των αμινοξικών αλληλουχιών από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των στελεχών των δειγμάτων που μελετήθηκαν, ενώ έγινε χρήση και του προγράμματος Rasmol V. 2.7.1.1. Το Rasmol V. 2.7.1.1 (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol>) είναι ένα πρόγραμμα γραφικής απεικόνισης τριτοταγών δομών πρωτεϊνικών μορίων και στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση των αμινοξικών μεταλλαγών στην καψιδιακή περιοχή των ιικών στελεχών των κλινικών δειγμάτων που μελετήθηκαν. Για την απεικόνιση χρησιμοποιήθηκε η κατατεθειμένη στην Protein Data Bank (pdb) δομή του καψιδιακού τμήματος μιας τριγωνικής επιφάνειας

(από τις 20) της 2-3-5 συμμετρίας του εικοσαεδρικού καψιδίου του πρότυπου ιού Norwalk, το οποίο αποτελείται από τρία αντίγραφα της κύριας δομικής πρωτεΐνης VP1, με κωδικό καταχώρησης 1IHM.pdb (εικόνα 17).



Εικόνα 17: Απεικόνιση: (A) της 2-3-5 συμμετρίας του εικοσαεδρικού καψιδίου του πρότυπου ιού Norwalk, (B) της δομής του καψιδιακού τμήματος μιας τριγωνικής επιφάνειας του εικοσαεδρικού καψιδίου του πρότυπου ιού Norwalk, το οποίο αποτελείται από τρία αντίγραφα της κύριας δομικής πρωτεΐνης VP1. Από www.viperdb.scripps.edu.

2.10.4 Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων

Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έγινε με τη μέθοδο Ένωσης Γειτόνων (Neighbor Joining - NJ) χρησιμοποιώντας την παράμετρο p-distance. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη κατασκευή φυλογενετικών δέντρων είναι το MEGA 3.

Η μέθοδος Neighbor Joining είναι μέθοδος πολλαπλής στοίχισης αλληλουχιών με ταυτόχρονη μετατροπή της διαφοροποίησης των αλληλουχιών, για παράδειγμα του ποσοστού των καταλοίπων που διαφέρουν μεταξύ των δύο αλληλουχιών, σε εξελικτική απόσταση. Η στοίχιση πραγματοποιείται προοδευτικά (Progressive Alignment). Αρχικά στοιχίζονται οι δύο πιο συγγενικές αλληλουχίες, ενώ εν συνεχεία, για την προσθήκη των επόμενων αλληλουχιών, οι δύο πρώτες αλληλουχίες αντιμετωπίζονται ως μία. Μετά τη στοίχιση της επόμενης συγγενικής αλληλουχίας, οι τρεις πρώτες αλληλουχίες αντιμετωπίζονται ως μία και ούτω καθεξής. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου NJ είναι ότι δεν χρησιμοποιεί κάποιο υποθετικό μοριακό ρολόι, με αποτέλεσμα να αποδίδει πιο σωστά την φυλογένεση, όταν διαφορετικές γενιές (lineages) παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς τον εξελικτικό τους ρυθμό.

Από την άλλη, η παράμετρος p-distance ή observed distance (παρατηρούμενη απόσταση), όπως διαφορετικά ονομάζεται, εκφράζει την αναλογία των διαφορετικών ομόλογων θέσεων μεταξύ των διαφορετικών αλληλουχιών και εκφράζεται ως ο αριθμός των νουκλεοτιδικών διαφορών ανά θέση. Στηρίζεται στη βασική αρχή της απλούστερης προσέγγισης για τον υπολογισμό της απόκλισης μεταξύ δύο κλώνων στοιχισμένων DNA αλληλουχιών, η οποία είναι η μέτρηση των θέσεων όπου αυτοί διαφέρουν.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΚΑΙ AUTONESTED GoTaq PCR

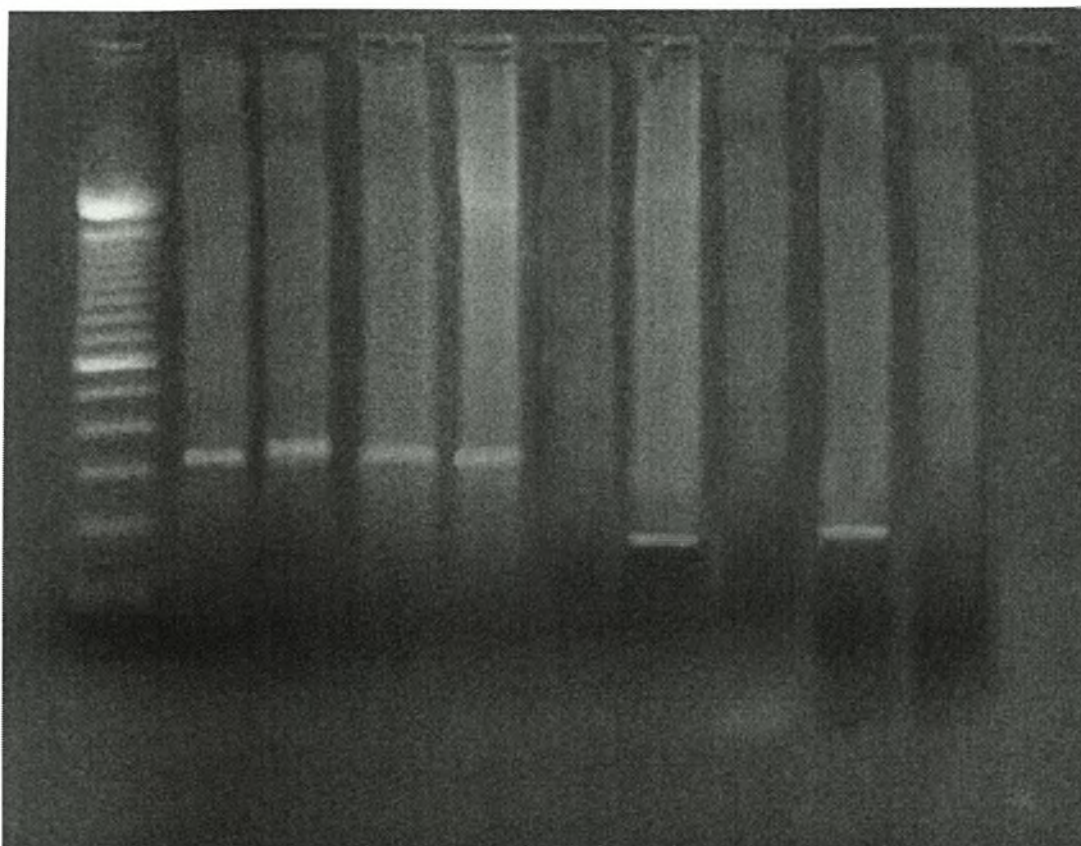
Από τα 8 κλινικά δείγματα τα οποία εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία, κανένα δεν ενισχύθηκε με όλα τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν. Ωστόσο, κάθε κλινικό δείγμα ενισχύθηκε τουλάχιστον με ένα ζεύγος εκκινητικών μορίων στην αντίστοιχη γενωμική περιοχή. Τα θετικά δείγματα ύστερα και από τις αντιδράσεις seminested και autonested PCR παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Δείγμα	Ζεύγος εκκινητών
A6	G2SKF G2SKR
	SRII-2 SRII-3
	mon381 mon383
A7	SRI-2 SRI-3
A10	Calman-29 Calman-32
A12	G2SKF G2SKR
	Calman-29 Calman-32
A15	mon381 mon383
B3	G2SKF G2SKR
1	P78 P80
	Calman-29 Calman-32
	SRI-2 SRI-3
2	SRI-2 SRI-3
	JV12Y JV13I

Πίνακας 9: Θετικά δείγματα ύστερα από τις αντιδράσεις seminested και autonested PCR.

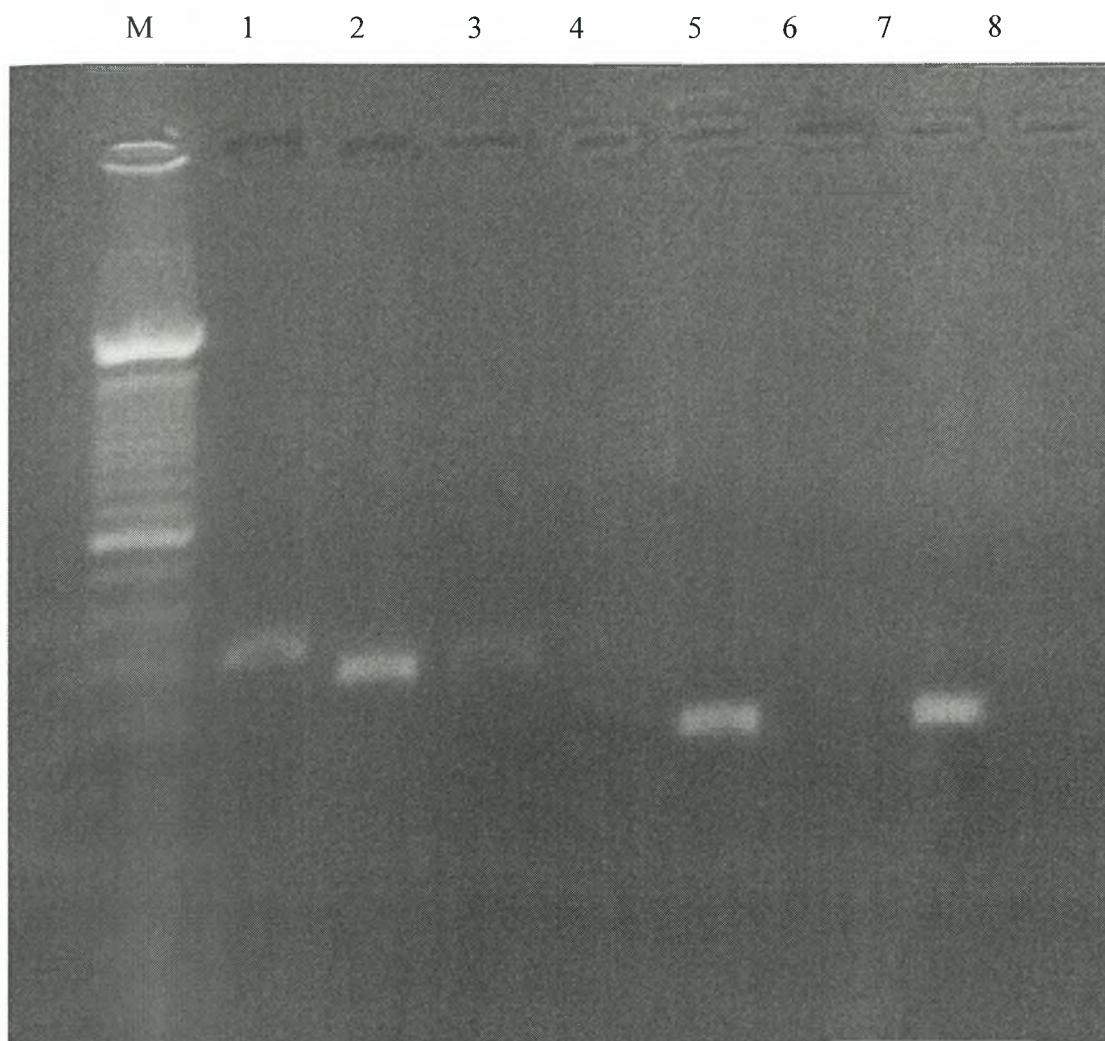
Ενδεικτικά, στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα θετικά αποτελέσματα της autonested PCR με το ζεύγος εκκινητών G2SKF - G2SKR, καθώς επίσης τα δείγματα A7 με το ζεύγος εκκινητών SRI-2 - SRI-3 και A6 με το ζεύγος εκκινητών SRII-2 - SRII-3.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



Εικόνα 18: Εικόνα των autonested και seminested PCR των δειγμάτων A6, A12 και B3 με το ζεύγος εκκινητών G2SKF - G2SKR (θέσεις 2, 3 και 4 αντίστοιχα), του δείγματος A7 με το ζεύγος εκκινητών SRI-2 - SRI-3 (θέση 6) και του A6 με το ζεύγος εκκινητών SRII-2 - SRII-3 (θέση 8). Στη θέση 1 έχει τοποθετηθεί ο θετικός μάρτυρας GII 3 για την autonested PCR με το ζεύγος εκκινητών G2SKF - G2SKR, ενώ στις θέσεις 5, 7 και 9 έχει τοποθετηθεί ο αρνητικός μάρτυρας, ddH₂O, αντίστοιχα για κάθε αντίδραση. Με M συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους.

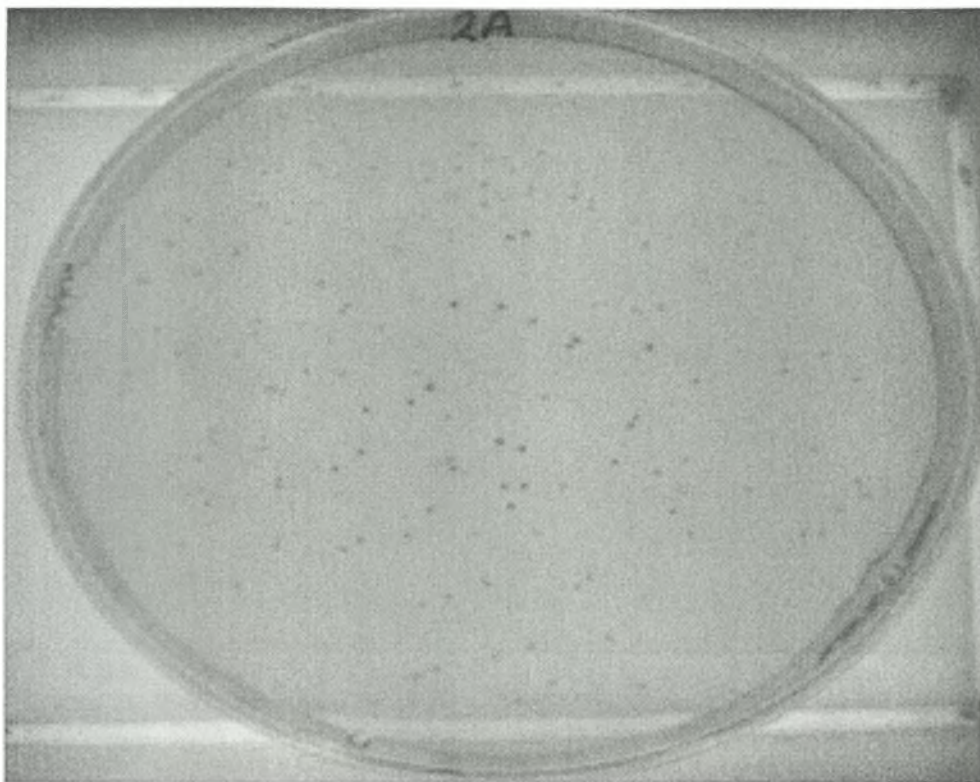
Η αντίδραση autonested GoTaq PCR ήταν θετική σε όλα τα δείγματα όπου εφαρμόστηκε, αφού ενισχύθηκε η ένταση της ζώνης στο πήκτωμα αγαρόζης, γεγονός που αποδεικνύει την αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος της autonested και seminested PCR, αντίστοιχα. Ενδεικτικά, παρακάτω παρουσιάζεται η εικόνα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της autonested GoTaq PCR για τα ίδια δείγματα τα οποία παρουσιάστηκαν στην εικόνα 18.



Εικόνα 19: Εικόνα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της autonested GoTaq PCR για τα ίδια δείγματα τα οποία παρουσιάστηκαν στην εικόνα 18. Με M συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους.

3.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ AUTONESTED GoTaq PCR

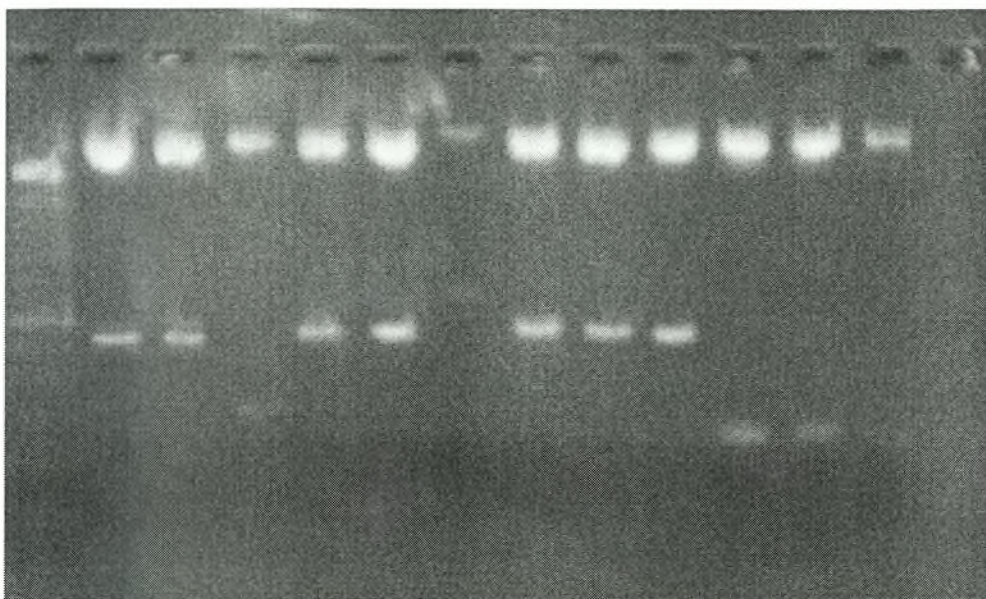
Ένα πρώτο σημείο για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης λιγάσης αλλά και των υπόλοιπων βημάτων της διαδικασίας της μοριακής κλωνοποίησης, είναι η παραγωγή λευκών αποικιών στο τριβλίο της στερεής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων.



Εικόνα 20: Διάκριση μεταξύ μπλε και λευκών αποικιών για τον εντοπισμό ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης. Εδώ, απεικονίζεται το τριβλίο καλλιέργειας για το κλινικό δείγμα 2 ενισχυμένο με το ζεύγος εκκινητών SRI-2 - SRI-3.

Βέβαια, ο έλεγχος επιτυχούς ένθεσης ολόκληρης της αλληλουχίας του επιθυμητού προϊόντος PCR στη θέση ενσωμάτωσης του φορέα κλωνοποίησης πραγματοποιείται με την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Έτσι, μετά την αντίδραση αυτή και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της, το προϊόν της εκχύλισης του πλασμιδιακού DNA από έναν από τους τρεις κλώνους βακτηριακών κυττάρων που συλλέχθηκαν, για τα δείγματα A6 με το ζεύγος εκκινητών G2SKF - G2SKR, B3 με το ζεύγος G2SKF - G2SKR, A12 με το ζεύγος Calman-29 - Calman-32, καθώς και δύο από τους τρεις κλώνους του A15 με το ζεύγος mon381 - mon383, δεν στάλθηκαν για αλληλούχιση. Αυτό ήταν αποτέλεσμα της εμφάνισης μη αναμενόμενου πρότυπου πέψης. Ενδεικτικά, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα, για τον ένα κλώνο του δείγματος A12 με το ζεύγος Calman-29 - Calman-32, εμφανίστηκε μια ζώνη μήκους περίπου 300bp και όχι η αναμενόμενη των 500bp, γεγονός που αποδεικνύει μη σωστή ένθεση της επιθυμητής αλληλουχίας. Θα μπορούσε ίσως να υποδεικνύει την ένθεση μόνο των 300bp της αλληλουχίας στη θέση ενσωμάτωσης του φορέα.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



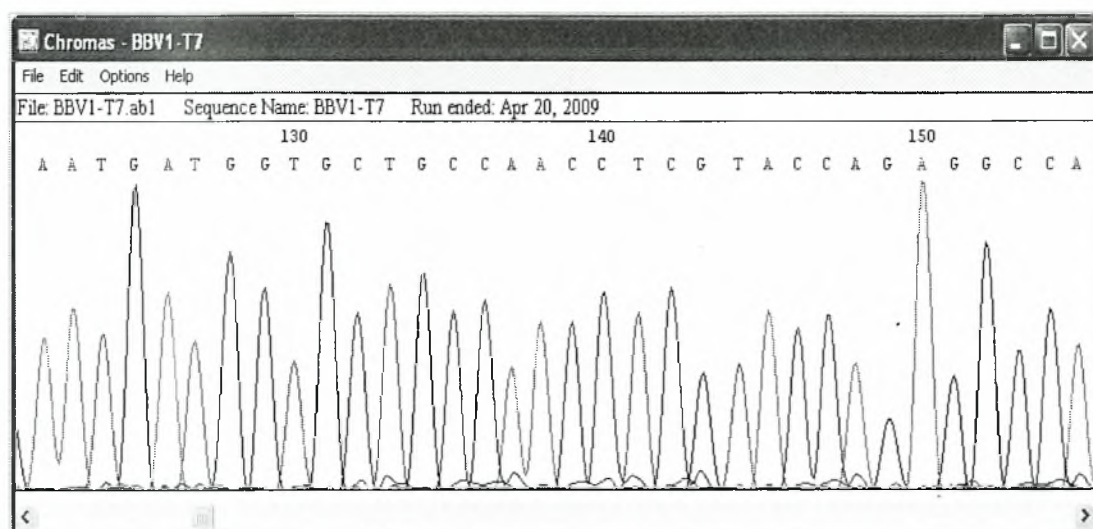
Εικόνα 21: Ενδεικτική εικόνα της πέψης με EcoRI. Στις θέσεις 1 – 3 έχει τοποθετηθεί το πλασμιδιακό DNA από τις 3 βακτηριακές αποικίες του δείγματος A12 με το ζεύγος εκκινητών Calman-29 - Calman-32. Παρομοίως, στις θέσεις 4 – 6 βρίσκεται το δείγμα A10 με το ζεύγος εκκινητών Calman-29 - Calman-32, στις θέσεις 7 – 9 το δείγμα 1 με το ζεύγος εκκινητών Calman-29 - Calman-32 και στις θέσεις 10 – 12 το δείγμα A6 με το ζεύγος εκκινητών SR11-2 - SR11-3. Τα δείγματα στις θέσεις 3 και 6 δεν εμφάνισαν το αναμενόμενο πρότυπο πέψης, δηλαδή μια ζώνη μεγέθους ίση με την κλωνοποιημένη αλληλουχία, εκτός της ζώνης του φορέα ο οποίος εμφανίζεται στο πήκτωμα πάνω από το όριο διαχωρισμού του μάρτυρα, καθώς έχει μέγεθος άνω των 3000bp. Με M συμβολίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους.

3.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ ΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Έπειτα από την λήψη του χρωματογραφήματος, την επεξεργασία της αλληλουχίας και την αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας, αποδείχθηκε ότι κάποια από τα κλωνοποιημένα προϊόντα PCR από τα κλινικά δείγματα δεν εμφάνιζαν καμία ομοιότητα στην αλληλουχία τους με κάποιο κατατεθειμένο στις γενετικές βάσεις δεδομένων στέλεχος νοροϊού. Σε άλλα δείγματα, όμως, η κάθε κλωνοποιημένη αλληλουχία αντιπροσώπευε ένα διαφορετικό νοροϊκό στέλεχος, ακόμα και όταν αυτές προέρχονταν από το ίδιο κλινικό δείγμα, αποδεικνύοντας ταυτόχρονη μόλυνση με άνω του ενός στελέχους στο ίδιο άτομο. Τα θετικά στελέχη νοροϊών τα οποία προέκυψαν αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα.

Κλινικό δείγμα προέλευσης	Στελέχη νοροϊών	Γενωμικό τμήμα, μέρος του οποίου αλληλουχίστηκε
A6 με G2SKF - G2SKR	BBV1	ORF1 (RdRp) , ORF2 (VP1)
	BBV2	
A6 με SR11-2 - SR11-3	BBV22	ORF1 (RdRp)
	BBV23	
	BBV24	
A6 με mon381 - mon383	BBV26	ORF2 (VP1)
1 με P78 - P80	BBV35	ORF1 (NTPase)
	BBV36	
	BBV37	

Πίνακας 10: Εντοπισμός στελεχών των κλινικών δειγμάτων.



Εικόνα 22: Ενδεικτική απεικόνιση χρωματογραφήματος για το στέλεχος BBV1.

3.4 ΕΥΡΕΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΙΣ ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ORF1 ΚΑΙ ORF2

Όπως έχει αναφερθεί, μέσω του προγράμματος ClustalW πραγματοποιήθηκε η ομοπαράθεση των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών των στελεχών που προέκυψαν στην παρούσα εργασία με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των στελεχών με τα οποία εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ομοιότητα αλληλουχίας, αλλά και με τριών προτύπων στελεχών με σκοπό την εύρεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών μεταλλάξεων. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία των στελεχών BBV36 και BBV37 ομοπαράτεθηκε με την αλληλουχία του πρότυπου ιού Chiba γενετικής ομάδας GI

(κωδικός καταχώρισης GenBank AB022679), ενώ η αλληλουχία του στελέχους BBV35 με εκείνη του πρότυπου ιού Norwalk γενετικής ομάδας GI (κωδικός καταχώρισης GenBank M87661). Οι αλληλουχίες όλων των υπόλοιπων στελεχών ομοπαράτεθηκαν με την αλληλουχία του πρότυπου ιού Lordsdale γενετικής ομάδας GII (κωδικός καταχώρισης GenBank X86557).

Ενδεικτικά, παρατίθεται παρακάτω το αποτέλεσμα της ομοπαράθεσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του στελέχους BBV22 με τον ιό Lordsdale, ενώ φαίνεται και η ομοιότητα της αλληλουχίας του με ένα κατατεθειμένο στη GenBank στέλεχος νοροϊού, απομονωμένο από το Μαϊάμι, με αριθμό καταχώρισης AF414410.1.

BBV22 AF414410.1 LORSDALE	----- ----- TTTGGCCAGATAGTTGCAGAAGACC TTCTATCTCCTAGTGTGATGGATGTGGGTGACTT	4440
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	----- ----- CAAAATATCAATCAATGAGGGCCTTCCCTCTGGTGTGCCCTGCACCTCTCAATGGAATTC	4500
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	-----ATTCTAACTTTGAGTGCAATGGCAGAAAGTGTGAGGTCCTCACCAGA -----ATTCTAACTTTGAGTGCAATGGCAGAAAGTGTGAGGTCCTCACCAGA CATCGCCCACTGGCTCCTCACTCTGTGCACCTCTCGAAGTTACAAAACCTGTCCCTGA	47 47 4560
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	TGTTGTCCAAGCCCACTCCTGTTTTCTTTTTATGGTGTGATGATGAGATCGTCAGCAATGA TGTTGTCCAAGCCCACTCCTGTTTTCATTTTATGGTGTGATGATGAGATCGTTAGCACTGA CATCATACAGGCTAAATCCCTCTTTTCTCTATGGTGTGATGATGAAATGTTCAGTACAGA	107 107 4620
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	CATCAACCTTGATCCCATGAAGTTGACACAGAAAACCTCAGAGAGTATGGTCTGGTCCCCAC TATCAACCTTGACCCCATGAAGTTGACACAGAAAACCTCAGGGAGTATGGTCTGGTCCCCAC TATAAAC TTA AACCCAGAGAAA ACTAACAGCAAAGCTCAAGGAATACGGGTTGAAACCAAC	167 167 4680
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	CCGACCTGACAAAACCTGAAGGCCCCCTCGTAATAACTGAAGACCTCACC GGCC TGACATT CCGACCTGACAAAACCTGAAGGTCCCTCGTGATAACTGAAGACCTCACC GGCC TGACGTT CCGCCCTGACAAAACCTGAGGGACCCCTTATTATCTCTGAAGACCTGAACGGCCCTCACCTT	227 227 4740
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	CCTGCGTAGGTCAATTGCACGAGACCCAGCAGGTTGGTTGGTAAA----- CCTGCGCAGGTTCGATTGCACGGGATCCAGCTGGGTGGTTTGGAAAATTAGACCAAGACTC CCTGCGGAGGACTGTGACCCGC GACCCAGCTGGTTGGTTTGGAAAACCTGGATCAGAGCTC	273 287 4800
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	----- AATTCTCAGGCAATTATACTGGACAAGGGGGCCCAATCATGAGAACCATACGAGAGCAT AATAC TTAGGCAAATGTACTGGACTAGAGGCCCAATCATGAAGACCCATCTGAAACAAT	347 4860
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	----- GGTCCCTCATTCTCAGCGGGCTACACAGCTCATGGCCCTGCTTGGTGAGGCTTCACTGCA GATACCACACTCCCAAAGACCCATACAACTAATGTCTTTGCTGGGCGAGGCCGCACCTCCA	407 4920

Εικόνα 23: Ενδεικτική απεικόνιση της ομοπαράθεσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας από το στέλεχος BBV22 με τον πρότυπου ιού Lordsdale και του στελέχους νοροϊού με αριθμό καταχώρισης AF414410.1.

Επίσης, παρακάτω απεικονίζεται το αποτέλεσμα της ομοπαράθεσης των αντίστοιχων αμινοξικών αλληλουχιών.

BBV22 AF414410.1 LORSDALE	----- MIRCARAFGGLMDELKAHCVTLP IRVGMNMNEDGPIIFERHSRYKYHYDADYSRW DSTQQ	1440
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	----- RAVLA AALEIMVKFSPEPHLAQIVAEDLLSPSVMDVGD FKISINEGLPSGVPCTSQWNSI	1500
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	---IL T L S A M A E V S G L S P D V V Q A H S C F S F Y G D D E I V S N D I N L D P M K L T Q K L R E Y G L V P T R ---IL T L S A M A E V S G L S P D V V Q A H S C F S F Y G D D E I V S T D I N L D P M K L T Q K L R E Y G L V P T R A H W L L T L C A L S E V T N L S P D I I Q A N S L F S F Y G D D E I V S T D I N L N P E K L T A K L K E Y G L K P T R :***.**:**.:****:***:*****:***:* ** ***:**** **	57 57 1560
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	P D K T E G P L V I T E D L T G L T F L R R S I A R D P A G W F G K ----- P D K T E G P L V I T E D L T G L T F L R R S I A R D P A G W F G K L D Q S I L R Q L Y W T R G P N H E N P Y E S M V P D K T E G P L I I S E D L N G L T F L R R T V T R D P A G W F G K L D Q S S I L R Q M Y W T R G P N H E D P S E T M I *****:**:**.:****:***:*****:***:*****	91 117 1620
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	----- P H S Q R A T Q L M A L L G E A S L H G P Q F Y K K V S K M V I S E I K S G G L E F Y V P R Q E A M F R W M R F S D L S P H S Q R P I Q L M S L L G E A A L H G P A F Y S K I S K L V I A E L K E G G M D F Y V P R Q E P M F R W M R F S D L S	177 1680
BBV22 AF414410.1 LORSDALE	----- T W E G D R N L A P E G V N E D G V E T W E G D R N L A P S F V N E D G V E	196 1699

Εικόνα 24: Ενδεικτική απεικόνιση της ομοπαράθεσης της αμινοξικής αλληλουχίας από το στέλεχος BBV22 με του προτύπου ιού Lordsdale και του στελέχους νοροϊού με αριθμό καταχώρισης AF414410.1.

Από την παραπάνω διαδικασία, λοιπόν, ανιχνεύθηκαν, για κάθε στέλεχος, οι αμινοξικές αντικαταστάσεις οι οποίες αναφέρονται στους πίνακες 11 και 12, ενώ αναφέρονται επίσης οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας οι οποίες οδηγούν στην αντίστοιχη αντικατάσταση αμινοξέος.

ORF1		
Στέλεχος	Μη συνώνυμη μετάλλαξη	Αντικατάσταση αμινοξέος
BBV1	A5045T, G5047T	Thr1681Ser
	A5075G, G5076A, C5077G	Ser1691Glu
	T5078G	Phe1692Val
BBV2	A5045T, G5047T	Thr1681Ser
	A5075G, G5076A, C5077G	Ser1691Glu
	T5078G, T5079G	Phe1692Gly
BBV22	C4580T, T4581G, C4582T	Leu1526Cys
	C4617A, A4618T	Thr1538Asn
	A4631G, C4633T	Asn1543Asp
	G4637A, A4638T	Glu1545Met
	G4649C, C4650A, A4651G	Ala1549Gln
	A4659G, G4660A	Lys1552Arg
	A4673G, A4674T, A4675C	Lys1557Val
	A4709G, T4711A	Ile1569Val
	T4715A	Ser1571Thr
	A4728C	Asn1575Thr
	A4751T, T4753A	Thr1583Ser
	G4754A, G4756T	Val1584Ile
	A4757G, C4759A	Thr1585Ala

BBV23	C4580T, T4581G, C4582T	Leu1526Cys	
	T4584A, T4585C	Phe1527Tyr	
	A4606T	Glu1534Asp	
	A4631G, C4633T	Asn1543Asp	
	G4637A, A4638T	Glu1545Met	
	G4649C, C4650A, A4651G	Ala1549Gln	
	A4659G, G4660A	Lys1552Arg	
	A4673G, A4674T, A4675C	Lys1557Val	
	A4709G, T4711A	Ile1569Val	
	T4715A	Ser1571Thr	
	A4728C	Asn1575Thr	
	A4751T, T4753A	Thr1583Ser	
	G4754A, G4756T	Val1584Ile	
	A4757G, C4759A	Thr1585Ala	
	BBV24	C4580T, T4581G, C4582T	Leu1526Cys
G4619A, T4621C		Asp1539Asn	
A4631G, C4633T		Asn1543Asp	
G4637A, A4638T		Glu1545Met	
G4649C, C4650A, A4651G		Ala1549Gln	
A4659G, G4660A		Lys1552Arg	
A4673G, A4674T, A4675C		Lys1557Val	
C4676T, A4678C		Pro1558Ser	
A4709G, T4711A		Ile1569Val	
T4715A		Ser1571Thr	
A4728C		Asn1575Thr	
A4751T, T4753A		Thr1583Ser	
G4754A, G4756T		Val1584Ile	
A4757G, C4759A		Thr1585Ala	
BBV35		A1673C, G1675A	Met557Leu
	A1676G	Met558Val	
	T1679A, G1680T	Cys559Ile	
	C1748T	Arg582Trp	
	G1787A, T1788A	Val595Lys	
	T1794A	His597Gln	
	G1812A, A1813T	Gly603Asp	
	A1833T, C1834T	Asp610Val	
	G1866A	Met614Ile	
	A1667C, G1669A	Met555Leu	
	A1670G	Met556Val	
	T1673A, G1674T	Cys557Ile	
BBV36	C1704G	Ala567Gly	
	T1841A, A1843C	Ser613Thr	
	G1850C, C1851A, C1852G	Ala616Gln	
	T1855A	Asp617Glu	
	A1857T	Asp618Val	
	A1886T, A1888G	Thr628Ser	
	A1916T, T1918A	Ile638Leu	
	A1923C, G1924C	Lys640Thr	
	T1931A, A1933G	Leu643Met	
	BBV37	A1667C, G1669A	Met555Leu
		A1670G	Met556Val
		T1673A, G1674T	Cys557Ile
T1712C, C1714T		Tyr570His	
T1767A, G1768T		Val588Asp	

	A1809T, A1810G	Glu602Val
	T1841A, A1843C	Ser613Thr
	G1850C, C1851A	Ala616Gln
	T1855A	Asp617Glu
	A1886T, A1888G	Thr628Ser
	G1924C	Lys640Asn
	T1931A, A1933G	Leu643Met

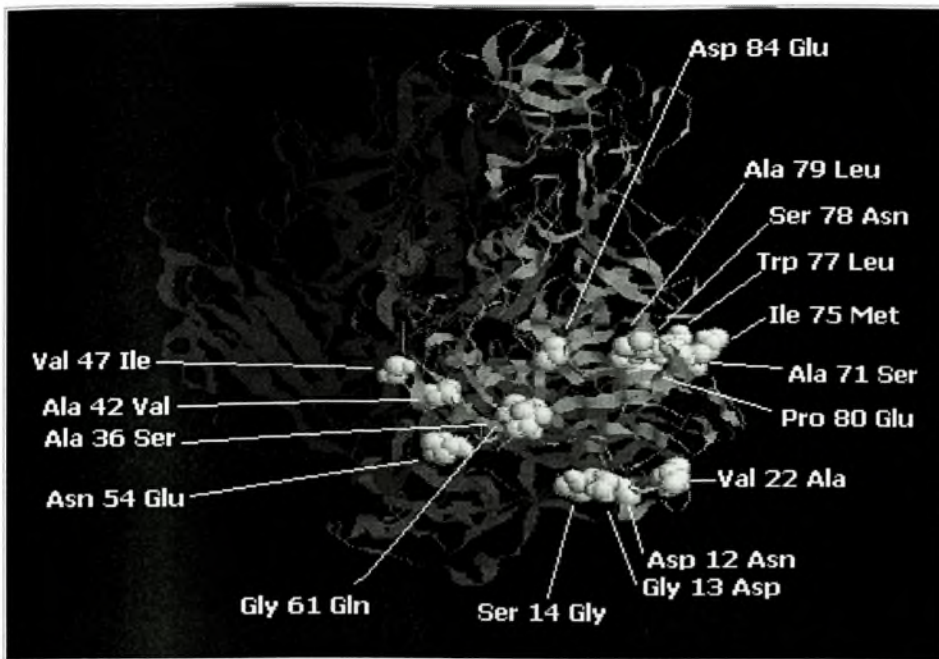
Πίνακας II: Νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις και αμινοξικές αντικαταστάσεις των στελεχών στο ενισχυμένο τμήμα του ORF1. Οι αριθμοί παριστάνουν τις θέσεις των αντικαταστάσεων. Με μπλε χρώμα παριστάνονται τα νουκλεοτίδια ή τα αμινοξέα του πρότυπου ιού ενώ με κόκκινο τα αλλαγμένα νουκλεοτίδια ή αμινοξέα των στελεχών που μελετήθηκαν.

ORF2		
Στέλεχος	Μη συνώνυμη μετάλλαξη	Αντικατάσταση αμινοξέος
BBV1	G5118A	Asp12Asn
	G5122A, G5123T	Gly13Asp
	T5024G, C5025G, C5026T	Ser14Gly
	T5149C	Val22Ala
	G5190T, T5192A	Ala36Ser
	C5209T, G5210C	Ala42Val
	G5223A	Val47Ile
	A5244G, C5246A	Asn54Glu
	G5265C, G5266A, T5267G	Gly61Gln
	G5295T, T5297G	Ala71Ser
	A5309G	Ile75Met
	G5314T, G5315A	Trp77Leu
	G5317A, C5318T	Ser78Asn
	G5319C, C5320T, G5321T	Ala79Leu
	C5322G, C5323A, C5324A	Pro80Glu
BBV2	T5336G	Asp84Glu
	G5118A	Asp12Asn
	G5122A, G5123T	Gly13Asp
	T5024G, C5025G, C5026T	Ser14Gly
	T5149C	Val22Ala
	G5190T, T5192A	Ala36Ser
	C5209T, G5210C	Ala42Val
	A5221T	Asn46Ile
	G5223A	Val47Ile
	A5230G	Asp49Gly
	A5244G, C5246A	Asn54Glu
	G5265C, G5266A, T5267G	Gly61Gln
	G5295T, T5297G	Ala71Ser
	A5309G	Ile75Met
	G5314T, G5315A	Trp77Leu
G5317A, C5318T	Ser78Asn	
G5319C, C5320T, G5321T	Ala79Leu	
C5322G, C5323A, C5324A	Pro80Glu	
BBV26	T5336G	Asp84Glu
	C5349A, T5351A	Leu89Ile
	T5391A, T5393G	Phe103Met
	G5394C, A5396G	Glu104Gln
	G5397C, G5399T	Val105Leu
G5438A	Val119Ile	

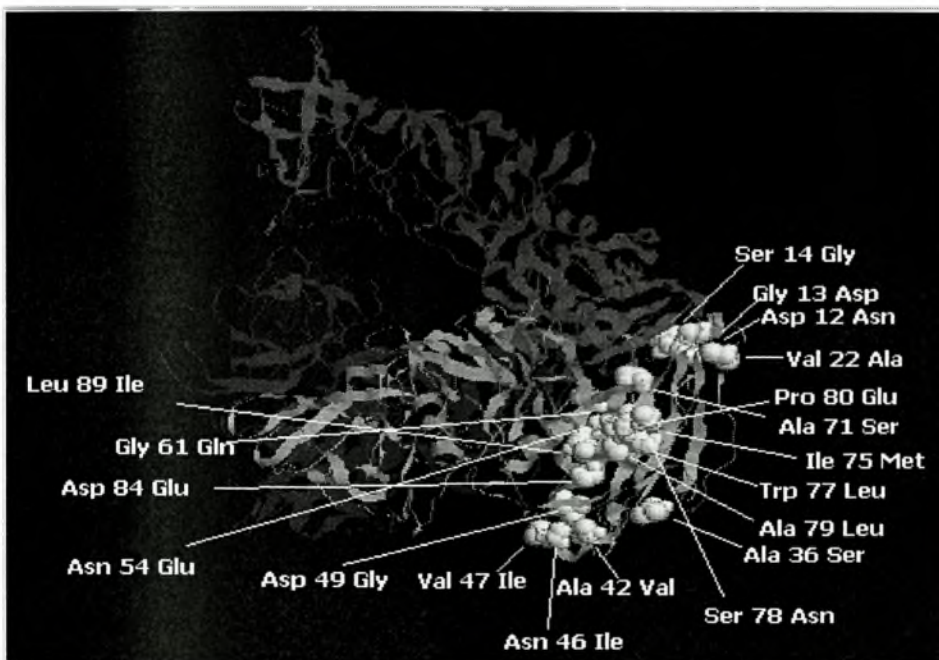
G5454A, C5456A	Val124Ile
C5457A	Pro125Thr
A5463C, C5465T	Asn127His
A5472G, C5473T, T5474A	Thr130Val
G5478A, G5479A	Gly132Asn
T5481A, A5483C	Leu133Ile
C5487G, C5489A	Pro135Ala
A5490G, G5491T	Ser136Val
G5495A, T5497A	Val138Ile
T5506G	Phe141Cys
A5514G	Ile144Val
A5550C, C5552G	Ile156Leu
C5556T, A5558C	Leu158Phe
T5564G	Asp160Glu
G5565A, T5567A	Val161Ile
A5575G, T5576G	Asn164Arg
A5581T	Tyr166Phe
C5596A, A5597G	Ala171Glu
G5601A, A5602C, T5603C	Asp173Thr
A5607C, C5608G, C5609G	Thr175Arg
C5610A, C5612G	Leu176Met
A5614G, G5615A	Lys177Arg
A5619G, A5621G	Ile179Val
A5652T, C5657T	Ala191Ser
T5670C	Phe196Leu

Πίνακας 12: Νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις και αμινοξικές αντικαταστάσεις των στελεχών στο ενισχυμένο τμήμα του ORF2. Οι αριθμοί παριστάνουν τις θέσεις των αντικαταστάσεων. Με μπλε χρώμα παριστάνονται τα νουκλεοτίδια ή τα αμινοξέα του πρότυπου ιού ενώ με κόκκινο τα αλλαγμένα νουκλεοτίδια ή αμινοξέα των στελεχών που μελετήθηκαν.

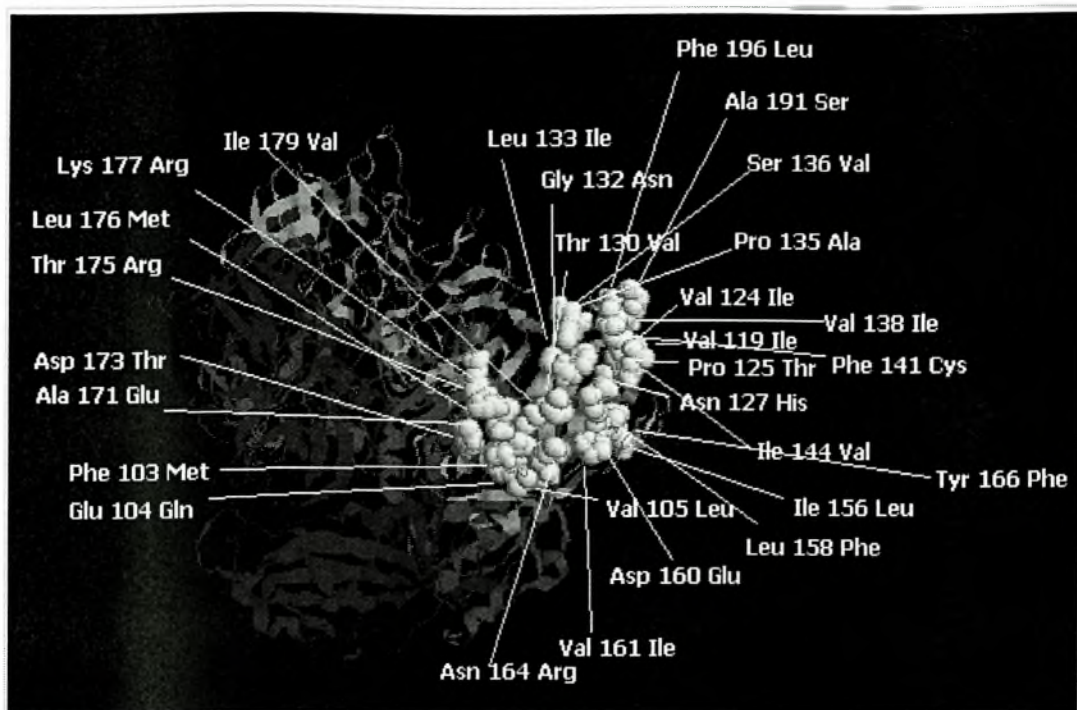
Επίσης, στις παρακάτω εικόνες, για κάθε στέλεχος από εκείνα τα οποία αλληλουχήθηκαν στην γενωμική περιοχή ORF2, απεικονίζονται οι θέσεις των αμινοξικών αντικαταστάσεων της VP1 όπως οπτικοποιήθηκαν με χρήση του προγράμματος Rasmol V. 2.7.1.1, οι οποίες εντοπίζονται στην επικράτεια S της κύριας καψιδιακής πρωτεΐνης, αφού η γενωμική περιοχή της P επικράτειας της πρωτεΐνης δεν έχει ενισχυθεί μέσω των αντιδράσεων PCR από τα ζεύγη εκκινητών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν.



Εικόνα 25: Απεικόνιση αμινοξικών αντικαταστάσεων του στελέχους BBV1 στο γενωμικό τμήμα στην περιοχή του ORF2 που ενισχύθηκε με τους εκκινητές G2SKF - G2SKR και αλληλουχήθηκε. Το κάθε ένα μόριο VP1 πρωτεΐνης απεικονίζεται υπό μορφή διαγράμματος κορδέλας και είναι χρωματισμένο με μπλε, κόκκινο ή πράσινο χρώμα. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο με κίτρινο χρώμα (σε ένα μόριο πρωτεΐνης).



Εικόνα 26: Απεικόνιση αμινοξικών αντικαταστάσεων του στελέχους BBV2 στο γενωμικό τμήμα στην περιοχή του ORF2 που ενισχύθηκε με τους εκκινητές G2SKF - G2SKR και αλληλουχήθηκε. Το κάθε ένα μόριο VP1 πρωτεΐνης απεικονίζεται υπό μορφή διαγράμματος κορδέλας και είναι χρωματισμένο με μπλε, κόκκινο ή πράσινο χρώμα. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο με κίτρινο χρώμα (σε ένα μόριο πρωτεΐνης).



Εικόνα 27: Απεικόνιση αμινοξικών αντικαταστάσεων του στελέχους BBV26 στο γενωμικό τμήμα στην περιοχή του ORF2 που ενισχύθηκε με τους εκκινητές mon381 - mon383 και αλληλουχήθηκε. Το κάθε ένα μόριο VP1 πρωτεΐνης απεικονίζεται υπό μορφή διαγράμματος κορδέλας και είναι χρωματισμένο με μπλε, κόκκινο ή πράσινο χρώμα. Οι αμινοξικές αλλαγές αναπαρίστανται με το χωροπληρωτικό μοντέλο με κίτρινο χρώμα (σε ένα μόριο πρωτεΐνης).

3.5 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Στα φυλογενετικά δένδρα που αρχικά κατασκευάστηκαν για την ταξινόμηση κάθε στελέχους σε επίπεδο γενετικής ομάδας, κάθε κλινικό στέλεχος ταξινομήθηκε στην γενετική ομάδα GI ή GII, όπως παρατηρείται από την φυλογενετική συσχέτισή τους με τα πρότυπα στελέχη νοροϊών.

Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος BBV1 ταξινομείται στην ομάδα όπου ανήκουν τα πρότυπα της GII γενετικής ομάδας, όπως οι ιοί Lordsdale, Snow Mountain και Hawaii. Αν και εμφανίζει μονοφυλετική σχέση με τα άλλα στελέχη καθώς δεν σχηματίζει υποομάδα με κάποιο από αυτά, τα κοντινότερα φυλογενετικά στελέχη με αυτό είναι εκείνα με αριθμούς καταχώρησης στη GenBank EU137732.1 και EU137733.1, αντίστοιχα. Τα στελέχη αυτά έχουν απομονωθεί πρόσφατα, το 2006, από ανθρώπινα κλινικά δείγματα κοπράνων στο Βιετνάμ. Ακόμη, το στέλεχος με αριθμό καταχώρησης AY646867.1 που ταξινομείται στην αμέσως πιο κοντινή υποομάδα, έχει απομονωθεί από την Ταϊλανδή. Τα δεδομένα αυτά ίσως υποδεικνύουν

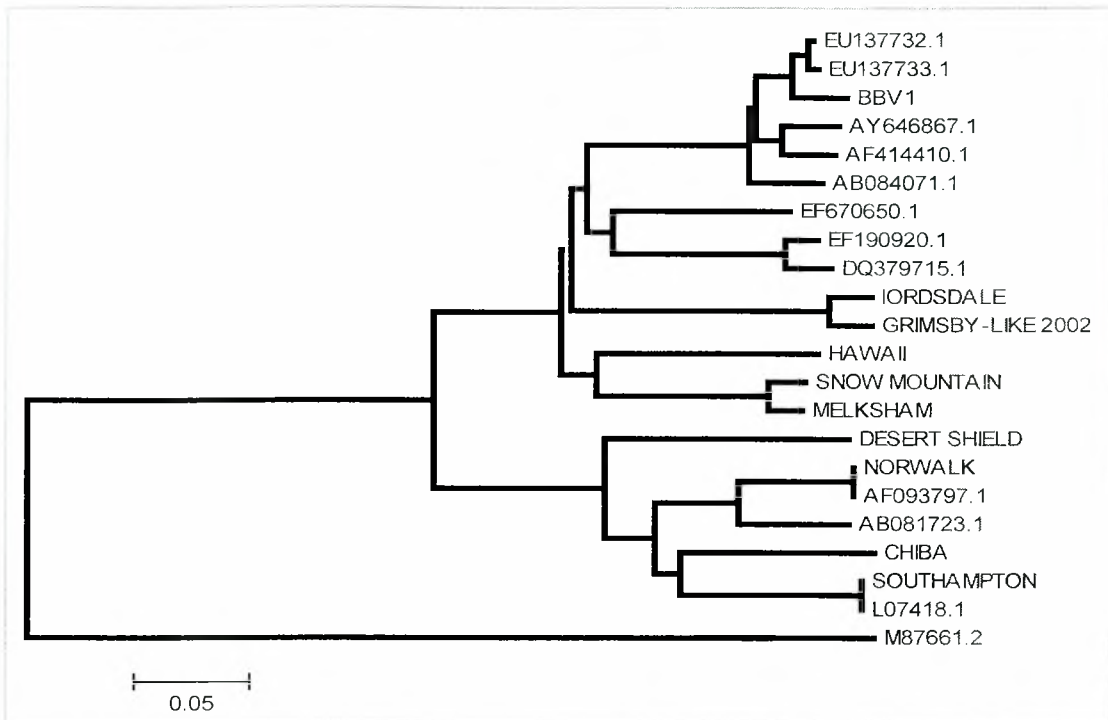
μια γεωγραφική εξάπλωση κάποιου κοινού προγονικού στελέχους από την Ασία προς την ανατολική Ευρώπη. Το στέλεχος με αριθμό καταχώρισης AF414410.1 είναι το αναγνωρισμένο ως GII στέλεχος Miami, στοιχειοθετώντας την ταξινόμηση του BBV1 στην γενετική ομάδα II των νοροϊών. Το στέλεχος BBV2 ακολουθεί επίσης μονοφυλετική κατανομή στην GII γενετική ομάδα με κοντινότερο ταξινομικά στέλεχος εκείνο με αριθμό καταχώρισης AB084071.1, το οποίο έχει απομονωθεί στην πόλη Gifu της Ιαπωνίας από άνθρωπο. Τα επόμενα κοντινά του φυλογενετικά στελέχη είναι κοινά με εκείνα του BBV1, συμπεριλαμβανομένου εκείνου το οποίο προέρχεται από την Ταϊλανδή, υποδεικνύοντας πως και τα δύο αυτά στελέχη συνδέονται με την γεωγραφική εξάπλωση κάποιου σχετιζόμενου με αυτά στελέχους σε περιοχές της Ασίας.

Επίσης, το στέλεχος BBV22 ταξινομείται στην γενετική ομάδα GII καθώς ανήκει στον κύριο φυλογενετικό κλάδο στον οποίο ταξινομείται το GII στέλεχος Miami (AF414410.1), ωστόσο ο διαχωρισμός των προτύπων στελεχών της GII ομάδας σε χωριστό γενετικό κλάδο, αποδεικνύει την υψηλή απόκλιση της αλληλουχίας του στελέχους από εκείνη των συγκεκριμένων προτύπων. Τα στελέχη με αριθμούς καταχώρισης EF190920.1, DQ304651.1 και EF670650.1, τα οποία είναι επίσης κατανεμημένα στον ίδιο κύριο φυλογενετικό κλάδο με το BBV22, έχουν απομονωθεί από περιοχές της Ασίας το 2003, το 2004 και το 2006, αντίστοιχα, επιτρέποντας ίσως την υπόθεση πως αυτός ο κύριος φυλογενετικός κλάδος ο οποίος δημιουργήθηκε, περιλαμβάνει τα νεότερα απομονωμένα GII στελέχη, ενώ διακρίνεται ότι και αυτό το στέλεχος σχετίζεται με στελέχη ασιατικής προέλευσης. Βέβαια, όπως και τα προηγούμενα, το BBV22 στέλεχος δεν κατατάσσεται σε κάποια υπάρχουσα γενετική υποομάδα. Το φυλογενετικό πρότυπο για τα BBV23 και BBV24 στελέχη είναι παρόμοιο με εκείνο του BBV22.

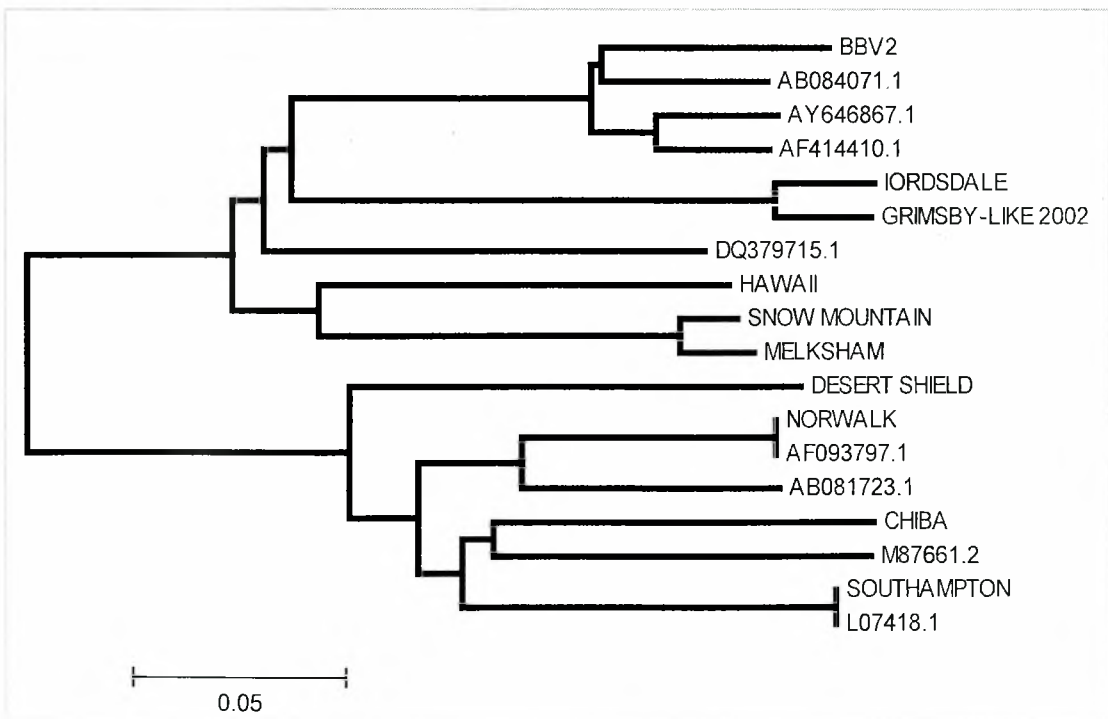
Όσον αφορά το στέλεχος BBV26, φαίνεται πως κατατάσσεται και αυτό στην GII γενετική ομάδα ενώ ανήκει σε χωριστό φυλογενετικό κλάδο από τα υπόλοιπα στελέχη. Η κοντινότερη φυλογενετικά, σε αυτό, αλληλουχία είναι εκείνη με τον αριθμό καταχώρισης AB078337.1, που αντιπροσωπεύει το γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης νοροϊού.

Τα στελέχη BBV35, BBV36 και BBV37 παρουσίασαν όμοια ταξινομική κατάταξη. Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν στον κύριο φυλογενετικό κλάδο όπου ανήκουν πρότυπα της ομάδας GI, όπως ο Norwalk και ο Chiba, ενώ δεν σχημάτισαν υποομάδα με κάποιο άλλο στέλεχος, ανήκουν δηλαδή σε χωριστή ταξινομική ομάδα.

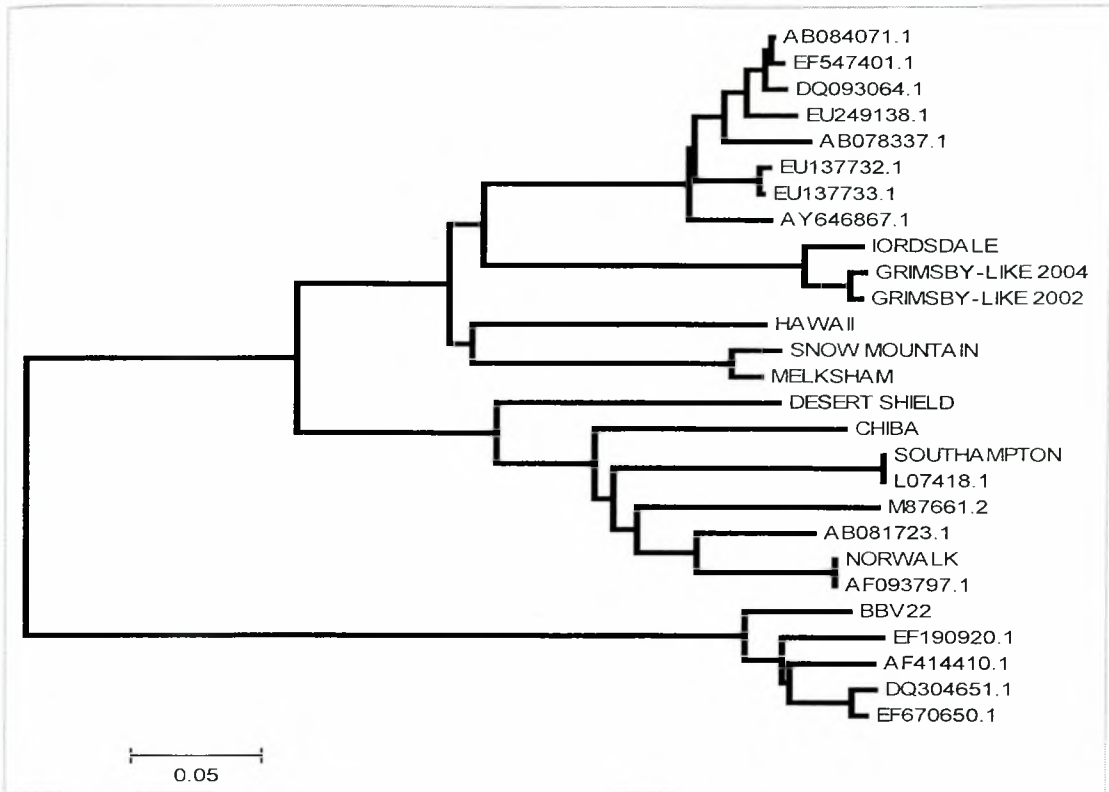
Η κοντινότερη φυλογενετικά αλληλουχία είναι εκείνη με τον αριθμό καταχώρισης M87661.2, που αντιπροσωπεύει το γονιδίωμα του ιού Norwalk.



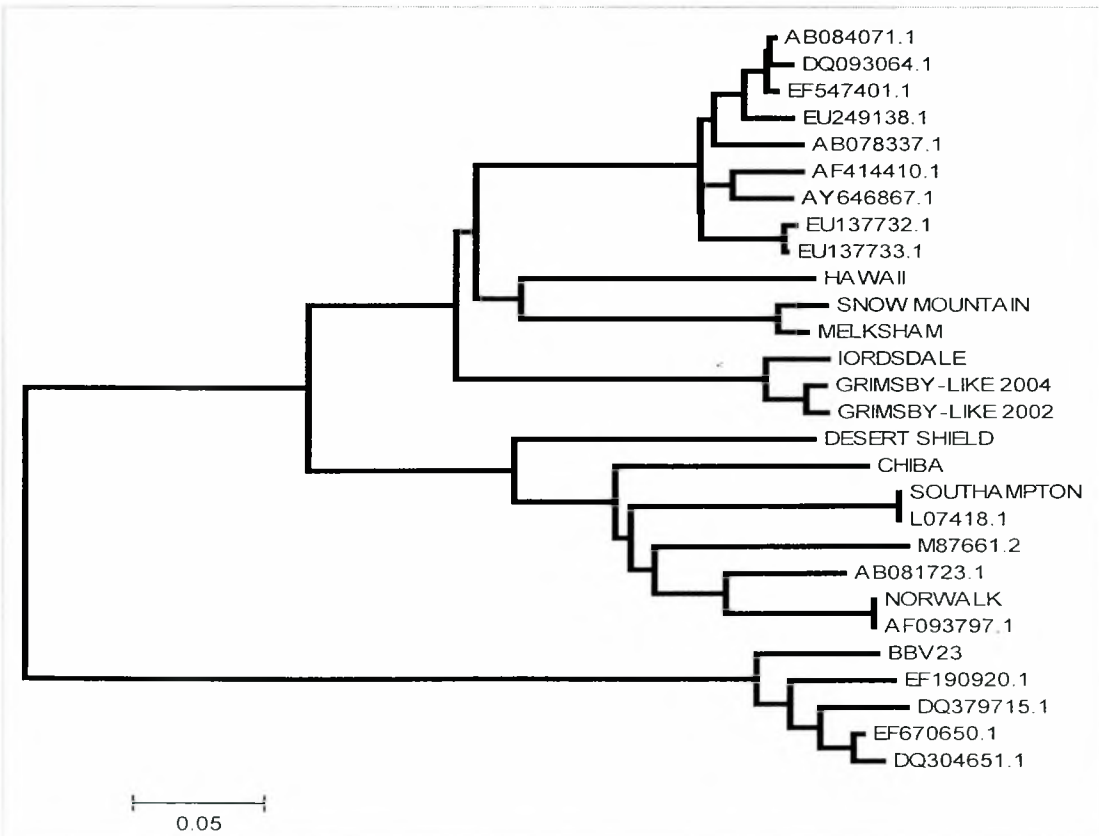
Σχήμα 1: Φυλογένεση του BBV1 στελέχους.



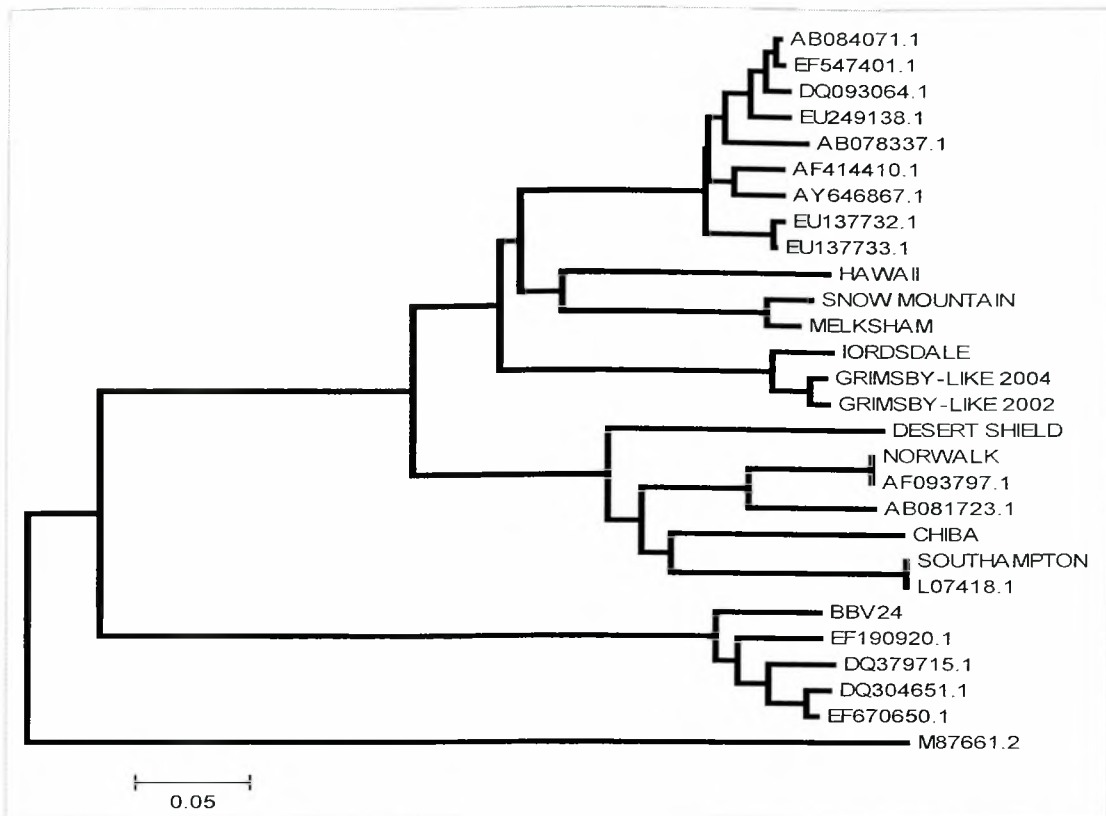
Σχήμα 2: Φυλογένεση του BBV2 στελέχους.



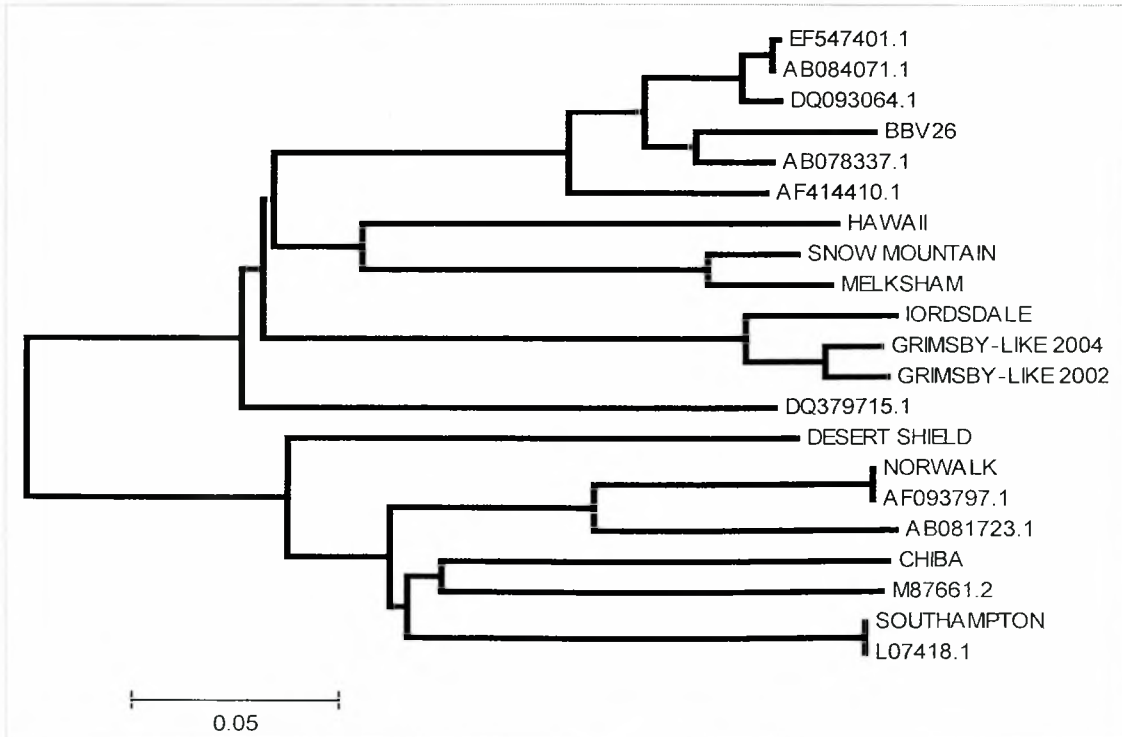
Σχήμα 3: Φυλογένεση του BBV22 στελέχους.



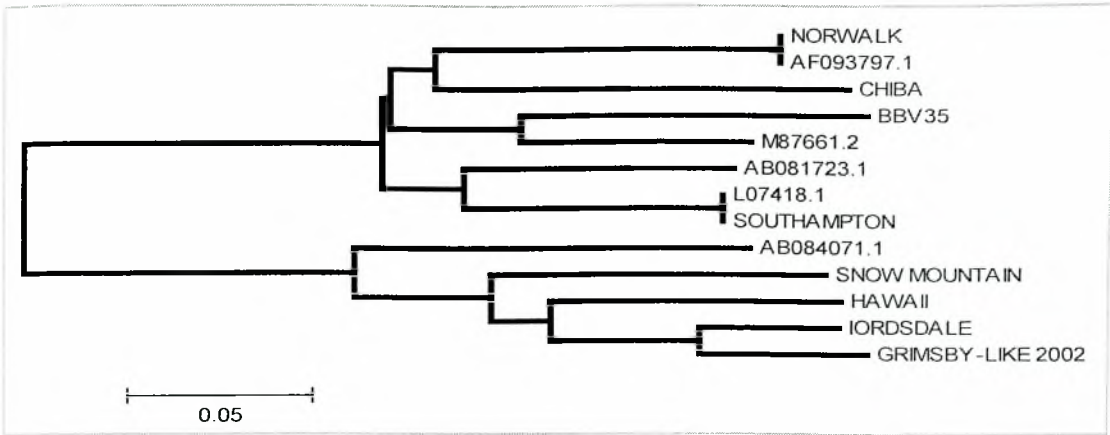
Σχήμα 4: Φυλογένεση του BBV23 στελέχους.



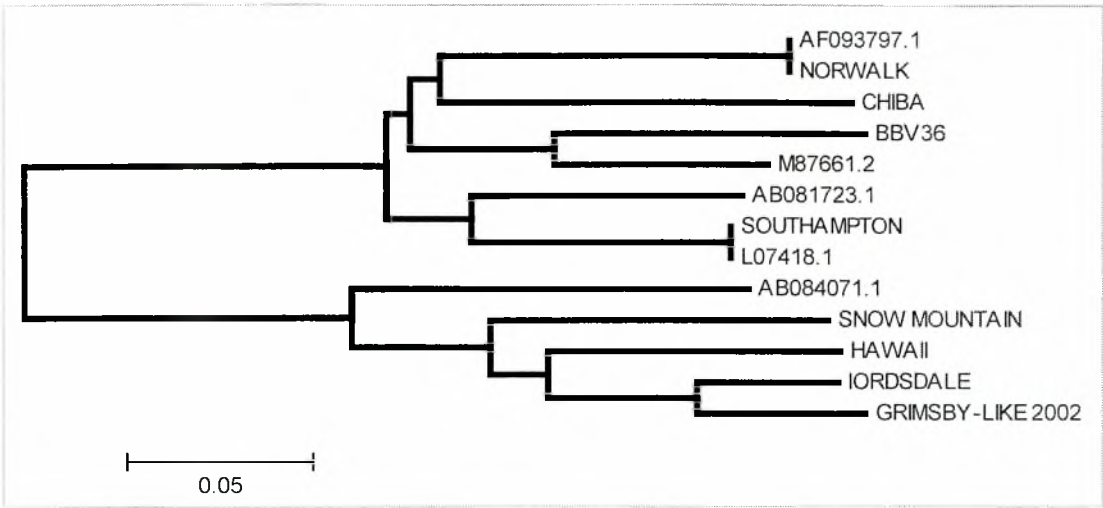
Σχήμα 5: Φυλογένεση του BBV24 στελέχους.



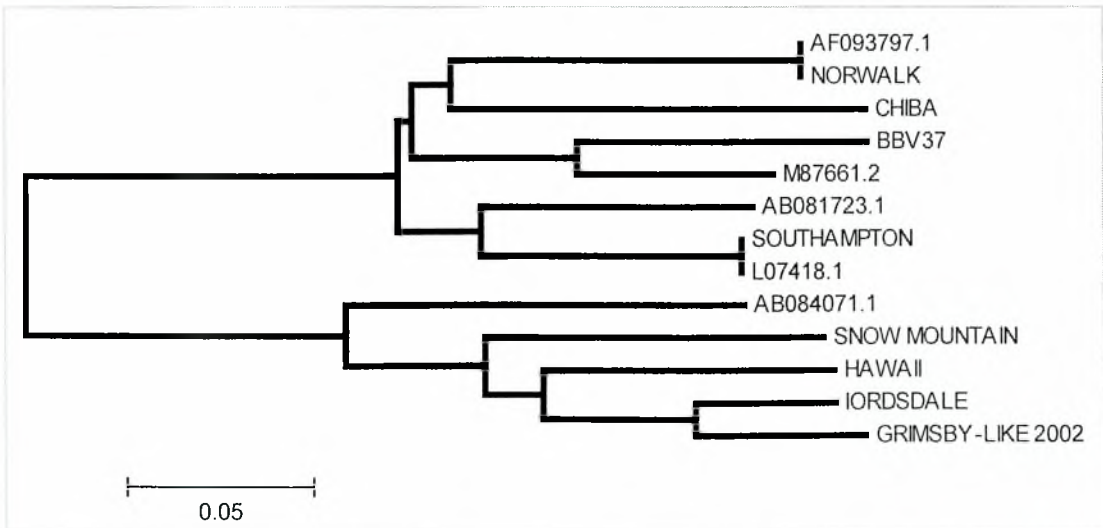
Σχήμα 6: Φυλογένεση του BBV26 στελέχους. Το BBV26 είναι το μοναδικό στέλεχος το οποίο αλληλουχήθηκε στην περιοχή του ORF2 εκατέρωθεν των σημείων υβριδισμού των εκκινητών mon381 - mon383.



Σχήμα 7: Φυλογένεση του BBV35 στελέχους.

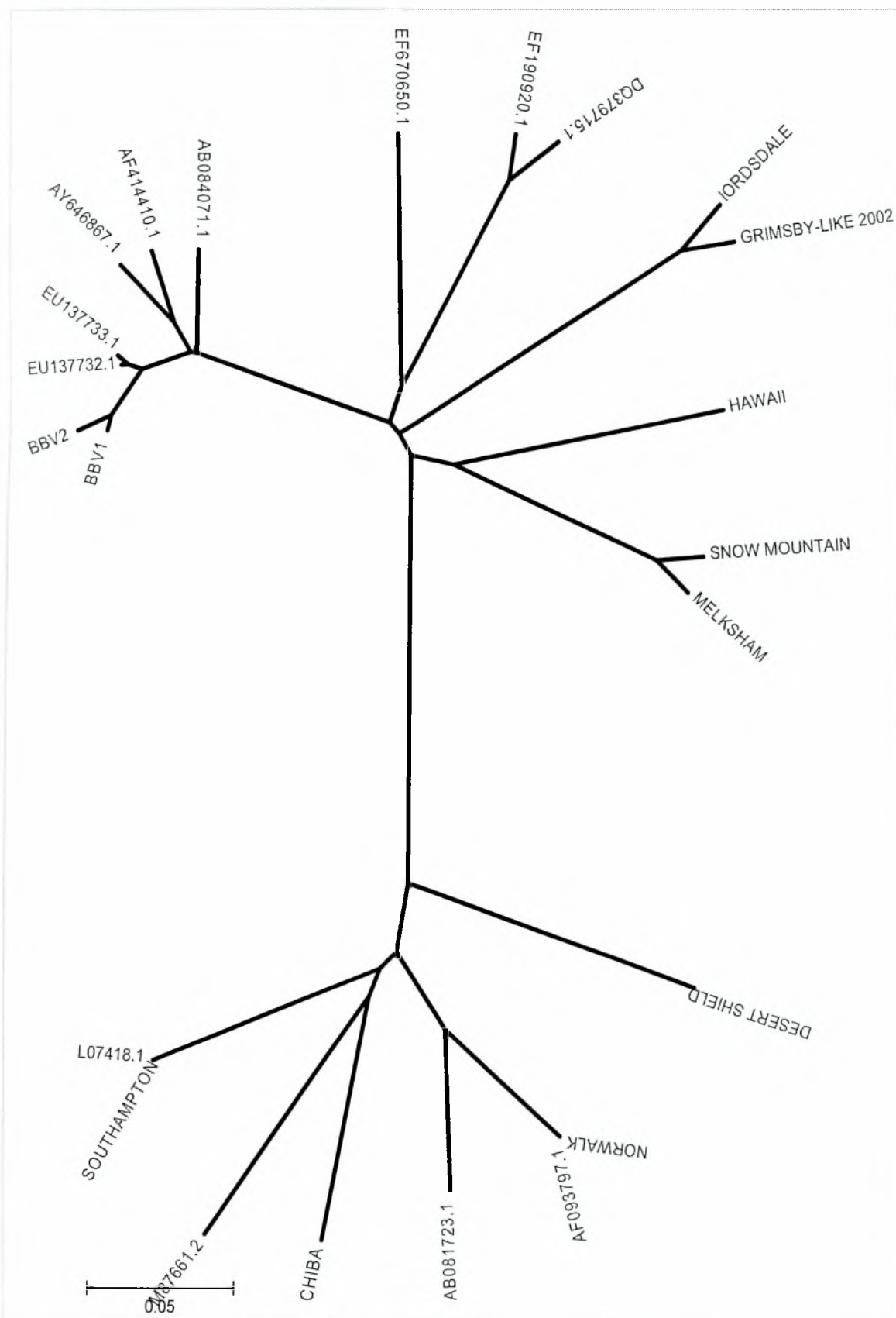


Σχήμα 8: Φυλογένεση του BBV36 στελέχους.

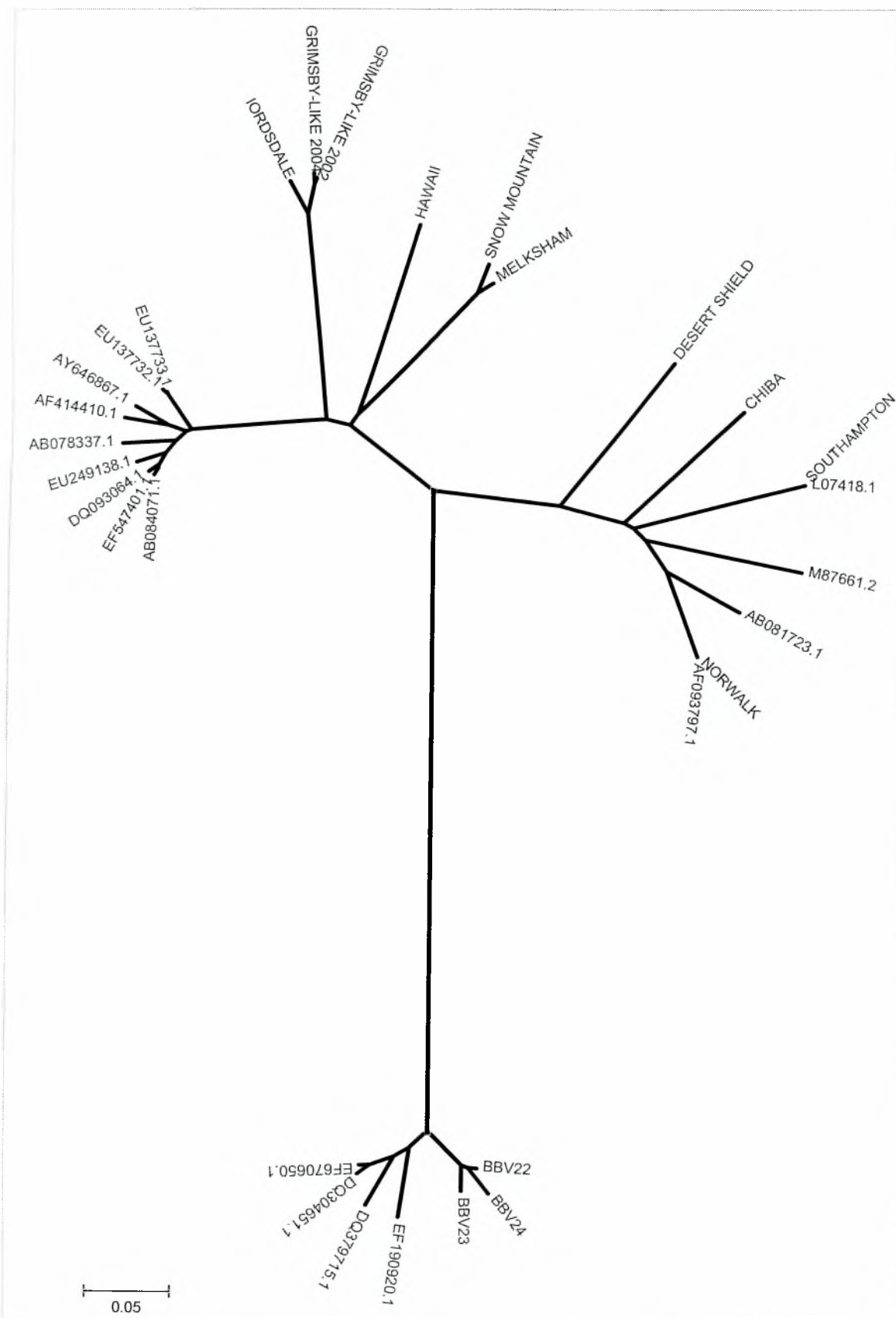


Σχήμα 9: Φυλογένεση του BBV37 στελέχους.

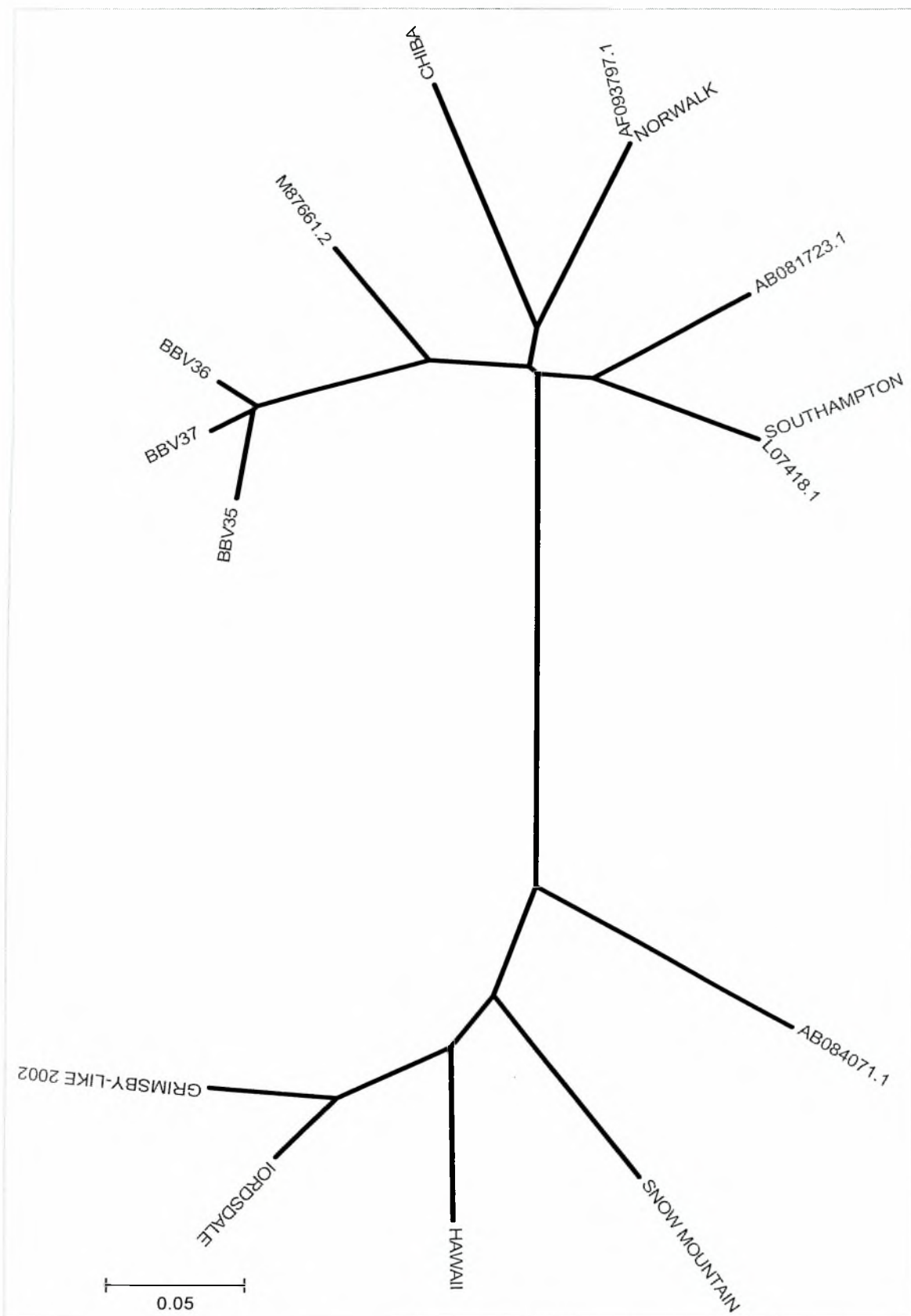
Στα φυλογενετικά δένδρα χωρίς ρίζα, τα στελέχη από κάθε κλινικό δείγμα αντίστοιχα, ταξινομήθηκαν σε ένα κοινό δένδρο. Έτσι, η φυλογένεση των στελεχών παρουσιάζεται βάσει των διαφορετικών γενωμικών περιοχών που χρησιμοποιήθηκαν για τη φυλογενετική ανάλυση, οι οποίες καθορίζονται από το τμήμα του γενώματος το οποίο ενισχύθηκε μέσω των αντιδράσεων RT - PCR και κλωνοποιήθηκε. Πιο συγκεκριμένα, καθώς το ζεύγος εκκινητών G2SKF – G2SKR υβριδίζεται στο νοροϊκό γένωμα εκατέρωθεν μιας περιοχής που περιλαμβάνει το τέλος του ORF1 και την αρχή του ORF2, τα στελέχη BBV1 και BBV2 ταξινομήθηκαν βάσει αυτής της γενωμικής περιοχής. Παρομοίως, τα υπόλοιπα στελέχη ταξινομήθηκαν βάσει του αντίστοιχου τμήματος της γενωμικής αλληλουχίας εκατέρωθεν του οποίου υβριδίζονται οι εκκινητές (πίνακας 10). Στην περίπτωση του BBV26, το οποίο είναι το μοναδικό στέλεχος το οποίο αλληλουχήθηκε στην περιοχή του ORF2 εκατέρωθεν των σημείων υβριδισμού των εκκινητών mon381 - mon383, δεν κατασκευάστηκε επιπλέον φυλογενετικό δένδρο αφού συμπίπτει με το αρχικό δένδρο που έχει παρουσιαστεί. Μάλιστα, τα κλινικά στελέχη ταξινομήθηκαν στην γενετική ομάδα GI ή GII όπως αναμενόταν από την εξειδίκευση των ζευγών εκκινητικών μορίων για ενίσχυση αλληλουχιών της κάθε γενετικής ομάδας. Ωστόσο, τα στελέχη τα οποία προέρχονταν από το ίδιο κλινικό δείγμα ταξινομήθηκαν στον ίδιο γενότυπο (genetic cluster).



Σχήμα 10: Φυλογενετικό δένδρο χωρίς ρίζα κατασκευασμένο από αλληλουχίες του ORF1 και ORF2, εκατέρωθεν των σημείων υβριδισμού των εκκινητών G2SKF - G2SKR.



Σχήμα 11: Φυλογενετικό δένδρο χωρίς ρίζα κατασκευασμένο από αλληλουχίες του ORF1 στην περιοχή της RdRp, εκατέρωθεν των σημείων υβριδισμού των εκκινητών SR11-2 - SR11-3.



Σχήμα 12: Φυλογενετικό δένδρο χωρίς ρίζα κατασκευασμένο από αλληλουχίες του ORF1 στην περιοχή της NTPase, εκατέρωθεν των σημείων υβριδισμού των εκκνητών P78 - P80.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι νοροϊοί κατέχουν την κυρίαρχη θέση ως αιτία πρόκλησης κρουσμάτων μη βακτηριακής οξείας γαστρεντερίτιδας. Η ασθένεια αυτή, αν και συνήθως δεν διαρκεί για αρκετό χρονικό διάστημα σε υγιείς ενήλικες, μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρότερες παθολογικές καταστάσεις σε ευπαθείς ομάδες πληθυσμού, όπως τα μικρά παιδιά, οι ηλικιωμένοι και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Πέραν τούτου, η εύκολη διάδοση της μόλυνσης από νοροϊό οδηγεί συχνά σε επιδημία σε τμήματα του πληθυσμού τα οποία δραστηριοποιούνται σε συγκεκριμένους χώρους «κλειστού περιβάλλοντος» όπου η μετάδοση του ιού είτε από άτομο σε άτομο είτε από μια μολυσμένη πηγή, όπως μολυσμένη τροφή ή πόσιμο νερό, διευκολύνεται. Τέτοια μέρη μπορεί να περιλαμβάνουν τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας σε όλες τις κοινωνικές ομάδες και όλες τις ηλικίες, όπως νοσοκομεία και κλινικές, σχολεία, στρατιωτικές μονάδες, εστιατόρια και ξενοδοχεία, με αποτέλεσμα εκτός της έναρξης ενός κρούσματος και οικονομικές απώλειες. Η διαγνωστική ανίχνευση, επομένως, των νοροϊών σε κλινικά δείγματα είναι ένα σημαντικό μέσο για την πρόληψη επιδημίας. Ωστόσο, κρίνεται ίσως σημαντικότερη η πρόληψη επιδημικής μορφής της ασθένειας τόσο μέσω επιδημιολογικών μελετών όσο και με την εφαρμογή μιας συντονισμένης και αποτελεσματικής στρατηγικής πρόληψης σε όλα τα επίπεδα η οποία θα μπορούσε να προκύψει από την εκτενέστερη μελέτη της βιολογίας των ιών αυτών.

Σήμερα, οι αποτελεσματικότερες διαθέσιμες μέθοδοι ανίχνευσης και μελέτης των νοροϊών είναι οι μοριακές, σε επίπεδο RNA γενώματος. Διάφορα πρωτόκολλα RT – PCR με τυπο-ειδικά ή εκφυλισμένα εκκινητικά μόρια χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για την βελτιστοποίηση της διαδικασίας της ιικής ανίχνευσης σε διάφορα βιολογικά ή περιβαλλοντικά δείγματα. Επίσης, η εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γενωμικών περιοχών διαφόρων κυκλοφορόντων στον πληθυσμό στελεχών είναι ένας από τους στόχους στην έρευνα των ιών αυτών καθώς επιτρέπει την αύξηση της ειδικότητας και της απόδοσης των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιούνται. Ακόμα, οι νοροϊοί αποτελούν μια εξαιρετικά ευμετάβλητη και ετερογενή ομάδα ιών και οποιαδήποτε προσπάθεια για δημιουργία ευρείας χρήσης εκκινητών, δεν έχει καταφέρει να παράγει εκκινητές που να ανιχνεύουν αρκετά διαφορετικά στελέχη. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι η ομοιότητα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των ιών της GI και GII ομάδας είναι <60%, ενώ μεταξύ κάθε

γενότυπου είναι περίπου 75% (Green K.Y. et al., 1993). Έτσι, η παρούσα εργασία μπορεί να αποτελέσει τη βάση για σχεδιασμό ειδικών εκκινητών PCR για κυκλοφορούντα στελέχη νοροϊών στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς κλινικά δείγματα κοπράνων, αφού ανιχνεύθηκαν θετικά στην παρουσία νοροϊών με ήδη υπάρχοντα στην βιβλιογραφία εκκινητικά μόρια, χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή «λήψης» γενωμικών αλληλουχιών με σκοπό την μοριακή κλωνοποίηση και αλληλούχισή τους και την δυνατότητα μελλοντικής χρήσης τους στον σχεδιασμό των ειδικών εκκινητών.

Επίσης, η αλληλούχιση των ανιχνευθέντων γενωμικών αλληλουχιών ήταν ένα απαραίτητο βήμα για την μοριακή και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών νοροϊών, ενώ η διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης των προϊόντων της PCR αύξησε την απόδοση της μεθόδου, αφού λειτούργησε ουσιαστικά σαν μέθοδος αραίωσης του ικού δείγματος ώστε να ληφθεί ένα συγκεκριμένο στέλεχος νοροϊού κάθε φορά, από τα κλινικά δείγματα. Αυτό κρίθηκε απαραίτητο λόγω της πιθανής ταυτόχρονης μόλυνσης ενός ασθενούς με πάνω από ένα στελέχη, γεγονός που τελικά παρατηρήθηκε, αφού από το ίδιο κλινικό δείγμα προέκυψε μέχρι και 100% εντόπιση διακριτών στελεχών (3 διαφορετικά στελέχη από τις 3 αποικίες που συλλέχθηκαν από κάθε δείγμα). Έτσι, μετά την εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας συγκεκριμένων γενωμικών τμημάτων από διακριτά στελέχη που κυκλοφορούν στον πληθυσμό, πραγματοποιήθηκε μέσω προγραμμάτων βιοπληροφορικής η περαιτέρω μοριακή και φυλογενετική ανάλυση των στελεχών αυτών.

Η φυλογενετική ανάλυση που περιλάμβανε την κατασκευή φυλογενετικών δένδρων για στελέχη που κυκλοφορούν στον ελληνικό πληθυσμό, κατέταξε το κάθε στέλεχος στην γενετική ομάδα GI ή GII. Έτσι, τα στελέχη BBV35, BBV36 και BBV37 που ενισχύθηκαν με τους ειδικούς εκκινητές για την ομάδα GI, P78 - P80, κατατάχθηκαν στην γενετική ομάδα GI, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη κατατάχθηκαν στην γενετική ομάδα GII, γεγονός που επίσης συμφωνεί με τη χρήση και σε αυτά τυπο-ειδικών εκκινητικών μορίων για την GII γενετική ομάδα. Ωστόσο, η φυλογενετική ανάλυση αποκάλυψε την ταξινόμηση κάθε στελέχους σε νέο διακριτό γενότυπο (genetic cluster) από τους ήδη υπάρχοντες με τα πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, ο οποίος όμως είναι κοινός για τα στελέχη που προέρχονταν από το ίδιο κλινικό δείγμα.

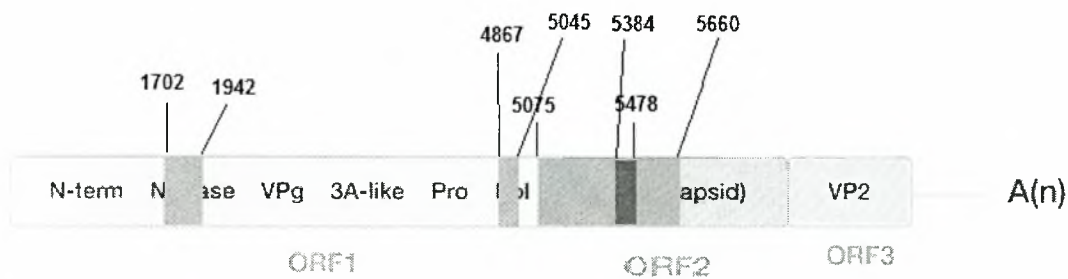
Επιπρόσθετα, επιχειρήθηκε η ανίχνευση αμινοξικών αντικαταστάσεων με κάποιο πιθανό ρόλο στην αντιγονικότητα του ικού στελέχους. Όπως έχει αναφερθεί,

η VP1 κύρια δομική πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για τις αντιγονικές ιδιότητες του ιού και συγκεκριμένα η P2 υποεπικράτεια της η οποία είναι εκτεθειμένη στην εξωτερική επιφάνεια του ιικού καψιδίου και είναι εκείνη η οποία εμφανίζει την υψηλότερη διαφοροποίηση μεταξύ των νοροϊκών στελεχών. Δεδομένα μελέτης υποστηρίζουν το γεγονός αυτό, τα οποία αναφέρουν πως η πλειοψηφία των συσσωρευμένων μεταλλάξεων ενός στελέχους που διαδιδόταν στον πληθυσμό για ένα χρόνο από ασθενή με χρόνια διάρροια, εντοπιζόταν στην P2 υποεπικράτεια η οποία συνεπώς δέχεται την ανοσολογική πίεση του ξενιστή (Nilsson M. et al., 2003). Ακόμα, σε σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας ενός επιδημικού στελέχους Lordsdale-like με τις αλληλουχίες άλλων Lordsdale-like νοροϊών αναφέρθηκε ότι το στέλεχος αυτό διέφερε κατά 11,4 - 13,6% στην P2 υποεπικράτεια καθώς και παρουσίαζε μια αμινοξική ένθεση στην περιοχή αυτή, υποδεικνύοντας ότι το στέλεχος αυτό ήταν επαρκώς αντιγονικά διακριτό ώστε να αποφεύγει την ανοσία του ξενιστή και να προκαλεί επιδημίες (Dingle K.E., 2004). Ωστόσο, στην παρούσα εργασία εντοπίζονται μόνο οι μεταλλάξεις στην S επικράτεια της VP1, η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση των διμερικών επαφών της καψιδιακής πρωτεΐνης, αφού η γενωμική περιοχή της P επικράτειας της πρωτεΐνης δεν έχει ενισχυθεί μέσω των αντιδράσεων PCR από τα ζεύγη εκκνητών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν. Αν και η ανάλυση των αμινοξικών αντικαταστάσεων της επικράτειας P θα ήταν πιο αποκαλυπτική για την αντιγονικότητα του ιού, ωστόσο και η S επικράτεια είναι σημαντική, αφού λειτουργεί ως κρίωμα για την συναρμολόγηση της τρισδιάστατης δομής του ιικού καψιδίου.

Επιπλέον, υπάρχουν υποψίες ανασυνδυασμού μεταξύ νοροϊκών στελεχών τόσο μεταξύ ανθρώπινων παθογόνων όσο και μεταξύ ανθρώπινου και ζωικού παθογόνου νοροϊού. Μάλιστα, σε ένα κρούσμα νοροϊκής μόλυνσης οφειλόμενο σε μολυσμένο πόσιμο νερό στην Κρήτη τον Ιούνιο του 1997, εντοπίστηκε ανασυνδυασμένο στέλεχος (Ambert-Balay K. et al., 2005). Σε συνδυασμό με τη δυνατότητα μετάδοσης ανασυνδυασμένων στελεχών μέσω της κοπρανο - στοματικής οδού, ο ανασυνδυασμός μεταξύ των νοροϊών είναι ένα σημαντικό πεδίο μελέτης.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία αποτελεί μια αρχική προσπάθεια για την αλληλούχιση ολόκληρου του γενώματος κάποιου ή κάποιων στελεχών νοροϊών που κυκλοφορούν στον ελληνικό πληθυσμό. Στη συγκεκριμένη εργασία αλληλουχίστηκε η γενωμική περιοχή που περιλαμβάνει ένα τμήμα του 3' άκρου του ORF1 μέχρι και κάποιο τμήμα του 5' άκρου του ORF2 (νουκλεοτίδια 5075 – 5478

βάσει της αλληλουχίας του Lordsdale ιού), ένα τμήμα του περιοχής του ORF1 που κωδικοποιεί για την RdRp (νουκλεοτίδια 4867 – 5045 βάσει της αλληλουχίας του Norwalk ιού), ένα τμήμα του ORF2 (νουκλεοτίδια 5384 – 5660 βάσει της αλληλουχίας του Lordsdale ιού) και ένα τμήμα της γενωμικής περιοχής που κωδικοποιεί για την NTPase (νουκλεοτίδια 1702 – 1942 βάσει της αλληλουχίας του Norwalk ιού). Έτσι, με βάση τις νουκλεοτιδικές αυτές αλληλουχίες μπορούν να σχεδιαστούν εκκινητές PCR οι οποίοι να καλύπτουν τα υπολειπόμενα τμήματα της γενωμικής αλληλουχίας, μέχρι να αλληλουχηθεί ολόκληρο το γένωμα, με αποτέλεσμα την δυνατότητα περαιτέρω εξέτασης των μοριακών χαρακτηριστικών των νοροϊών.



Σχήμα 13: Απεικόνιση γενωμικών περιοχών (με γκρι χρώμα) που αλληλουχήθηκαν στην παρούσα εργασία.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Adler J.L. and R. Zickl.** Winter vomiting disease. *J. Infect Dis.* 1969;119:668-673.
2. **Agus S.G., Dolin R., Wyatt R.G., et al.** Acute infectious nonbacterial gastroenteritis :intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man .*An Intern Med* 1973; 79:18-25.
3. **Almeida J.D., Waterson A.P.** The morphology of virus-antibody interaction. *Adv Virus Res* 1969;15:307-338.
4. **Ambert-Balay K., Bon F., Le Guyader F., Pothier P. and Kohli E.** Characterization of New Recombinant Noroviruses. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5179–5186.
5. **Atmar R.L. and Estes M.K.** Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses . *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:15-37.
6. **Barker J., Vipond I.B., Bloomfield S.F.** Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect* 2004;58:42-49.
7. **Belliot G., Sosnovtsev S.V., 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. **Berke T., Golding B., Jiang X., et al.** Phylogenetic analysis of the caliciviruses. *J Med Virol* 1997; 52:419–24.
9. **Bertolotti-Ciarlet A., White L.J., Chen R., et al.** Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J Virol* 2002;76:4044-4055.
10. **Bertolotti-Ciarlet A., Crawford S.E., Hutson A.M., et al.** The 3βε™ 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.
11. **Blacklow N.R., Dolin R., Fedson D.S., et al.** Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis. A combined clinical staff

- conference at the Clinical Center of the National Institutes of Health. *Ann Intern Med* 1972;76:993-1008.
12. **Carter M.J., Milton I.D. and Madeley C. R.** Caliciviruses . *Rev. Med. Virol.* 1991;1:177-186.
 13. **Carter M.J., Milton I.D., Meanger J., et al.** The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus. *Virology* 1992;190:443-448.
 14. **Caul E.O. and Appleton H.** The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol* 1982;9:257-65.
 15. **Chiba S., Nakata S., Numata-Kinoshita K., et al.** Sapporo virus: history and recent findings. *J Infect Dis* 2000;181:S303-308.
 16. **Clarke I.N., Lambden P.R., Caul E.O.** Human enteric RNA viruses: caliciviruses and astroviruses. In: Mahy BWJ, Collier L, eds. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. London: Arnold, 1998:511-35.
 17. **Costantini V., Loisy F., Joens L., et al.** Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1800-1809.
 18. **Crane J.K., Guerrant R.L.** *Acute Watery Diarrhea*. New York: Raven Press; 1995.
 19. **Daughenbaugh K.F., Fraser C.S., Hershey J.W., 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.
 20. **Dingle K.E., Lambden P.R., Caul E.O., Clarke I.N.** Human enteric Caliciviridae :the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol* 1995;76(9):2349-55.
 21. **Dingle K.E.** Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission routes. *J Clin Microbiol* 2004;42:3950-3957.
 22. **Dolin R., Blacklow N.R., 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.
 23. **Dolin R., Reichman R.C., Fauci A.S.** Lymphocyte populations in acute viral gastroenteritis. *Infect Immun* 1976;14:422-428.

24. **Dolin R., Reichman R.C., Roessner K.D., et al.** Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 1982;146:184-189.
25. **Donaldson Eric F., Lindesmith Lisa C., Lobue Anna D., Baric Ralph S.** Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunological Reviews* 2008;225: 190-211.
26. **Estes M.K., Ball J.M., Guerrero R.A., et al.** Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis* 2000;181:S367-373.
27. **Ettayebi K. and Hardy M.E.** Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol* 2003;77:11790-11797.
28. **Fankhauser R.L., Monroe S.S., Noel J.S., et al.** Epidemiologic and molecular trends of β € \square Norwalk-like viruses β € \square associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002;186:1-7.
29. **Fernandez-Vega V., Sosnovtsev S.V., Belliot G., et al.** Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol* 2004;78:4827-4837.
30. **Glass P.J., White L.J., Ball J.M., et al.** Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 2000;74:6581-6591.
31. **Gordon I., Ingraham H.S., Kornis R.F.** Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J Exp Med* 1947;86:409-422.
32. **Green K.Y., Lew J.F., Jiang X., Kapikian A.Z., Estes M.K.** Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *J. Clin. Microbiol.* 31 (8), 2185-2191.
33. **Green K.Y., Ando T., Balayan M.S., et al.** Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 2000;181:S322-330.
34. **Greenberg H.B., Valdesuso J.R., Kalica A.R., et al.** Proteins of Norwalk virus. *J Virol* 1981;37:994-999.
35. **Gutierrez-Escolano A.L., Brito Z.U., del Angel R.M., et al.** Interaction of cellular proteins with the 5 β €™ end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol* 2000;74:8558-8562.

36. 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.
37. Hardy M.E., White L.J., Ball J.M., et al. Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1995;69:1693-1698.
38. Hardy M., Crone T., Brower J., et al. Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-like proteinase. *Virus Res* 2002;89:29.
39. Hardy M.E. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 2005;253:1-8.
40. Hodges R.G., McCorkle L.P., Badger G.F., Curtiss C., Dingle J.H., Jordan W.S. A study of illness in a group of cleveland families: XI. The occurrence of gastrointestinal symptoms. *Am J Hyg* 1956;64:349-56.
41. Hughes P.J. and Stanway G. The 2A proteins of three diverse picornaviruses are related to each other and to the H-rev107 family of proteins involved in the control of cell proliferation. *J Gen Virol* 2000;81:201-207.
42. Hutson A.M., Atmar R.L., Graham D.Y., et al. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 2002;185:1335-1337.
43. Hutson A.M., Atmar R.L., Estes M.K. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* 2004;12:279-287.
44. Jiang X., Wang M., Graham D.Y., et al. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992;66:6527-6532.
45. Jiang X., Wang M., Wang K., et al. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993;195:51-61.
46. Jiang X., Wilton N., Zhong W.M., et al. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis* 2000;181:S349-359.
47. Johnson P.C., Mathewson J.J., DuPont H.L., et al. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in U.S. adults. *J Infect Dis* 1990;161:18-21.
48. Kageyama T., Shinohara M., Uchida K., et al. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J Clin Microbiol* 2004;42:2988-2995.

49. **Kamata K., Shinozaki K., Okada M., et al.** Expression and antigenicity of virus-like particles of norovirus and their application for detection of noroviruses in stool samples. *J Med Virol* 2005;76:129-136.
50. **Kapikian A.Z., Wyatt R.G., 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.
51. **Kapikian A.Z., Dienstag J.L., Purcell R.H.** 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.
52. **Kaplan J.E., Gary G.W., Baron R.C., 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.
53. **Karst S.M., Wobus C.E., Lay M., et al.** STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 2003;299:1575-1578.
54. **Kilgore P.E., Belay E.D., Hamlin D.M., et al.** A university outbreak of gastroenteritis due to a small round-structured virus. Application of molecular diagnostics to identify the etiologic agent and patterns of transmission. *J Infect Dis* 1996;173:787-793.
55. **Kirkwood C.D., Clark R., Bogdanovic-Sakran N., et al.** A 5-year study of the prevalence and genetic diversity of human caliciviruses associated with sporadic cases of acute gastroenteritis in young children admitted to hospital in Melbourne, Australia (1998-2002). *J Med Virol* 2005;77:96-101.
56. **Kojima S., Fukumi H., Kusama H., et al.** Studies on the causative agent of the infectious diarrhea: records of the experiments on human volunteers. *Jpn Med J* 1948;1:467-476.
57. **Kojima S., Kageyama T., Fukushi S., Hoshino F.B., Shinohara M., Uchida K., Natori K., Takeda N., Katayama K.** Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Vir Methods* 2002;100:107-114.
58. **Kuyumcu-Martinez M., Belliot G., Sosnovtsev S.V., et al.** Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J Virol* 2004;78:8172-8182.

59. **Lambden P.R., Caul O., Ashley C., et al.** Sequence and genome organization of a human small round structured (Norwalk-like) virus. *Science* 1993;259:516-519.
60. **Lew J.F., Kapikian A.Z., Valdesuso J., et al.** Molecular characterization of Hawaii virus and other Norwalk-like viruses: evidence for genetic polymorphism among human caliciviruses. *J Infect Dis* 1994;170:535-542.
61. **Lindesmith L., Moe C., Marionneau S., et al.** Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 2003;9:548-553.
62. **Lindesmith L., Moe C., Lependu J., et al.** Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J Virol* 2005;79:2900-2909.
63. **Liu B., Clarke I.N., Lambden P.R.,** 1996. Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol* 70:2605-2610.
64. **Liu B.L., Lambden P.R., Gunther H., et al.** Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 1999;73:819-825.
65. **Lopman B.A., Brown D.W., Koopmans M.** Human caliciviruses in Europe. *J Clin Vir* 2002;24:137-160.
66. **Lopman B.A., Reacher M.H., Van Duynhoven Y., et al.** Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9:90-96.
67. **Marionneau S., Ruvoen N., Le Moullac-Vaidye B., et al.** Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 2002;122:1967-1977.
68. **Marks P.J., Vipond I.B., Carlisle D., et al.** Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect* 2000;124:481-487.
69. **Marks P.J., Vipond I.B., Regan F.M., et al.** A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect* 2003;131:727-736.
70. **Matsuno S., Sawada R., Kimura K., et al.** Sequence analysis of SRSV in fecal specimens from an epidemic of infantile gastroenteritis, October to December 1995, Japan. *J Med Virol* 1997;52:377-380.

71. **Mattner F., Sohr D., Heim A., et al.** Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:69-74.
72. **Matthews R.E.** Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 1979;12:129–296.
73. **Meeroff J.C., Schreiber D.S., Trier J.S., et al.** Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Ann Intern Med* 1980;92:370-373.
74. **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.
75. **Morales M., Barcena J., Ramirez M.A., 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.
76. **Mounts A.W., Ando T., Koopmans M., et al.** Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000;181:S284-287.
77. **Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., et al.** Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. The sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vienna: Springer-Verlag, 1995.
78. **Neill J.D.** 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.
79. **Neill J.D.** The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res* 2002;87:89-93.
80. **Ng K.K., Pendas-Franco N., Rojo J., et al.** Crystal structure of Norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *J Biol Chem* 2004;279:16638-16645.
81. **Nilsson M., Hedlund K.O., 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.

82. **Noel J.S., Ando T., Leite J.O., 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.
83. **Okada S., Sekine S., Ando T., Hayashi Y., Murao M., Yabuuchi K., Miki T., Oshasi M.** Antigenic characterization of small, round-structured viruses by immune electron microscopy. *J Clin Microbiol* 1990;28:1244-1248.
84. **Okhuysen P.C., Jiang X., Ye L., et al.** Viral shedding and fecal IgA response after Norwalk virus infection. *J Infect Dis* 1995;171:566-569.
85. **Parrino T.A., Schreiber D.S., Trier J.S., et al.** Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 1977;297:86-89.
86. **Pfister T. and Wimmer E.** Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol* 2001;75:1611-1619.
87. **Prasad B.V., Rothnagel R., Jiang X., et al.** Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol* 1994;68:5117-5125.
88. **Prasad B.V., Matson D.O., Smith A.W.** Three-dimensional structure of calicivirus. *J Mol Biol* 1994;240:256-264.
89. **Prasad B.V., Hardy M.E., Dokland T., et al.** X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 1999;286:287-290.
90. **Pringle C.R.** Virus taxonomy—San Diego 1998. *ArchVirol* 1998;143:1449–59.
91. **Rohayem J., Berger S., Juretzek T. 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.
92. **Rosen B.I., Saif L.J., Jackwood D.J., Gorziglia M.** Serotyping differentiation of group A rotaviruses with porcine rotaviruses gene 9 probes. *J Clin Microbiol* 1990;28:2526-2533.
93. **Schreiber D.S., Blacklow N.R., Trier J.S.** The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med* 1973;288:1318-1323.
94. **Schvoerer E., Bonnet F., Dubois V., Cazaux G., Serceau R., Fleury H.J., Lafon M.E.** PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste

- waters and human stools in Southwestern France. *Res Microbiol* 2000;151:693-701.
95. **Schwab K.J., Estes M.K., Atmar R.L.** Norwalk and other human caliciviruses: molecular characterization, epidemiology and pathogenesis, p. 469-493, In J.W. Cary, J.E. Linz, D. Bhatnagar (ed.), *Microbial foodborne diseases: mechanisms of pathogenicity and toxin synthesis*. Technomic Publishing Company, Inc, Lancaster, Pa.
 96. **Seah, E.L., Marshall, J.A. and Wright, P.J.** Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberwell: completion of sequence and expression in mammalian cells. *J. Virol.* 1999;73:10531– 10535.
 97. **Someya, Y., Takeda, N. and Miyamura, T.** Identification of active-site amino acid residues in the Chiba virus 3C-like protease. *J. Virol.* 2002;76:5949–5958.
 98. **Sosnovtsev S.V., Belliot G., Chang K.O., et al.** Feline calicivirus VP2 Is essential for the production of infectious virions. *J Virol* 2005;79:4012-4024.
 99. **Tan M. and Jiang X.** Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol* 2005;13:285-293.
 100. **Thornhill T.S., Wyatt R.G., Kalica A.R., et al.** Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm virus-like particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 1977;135:20-27.
 101. **van Der Poel W.H., Vinje J., van Der Heide R., et al.** Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* 2000;6:36-41.
 102. **Vinje J. and Koopmans M.P.** Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* 1996;174:610-615.
 103. **Weir, M.L., Klip, A. and Trimble, W.S.** Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochem. J.* 1998;333 (Pt 2), 247–251.
 104. **White L.J., Ball J.M., Hardy M.E., et al.** Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *J Virol* 1996;70:6589-6597.

105. **White L.J., Hardy M.E., Estes M.K.** Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. *J Virol* 1997;71:8066-8072.
106. **Widerlite L., Trier J.S., Blacklow N.R., et al.** Structure of the gastric mucosa in acute infectious bacterial gastroenteritis. *Gastroenterology* 1975;68:425-430.
107. **Wobus C.E., Karst S.M., Thackray L.B., et al.** Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology* 2004;2:e432.
108. **Zahorsky J.** Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease . *Arch Pediatr* 1929;46:391-5.
109. **Zheng, D. P., T. Ando, R. I. Glass, and S. Monroe.** 2004. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Second International Calicivirus Conference.
110. **Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., et al.** Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312-323.

ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟΥ

1. www.biomarker.cdc.go.kr/
2. www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/194.html
3. www.glycoforum.gr.jp/.../GM02/GM02E.html
4. <http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/page/Prices.html>
5. www.lightsource.ca/media/norwalk.php
6. www.netlibrary.com
7. www.promega.com
8. www.scientificblogging.com/news/und
9. www.viperdp.scripps.edu

