



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**„Απομόνωση και ταυτοποίηση
Αδενοϊών και Εντεροϊών, με την χρήση
μοριακών τεχνικών, από κλινικά
δείγματα ασθενών της παιδιατρικής
κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου
Δράμας,,**



Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας

Κάππου Βασιλική
A.M. 1804307
Διπλωματική εργασία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή



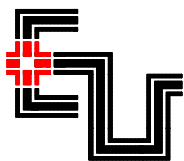
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Επιβλέπων

Θ. Κ. Κωνσταντινίδης, Αν. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής
Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης
Διευθυντής Εργαστηρίου Υγιεινής και Προστασίας
Περιβάλλοντος

Συνεπιβλέποντες

Μαρκουλάτος Παναγιώτης, Καθηγητής
Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας



Εργαστήριο Υγιεινής &
Προστασίας Περιβάλλοντος

Λάρισα Οκτώβριος 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική εργασία

Κάππου Βασιλική
A.M. 1804307

**„Απομόνωση και ταυτοποίηση Αδενοϊών και Εντεροϊών, με
την χρήση μοριακών τεχνικών, από κλινικά δείγματα
ασθενών της παιδιατρικής κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου
Δράμας„**

Λάρισα Οκτώβριος 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
Summary	6

Γενικό μέρος

Εισαγωγή

Η ιστορία των ιών	9
Χαρακτηριστικά των ιών και ιδιότητες τους	10
Ιοί εντερικής προέλευσης	12
Επιβίωση των εντερικών ιών	15

Εντεροϊοί

Δομή	19
Οργάνωση του γονιδιώματος	20
Ιδιότητες	20
Καταστροφή εντεροϊών	21
Τύποι	21
Παθογένεια	22

Αδενοϊοί

Ιστορική αναδρομή	28
Δομή	28
Οργάνωση του γονιδιώματος	29
Αντιγραφή γονιδιώματος	30
Κύκλος ζωής αδενοϊού	32
Ιδιότητες	33
Τύποι	33
Παθογένεια	34

Μοριακές τεχνικές

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	40
Nested PCR	42
RT-PCR	43
Η τεχνική της Ηλεκτροφόρησης	44
Νοσοκομεία και Δημόσια υγεία	49

Ειδικό μέρος

Γαστρεντερίτιδα και παιδιά	52
Υλικά	55
Μέθοδοι	65
Αποτελέσματα	71
Συζήτηση	77
Βιβλιογραφία	81

Περίληψη

Η παρούσα Διπλωματική εργασία αναφέρεται στην απομόνωση και την ταυτοποίηση αδενοϊών και εντεροϊών από κλινικά δείγματα ασθενών της Παιδιατρικής κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Δράμας. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από τον Νοέμβριο του 2008 έως το Μάρτιο του 2010 . Για την περάτωση του πειράματος, πραγματοποιήθηκε αραίωση των δειγμάτων σε PBS, απομόνωση του γενετικού υλικού των ιών με Kit της Qiagen, πολλαπλασιασμός του με Nested PCR και τέλος ηλεκτροφόρηση του σε πηκτή αгарόζης. Τόσο οι αδενοϊοί όσο και οι εντεροϊοί μεταδίδονται πολύ εύκολα, από την πεπτική οδό, γι' αυτό παρουσιάζουν ιδιαίτερο επιδημιολογικό ενδιαφέρον. Μπορούν να προκαλέσουν ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων καθώς και σοβαρές ασθένειες κυρίως σε βρέφη, παιδιά και σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Εξετάστηκαν 41 δείγματα κοπράνων ασθενών με δυσεντερία, ηλικίας από 1 έως 15 χρονών για την ύπαρξη αδενοϊού και εντεροϊού. Βρέθηκαν 4 (τέσσερα) δείγματα θετικά για αδενοϊό ενώ κανένα θετικό για εντεροϊό.

Summary

The present study concerns isolation and identification of adenoviruses and enteroviruses from clinical samples of patients from Drama's Paediatric Clinic. The sampling was held from November 2008 to March 2010. For the determination of the experiment the samples were diluted using PBS solution, viral genome was extracted using a qiagen kit, amplified by using a nested PCR technique and last electrophorised on an agarose electrophoresis gel. Adenoviruses and enteroviruses are easily transmitted by an orofecal route, so they are presenting special epidemiological interest. They can cause a wide range of clinical outcomes and serious illness, especially in infants, children and immune-compromised patients. Were examined 41 stool samples from patients with dysentery, in order to find the existence of adenoviruses or enteroviruses. The patients were 1 to 15 years old. The result of the examination was 4 (four) positive samples for Adenovirus and no one positive sample for Enterovirus.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Η ιστορία των ιών

Από τα αρχαία κιόλας χρόνια ήταν κλινικά γνωστές, ασθένειες, που σήμερα ξέρουμε ότι προκαλούνται από ιούς.

Αιώνες αργότερα και πιο συγκεκριμένα προς τα τέλη του 19^{ου} αιώνα παρατηρήθηκε ότι κάποιες από τις λοιμώδεις ασθένειες δεν οφείλονται στην παρουσία κάποιου μικροβιακού παράγοντα. Έτσι σχηματίστηκε η άποψη ότι υπάρχει κάποιος μη μικροβιακός λοιμώδης παράγοντας που οφείλεται για κάποιες απ' τις ασθένειες αυτές.

Πρώτος ο Louis Pasteur το 1885 υποπτεύθηκε την ύπαρξη των ιών σε πειράματα που έκανε με σκοπό την ανακάλυψη των μικροβίων που προκαλούσαν την λύσσα. Στα πειράματα του δεν κατάφερε να εντοπίσει κάποιο μικροβιακό παράγοντα κι αυτό τον οδήγησε στο συμπέρασμα της ύπαρξης κάποιου άλλου μη μικροβιακού λοιμώδη παράγοντα στον οποίο έδωσε την ονομασία «ιός». Σύμφωνα με την θεωρία του Pasteur οι λοιμογόνοι αυτοί παράγοντες ήταν αόρατοι με εκείνης της εποχής τεχνικές της μικροσκοπίας, είχαν πολύ μικρό μέγεθος και επομένως δεν μπορούσαν να συγκρατηθούν από τα φίλτρα για τα βακτήρια.

Αργότερα, το 1892 ο Ivanowski με πειράματα που έκανε με σκοπό να ανακαλύψει τον παράγοντα που προκαλεί την νόσο της μωσαϊκής του καπνού, επιβεβαίωσε την θεωρία του Pasteur. Το 1898 ακολούθησαν τα πειράματα των Loeffler και Frosh οι οποίοι ανακάλυψαν ότι ο αφθώδης πυρετός και η ποδοστοματική νόσος οφείλονται σε διηθητούς λοιμογόνους παράγοντες, καθώς επίσης τον ίδιο χρόνο ο Beijerinck επανέλαβε τα πειράματα του Ivanowski καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ένας νέου τύπου λοιμώδης παράγοντας χαρακτηρίζοντας το, ως μολυσματικό ζωντανό υγρό "contagium vivum fluidum". Αργότερα το 1911 ο Rous επιβεβαίωσε με πειράματα σε όρνιθες, ότι οι ιοί μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο, καθώς κάποια καρκινώματα προκαλούνταν από διηθήματα που δεν περιείχαν κύτταρα (μικροβιακά και άλλα). Ο Frederick Twort ανακάλυψε το 1915 ιούς που προσβάλλουν βακτήρια στους οποίους μετέπειτα, το 1917, ο Felix d'Herelle έδωσε την ονομασία «βακτηριοφάγοι». Οι βακτηριοφάγοι, ή φάγοι, μολύνουν μόνο βακτήρια με αποτέλεσμα να σχηματίζονται πλάκες λύσης στα στερεά θρεπτικά υλικά στα οποία αναπτύσσονται τα βακτήρια γεγονός που οδήγησε τους Twort και d'Herelle στην ανακάλυψη των ιών αυτών.[1, 2, 3]

Γενικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες των ιών

Οι ιοί χαρακτηρίζονται ως μη αυτοτελείς ακυτταρικές μορφές ζωής καθώς δεν έχουν δομή κυττάρου και στερούνται κυτταρικής οργάνωσης. Ενώ έχουν γονιδίωμα, αδυνατούν να αναπαραχθούν αυτόνομα, λόγω της έλλειψης γενετικών πληροφοριών απαραίτητες για την αντιγραφή τους. Επομένως για να πολλαπλασιαστεί ένας ιός εκμεταλλεύεται τους βιοσυνθετικούς μηχανισμούς και τα ένζυμα του κυττάρου που μολύνει, ενσωματώνοντας το γενετικό του υλικό στο γονιδίωμα του κυττάρου. Αυτή η ιδιαιτερότητα τους χαρακτηρίζει ως υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα των προκαρυωτικών και ευκαριωτικών οργανισμών, φυτικών και ζωικών. [3,6,7]

Δομή

Η δομή των ιών είναι πολύ απλή. Αποτελούνται από ένα κάλυμμα πρωτεϊνικής φύσεως το οποίο ονομάζεται καψίδιο ή κάλυμμα ή περίβλημα ή κάψα, ενώ ορισμένοι ιοί φέρουν κι ένα επιπλέον μεμβρανικό στρώμα, τον φάκελο. Το καψίδιο των ιών δημιουργείται από ένα συγκεκριμένο αριθμό πρωτεϊνικών μορίων και μέσα σ' αυτό περικλείεται το γενετικό υλικό του ιού. Αυτή η εξωκυτταρική μορφή του ιού η οποία αποτελείται από το πρωτεϊνικό περίβλημα και το ιικό γονιδίωμα ονομάζεται ιόσωμα. Ακόμη, το μέγεθος των σωματιδίων των ιών κυμαίνεται από 20 έως 300nm [5,6,8,18]

Γονιδίωμα

Το γενετικό υλικό των ιών μπορεί να είναι DNA ή RNA μονόκλωνο ή δίκλωνο, γραμμικό ή κυκλικό. Περιέχει τις απαραίτητες γενετικές πληροφορίες για την ανάπτυξη και το σχηματισμό του σωματιδίου του ιού που ονομάζεται βίριο. Ακόμη, ορισμένοι ιοί χρησιμοποιούν ως γενετικό υλικό και τα δύο νουκλεϊκά οξέα, σε διαφορετικές όμως φάσεις του κύκλου τους. Σ' αυτήν την κατηγορία ιών ανήκουν οι ρετροϊοί, καθώς το γενετικό υλικό του ιοσώματος τους αποτελείται από ένα μόριο RNA, αλλά η αντιγραφή τους γίνεται μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου DNA. Αντίθετα με τους ρετροϊούς, στον ανθρώπινο ιό της ηπατίτιδας Β το γενετικό υλικό του ιοσώματος του αποτελείται από ένα μόριο DNA, αλλά η αντιγραφή του γίνεται μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου RNA.[5,6,18]

Στην ταξινόμηση κατά Baltimore οι ιοί με βάση το γενετικό τους υλικό χωρίζονται σε 7 τάξεις:

- Τάξη I: Ιοί με δίκλωνο DNA
- Τάξη II: Ιοί με μονόκλωνο DNA
- Τάξη III: Ιοί με δίκλωνο RNA
- Τάξη IV: Ιοί με μονόκλωνο RNA, ίδιας πολικότητας με το mRNA
- Τάξη V: Ιοί με μονόκλωνο RNA, αντίθετης πολικότητας με το mRNA
- Τάξη VI: Ιοί με μονόκλωνο RNA, ίδιας πολικότητας με το mRNA, που περιλαμβάνει ένα ενδιάμεσο μόριο DNA (Πετροϊοί)
- Τάξη VII: Ιοί με δίκλωνο DNA, ίδιας πολικότητας με το mRNA, που περιλαμβάνει ένα ενδιάμεσο μόριο RNA (Ιός της ηπατίτιδας Β) [6]

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται κάποια βασικά γενικά χαρακτηριστικά των ιών καθώς επίσης και των βακτηρίων.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά ιών και βακτηρίων

Γενικά χαρακτηριστικά	Ιοί	Βακτήρια
Μέγεθος	20 – 300 nm	250 -1000 nm
Γενετικό υλικό	Μόνο RNA ή DNA	DNA και RNA
Κατασκευή	Απλή	Προκαρυωτικού κυττάρου
Αναπαραγωγή	Σύνθεση μόνο μέσα σε ζωντανά κύτταρα	Με διχοτόμηση
Ένζυμα	Μόνο για προσκόλληση και είσοδο στο κύτταρο	Εκατοντάδες
Μεταβολική δραστηριότητα	Όχι	Ναι
Σύνθεση ενώσεων υψηλής ενέργειας	Όχι	Ναι
Αντιβιοτικά	Ανθεκτικοί	Ευαίσθητα
Κίνηση	Όχι	Ορισμένα μόνο
Μορφολογική μονάδα	Βίριο	Κύτταρο

ΙΟΙ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΠΡΟΞΕΛΕΥΣΗΣ

Οι ιοί εντερικής προέλευσης αποτελούν μια κατηγορία ιών οι οποίοι προσβάλλουν το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου και αποβάλλονται με τα περιττώματα των ασθενών. Η μετάδοση τους γίνεται συχνότερα από άτομο σε άτομο μέσω της στοματοεντερικής οδού και απαιτούνται ελάχιστα ιικά σωματίδια για την μόλυνση του ατόμου. Συνήθως οι εντερικοί ιοί αποβάλλονται σε μικρότερα ποσοστά απ' ό,τι τα κολοβακτηρίδια. Βέβαια η πιθανότητα μόλυνσης αυξάνεται με την αύξηση των ιικών σωματιδίων. Οι ιοί δεν αποτελούν οργανισμούς της φυσιολογικής χλωρίδας στον εντερικό σωλήνα. Αποβάλλονται μόνο από προσβεβλημένα άτομα κυρίως βρέφη και μικρά παιδιά. Μελέτες απέδειξαν ότι τα ποσοστά της μόλυνσης ποικίλουν από περιοχή σε περιοχή καθώς εξαρτώνται από την υγιεινή και τις κοινωνικοοικονομικές συνθήκες.

Οι ιοί εντερικής προέλευσης μπορούν να μολύνουν το νερό λόγω του ότι αποβάλλονται με τα κόπρανα των ζωντανών οργανισμών. Δεν έχει διαπιστωθεί έως τώρα η πιθανότητα μόλυνσης ενός ατόμου σε μια κοινότητα με παροχή νερού ελάχιστα μολυσμένη με ιικά σωματίδια παρ' όλο αυτά μελέτες απέδειξαν τον υψηλό κίνδυνο μόλυνσης από μικροποσότητες εντεροϊών σε παροχή πόσιμου νερού.

Στους εντερικούς ιούς περιλαμβάνονται οι ιοί polio, coxsakie, echo, και άλλοι entero, adeno, reo, rota, hepatitis A και noro, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν οξεία φλεγμονώδη, μη βακτηριακή, γαστρεντερίτιδα.[9] Με γαστρεντερίτιδα μπορεί να προσβάλλει πλήθος κόσμου κι ακόμη μπορεί να αποτελέσει πολύ μεγάλος κίνδυνος για την υγεία ειδικά των νηπίων, των ατόμων τρίτης ηλικίας όπως επίσης και των ασθενών που πάσχουν από υποσιτισμό και των ασθενών με ανεπαρκές ανοσοποιητικό σύστημα.[10] Κάθε ομάδα ή υποομάδα ιών αποτελείται από ένα πλήθος διαφορετικών οροτύπων, έτσι, περισσότεροι από 100 διαφορετικοί ανθρώπινοι ιοί εντερικής προέλευσης έχουν αναγνωρισθεί.

Το ποσοστό των ατόμων που αναπτύσσουν κλινικά συμπτώματα μόλυνσης από ιούς polio είναι μικρή (1%) ενώ για την ηπατίτιδα A είναι μεγαλύτερη (~7%).

Η έξαρση ιώσεων σε πληθυσμούς από την παροχή νερού συνήθως προκαλείται από μόλυνση μέσω του συστήματος αποχέτευσης. [9] Στα εύκρατα κλίματα οι εντεροϊοί εμφανίζονται σε έξαρση στα λύματα, προς το τέλος του καλοκαιριού και στις αρχές του φθινοπώρου. Παρ' όλα αυτά, ο ιός της ηπατίτιδας A, οι νοροϊοί και οι ιοί rota

μπορούν να θεωρηθούν σημαντικές εξαιρέσεις διότι η έξαρση των ασθενειών που οφείλεται σε αυτούς τους ιούς αυξάνει τους χειμερινούς μήνες. Στατιστικές μελέτες στις εποχιακές εξάρσεις σε νερό και λύματα αυτών των παραπάνω ιών δεν υπάρχουν επειδή δεν μπορούν να αποτιμηθούν άμεσα και εύκολα με τις συμβατικές τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας.

Ακόμη, οι ανθρώπινοι ιοί εντερικής προέλευσης μπορούν να παραμείνουν στο περιβάλλον καθώς είναι ανθεκτικοί σε δυσμενείς συνθήκες. [11]

Οι ανθρώπινοι ιοί rotavirus και ο ιός της ηπατίτιδας Α έχουν καλλιεργηθεί πρόσφατα σε κυτταροκαλλιέργειες, αλλά οι τεχνικές είναι δύσκολες και απαιτούν χρήση τεχνικών ανοσοβιολογίας όπως ο ανοσοφθορισμός για να ανιχνευθεί η ανάπτυξη ιών αλλά και άλλων μοριακών τεχνικών.

Οι ιοί που πρόκειται να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν είναι οι εντεροϊοί και οι αδενοϊοί. Η απομόνωση τους θα γίνει από δείγματα κοπράνων ασθενών ηλικίας από βρέφη έως 15 χρονών. Συνολικά, αυτοί οι ιοί μεταδίδονται στον άνθρωπο μέσω της γαστρεντερικής οδού και από το νερό και τα τρόφιμα.

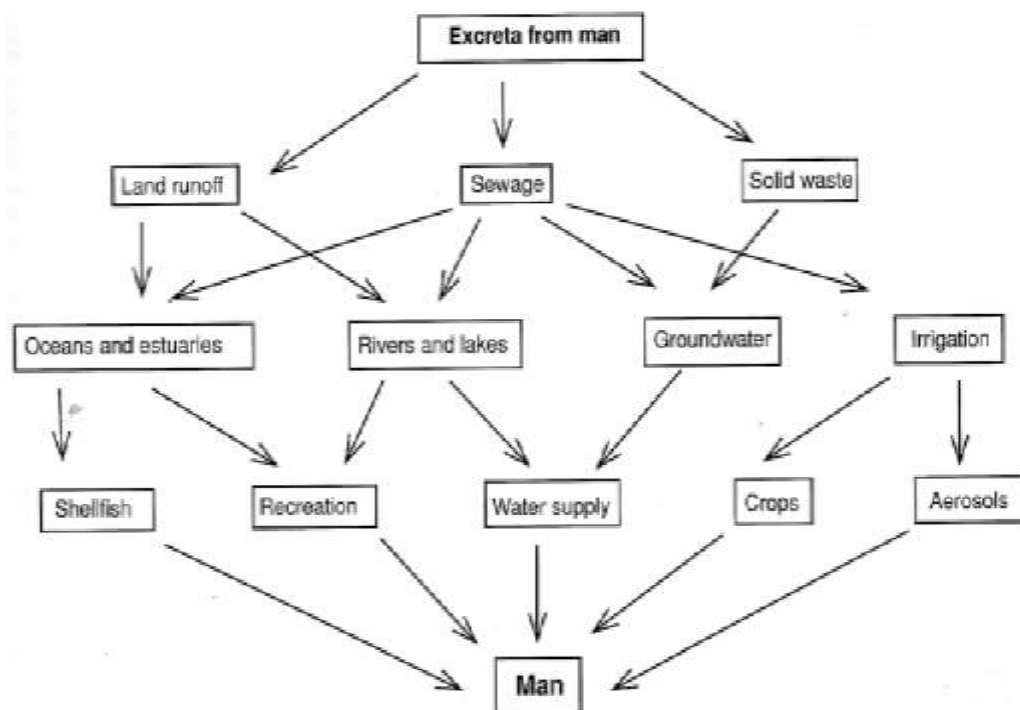
Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά τα είδη ιών εντερικής προέλευσης καθώς και νοσήματα τα οποία προκαλούν.

Πίνακας 2. Τύποι εντερικών ιών και κλινικά σύνδρομα που προκαλούν

Εντερικοί ιοί	Κλινικά σύνδρομα που προκαλούν
<p>Εντεροϊοί:</p> <p>Polio - ιοί</p> <p>Echo - ιοί</p> <p>Coxsackie – ιοί τύπου A, B</p>	<p>Μηνιγγίτιδα, παράλυση, πυρετό</p> <p>Μηνιγγίτιδα, πυρετό, παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, ερύθημα, διάρροια</p> <p>Μηνιγγίτιδα, παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, κυνάγχη, περικαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, πλευροδυνία</p>
Adeno - ιοί	Διάρροια, παθήσεις των οφθαλμών, παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος
Rota - ιοί	Γαστρεντερίτιδα (στα παιδιά)
Reo – ιοί	Γαστρεντερίτιδα, παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος
Astro – ιοί	Γαστρεντερίτιδα
Parvo – ιοί	Γαστρεντερίτιδα
Corona – ιοί	Γαστρεντερίτιδα, παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος
Toro – ιοί	Γαστρεντερίτιδα
<p>Calici – ιοί</p> <p>Ιός της Ηπατίτιδας E</p> <p>Ανθρώπινοι Calici – ιοί</p> <p>Norwalk</p> <p>SRSV</p>	<p>Ηπατίτιδα</p> <p>Γαστρεντερίτιδα</p> <p>Γαστρεντερίτιδα (στους ενήλικες), πυρετό</p> <p>Γαστρεντερίτιδα</p>
Ιός της Ηπατίτιδας A	Ηπατίτιδα, ίκτερο

Επιβίωση των εντερικών ιών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι ανθρωπίνοι εντερικοί παθογόνοι ιοί μπορεί να εισέλθουν στο περιβάλλον με περιττώματα των μολυσμένων ατόμων και να μολύνουν άλλα υγιή άτομα. Επίσης, η μόλυνση μπορεί να γίνει και μέσω της τροφής. Έχουν γίνει πολλές και διάφορες μελέτες που εξηγούν την επιβίωση των εντερικών ιών μέσω της μετάδοσης τους. Η μετάδοση ενός ιού δεν εξαρτάται μόνο από την αλληλεπίδραση της μ' ένα ξενιστή, αλλά από την αλληλεπίδραση της έξω από τον ξενιστή. Οι ιοί δεν έχουν εγγενή μεταβολισμό και δεν απαιτούν οποιοσδήποτε θρεπτικές ουσίες για να εμμένουν έξω από τον ξενιστή, οπότε μπορούν να θεωρηθούν ως αδρανή μόρια έξω από αυτόν. Ωστόσο έχουν έναν βαθμό ευρωστίας που τους επιτρέπει να είναι μολυσματικοί.



Εικόνα 1. Κατευθύνσεις μετάδοσης των εντερικών ιών.

Πηγή: Albert Bosch [1998], Human enteric viruses in the water environment: a minireview. Internatl Microbiol. Vol. 1. pp. 191-196. [74]

Όσο περισσότερο ένας ιός επιβιώνει έξω από έναν ξενιστή τόσο μεγαλύτερες είναι οι πιθανότητες μετάδοσης του. Βέβαια, αυτές οι πιθανότητες επηρεάζονται από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες και παράγοντες, όπως η θερμότητα, η υγρασία

και το pH. Αυτοί και άλλοι παράγοντες θα ποικίλουν στην παρουσία και το βαθμό μεταξύ διαφορετικών περιβαλλόντων. Το μεγάλο πλεονέκτημα θα ήταν η γνώση των συνθηκών επιβίωσης των εντερικών ιών στο περιβάλλον, ώστε να σταματήσει ή να περιοριστεί η αλυσίδα μετάδοσης τους.

Σε μελέτες προσδιορισμού βαθμού επιβίωσης των ιών χρησιμοποιούνται κάποιες κοινές αρχές. Ένα συγκεκριμένο δείγμα (ύδατος, χώματος, τροφίμων κ.α.) μολύνεται τεχνητά με μια συγκεκριμένη ποσότητα ενός λοιμογόνου ιού και αποθηκεύεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και χρονικό διάστημα. Έπειτα, οι ιοί εξάγονται από το δείγμα και καταμετρούνται. Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή των ιών από τα τρόφιμα και περιβαλλοντικά δείγματα. Οι οποίες περιλαμβάνουν τον χωρισμό και την συγκέντρωση των ιών από το δείγμα έτσι ώστε να ανιχνευθούν σ'ένα σύστημα ανίχνευσης και να καταμετρηθούν. Στο τέλος διενεργούνται στατιστικές μελέτες από την σύγκριση του αρχικού αριθμού και του αριθμού που ανιχνεύθηκε στο δείγμα, έτσι ώστε να υπολογιστή οποιοδήποτε βαθμό πτώσης.

Έχουν γίνει πολλές μελέτες σε πολλά περιβαλλοντικά δείγματα και τρόφιμα. Μια χαρακτηριστική μελέτη για την επιβίωση του Ρότα-ιού είναι του Ansari et al. Οι οποίοι μολύναν τα ακροδάχτυλα του χεριού μέσα σ'ένα κοπρώδες εναιώρημα που περιείχε 10% Ρότα-ιό – Wa και παρατήρησαν την επιβίωση του για 260 λεπτά. Στα 20, 60 και 260 λεπτά τα ποσοστά του ιού που καταγράφηκαν στα ακροδάχτυλα ήταν 57%, 43% και 7% αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η μετάδοση του ιού μέσω επαφής των μολυσμένων ακροδαχτύλων για 10 δευτερόλεπτα σε ατσάλινο ανοξείδωτο δίσκο. Τα αποτελέσματα αυτής της επαφής έδειξαν πως στα 20 και 60 λεπτά ο ιός πάνω στο δίσκο καταγράφηκε σε ποσοστά 16% και 6% αντίστοιχα. Μελετήθηκε και η αντίθετη διαδικασία, δηλαδή η μεταφορά του ιού από το δίσκο στα καθαρά ακροδάχτυλα. Τα ποσοστά του ιού που καταγράφηκαν από την συγκεκριμένη διαδικασία στα 20 και 60 λεπτά ήταν 7% και 3% αντίστοιχα. Η συγκεκριμένη ερευνά αναδεικνύει πως ο ρότα-ιός επιβιώνει για αρκετές ώρες πάνω στο δέρμα και μπορεί να μεταφερθεί σε άλλες επιφάνειες.

Μια άλλη μελέτη για τον προσδιορισμό βαθμού επιβίωσης των αδενοϊών τύπου 40-41, του ιού της Ηπατίτιδας Α και του ιού της πολιομυελίτιδας 1, πραγματοποιήθηκε από τον Enriquez et. al. Στην συγκεκριμένη μελέτη, όπου ήταν συγκριτική, καταγράφηκαν οι βαθμοί επιβίωσης των αδενοϊών τύπου 40-41 και του ιού της πολιομυελίτιδας στο θαλασσινό νερό, στο πόσιμο νερό και στα λύματα στους 4°, 15°

και 23 °. Για τον ιό της Ηπατίτιδας Α καταγράφηκε στους 4 ° και 23 ° μονό στο πόσιμο νερό. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν πως οι αδενοϊοί τύπου 40-41 επιβιώνουν παραπάνω ημέρες και στα 3 διαφορετικά περιβάλλοντα, σε σχέση με τον ιό της πολιομυελίτιδας 1 και τον ιό της ηπατίτιδας Α. Η μεγαλύτερη επιβίωση των αδενοϊών τύπου 40-41 παρουσιάζεται κυρίως στο πόσιμο νερό και έτσι παρουσιάζουν μια δυνατή πορεία μετάδοσης.

Parameter	Value
Free chlorine (mg/l)	0
Total chlorine (mg/l)	0
pH	7.7
Alkalinity (mg/l)	90
Total hardness (mg/l)	134
Ca hardness (mg/l)	132
Mg hardness (mg/l)	2
Nitrogen (nitrate) (mg/l)	3.5
Nitrogen (ammonia) (mg/l)	0.05
Turbidity (NTU)	0.35

Εικόνα 2. Στοιχεία της χημικής ανάλυσης του πόσιμου νερού που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα.

Πηγή: Enriquez, C.E., Hurst, C.J. and Gerba, C.P. [1995], Survival of enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. Water Res. Vol. 29. pp. 2548–2553.

Πίνακας 3. Ημέρες επιβίωσης των 3 διαφορετικών τύπων ιών σε διαφορετικά περιβάλλοντα και θερμοκρασίες. [83]

Τύπος του ιού και τα περιβάλλοντα	Ημέρες επιβίωσης
Πόσιμο νερό στους 4	
Ιός της πολιομυελίτιδας 1	41
Ιός της ηπατίτιδας Α	56
Αδενοϊός τύπου 40	92
Αδενοϊός τύπου 41	304
Πόσιμο νερό στους 15	
Ιός της πολιομυελίτιδας 1	24
Αδενοϊός τύπου 40	87
Αδενοϊός τύπου 41	124
Πόσιμο νερό στους 23	
Ιός της πολιομυελίτιδας 1	11
Ιός της ηπατίτιδας Α	27
Αδενοϊός τύπου 40	60
Αδενοϊός τύπου 41	84
Θαλασσινό νερό στους 15	
Ιός της πολιομυελίτιδας 1	18
Αδενοϊός τύπου 40	77
Αδενοϊός τύπου 41	85
Πρωτογενής λύματα στους 4	
Ιός της πολιομυελίτιδας 1	36
Αδενοϊός τύπου 40	44
Αδενοϊός τύπου 41	48
Πρωτογενής λύματα στους 15	
Ιός της πολιομυελίτιδας 1	28
Αδενοϊός τύπου 40	40
Αδενοϊός τύπου 41	43
Δευτερογενής λύματα στους 4	
Ιός της πολιομυελίτιδας 1	49
Αδενοϊός τύπου 40	58
Αδενοϊός τύπου 41	47
Δευτερογενής λύματα στους 15	
Ιός της πολιομυελίτιδας 1	19
Αδενοϊός τύπου 40	43
Αδενοϊός τύπου 41	45

Ενώ για την επιβίωση του coxsackievirus στα τρόφιμα χαρακτηριστική είναι μελέτη του Grigor'eva et. al. Οι οποίοι ψέκασαν της ντομάτες, τις κόκκινες πιπεριές και τα κολοκύθια με νερό που περιείχε τον συγκεκριμένο ιό. Οι βαθμός επιβίωσης του ιού ήταν: 15-18 ημέρες στις ντομάτες, 7-10 ημέρες πιπεριές και 3-4 ημέρες στα

κολοκύθια. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πολλά περιστατικά ιικής μόλυνσης από τρόφιμα.

Με τέτοιου είδους πειράματα είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ο χρόνος επιβίωσης των εντερικών ιών στο περιβάλλον και στα τρόφιμα. Αν και χρειάζονται ακόμα πολλές μελέτες για να έχουμε την πλήρη γνώση της επιβίωσης τους. [74-81]

1. Εντεροϊοί (*Enteroviruses*)

Δομή

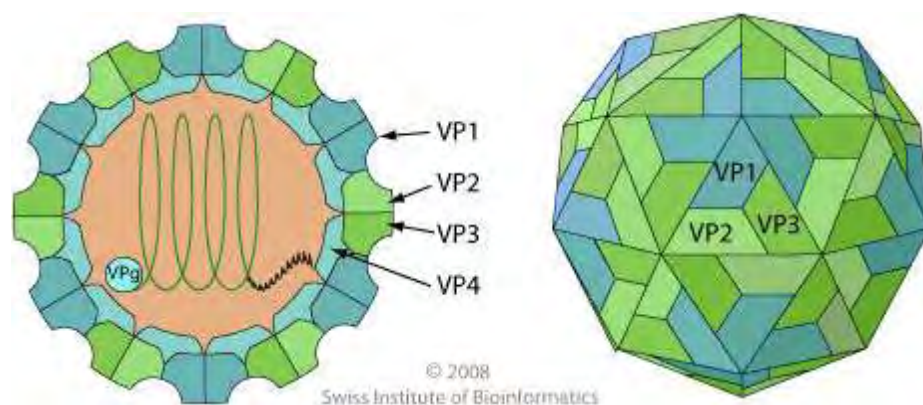
Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια των ιών Picorna (Picornaviridae). Πρόκειται για RNA ιούς καθώς το γενετικό τους υλικό αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA θετικής πόλωσης.[4]

Έχουν πολύ μικρό μέγεθος το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 27-30 nm. Έχουν σφαιρική δομή και είναι γυμνοί καθώς δεν φέρουν έλυτρο.[2]

Το καψίδιο τους αποτελείται από 32 καψομερίδια και η μορφολογία του είναι εικοσαεδρική. Ακόμη, η συμμετρία των νουκλεοκαψιδίων είναι κυβική και δεν διαθέτουν περίβλημα. [4]

Το καψίδιο του εντεροϊού το οποίο περιβάλλει το μονόκλωνο RNA μόριο του, έχει διάμετρο 30 nm και αποτελείται από τις δομικές πρωτεΐνες Vp1, Vp2, Vp3 και Vp4.

- i) την πρωτεΐνη Vpg, η οποία είναι προσαρτημένη στο 5' άκρο του RNA
- ii) και από λειτουργικές πρωτεΐνες (πρωτεάση και RNA πολυμεράση) [4]



Εικόνα 3. Δομή εντεροϊού

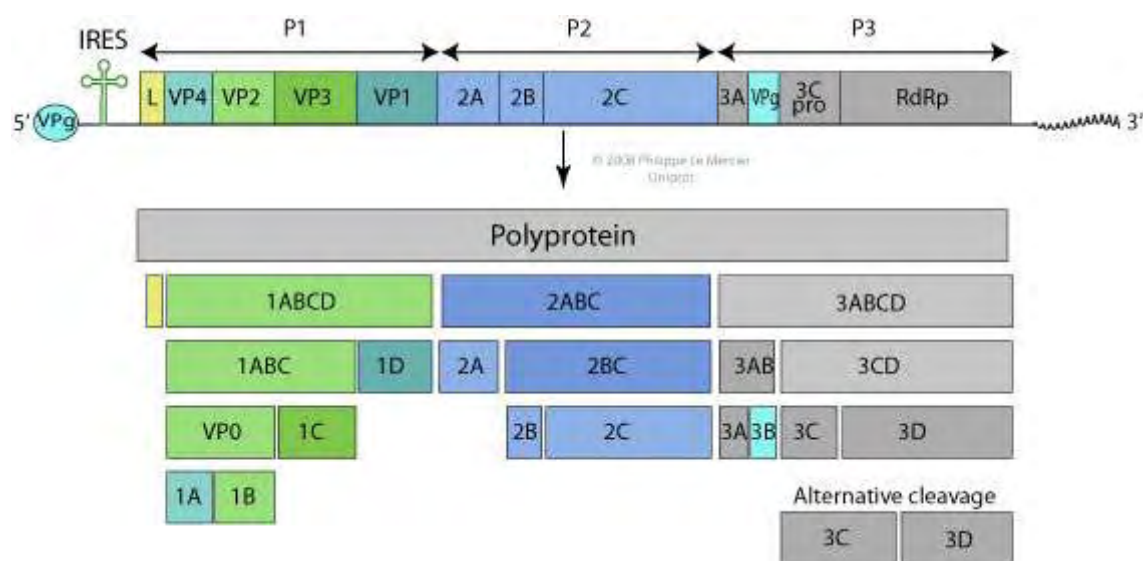
Πηγή: http://expasy.org/viralzone/all_by_protein/33.html [13]

Γονιδίωμα

Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης του Baltimore οι εντεροϊοί ανήκουν στην IV κατηγορία ιών. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει ιούς με ένα μόριο θετικού μονόκλωνου RNA (ssRNA(+)) ο όρος θετικό αναφέρεται στο γεγονός ότι το παραγόμενο mRNA μετά τη μόλυνση του κυττάρου είναι ίδιου προσανατολισμού με εκείνο του mRNA του ιού). Το μονόκλωνο αυτό γραμμικό μόριο RNA έχει μέγεθος 7.2 - 8.5 kb, είναι πολυαδενυλιωμένο και αποτελείται από μια περιοχή ORF και ακόμη είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση μιας πολυπρωτεΐνης

Το ιικό γονιδίωμα περιέχει μια ιική πρωτεΐνη, την VPg στο 5' άκρο στη θέση ενός μεθυλιωμένου νουκεοτιτικού καλύμματος.

Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τα δομικά πολυπεπίδια. Οι περιοχές P2 και P3 κωδικοποιούν τις μη δομικές πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με την αντιγραφή. Η περιοχή 3' UTR (untranslated region) είναι υπεύθυνη για την σύνθεση του (-) σκέλους. [6,12, 92]



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση γονιδιώματος εντεροϊού
Πηγή: http://expasy.org/viralzone/all_by_protein/33.html [13]

Ιδιότητες εντεροϊών

Οι εντεροϊοί είναι σχετικά σταθεροί σε θερμοκρασία δωματίου, ευαίσθητοι σε θερμοκρασία 50 °C, ενώ η άριστη θερμοκρασία πολλαπλασιασμού τους είναι οι 36-37 °C. Αδρανοποιούνται με θέρμανση στους 55 °C για 30 λεπτά. [5] Επίσης είναι ανθεκτικοί σε περιβάλλον με pH 3, καθώς δεν αποδομείται το καψίδιο τους και ακόμη, είναι ανθεκτικοί στον αιθέρα.[4]

Καταστροφή εντεροϊών

Η καταστροφή των εντεροϊών μπορεί να γίνει τόσο με χημικά μέσα όσο και με φυσικά. Η χρήση, κυρίως, της φορμαλδεΐδης 3% αλλά και άλλων ουσιών (HCl, αλογόνα, κ.α.) εξουδετερώνουν τους ιούς, όπως επίσης και η ξηρασία, η θέρμανση στους 50 °C για 1 ώρα απουσία MgCl₂, η επίδραση φωτός παρουσία συγκεκριμένων χρωστικών [2], χρήση υπεριάδους ακτινοβολίας καθώς και το χλώριο σε πυκνότητα 0,1 mg/l.

Ακόμη, κατά την παστερίωση του γάλακτος καταστρέφονται με την ξηρασία και με τη θέρμανση στους 56 °C για 30 λεπτά. [5]

Τύποι Εντεροϊών

Οι εντεροϊοί ονομάστηκαν έτσι λόγω του γεγονότος ότι απαντώνται στον εντερικό σωλήνα και η απομόνωση τους γίνεται από τα κόπρανα και από τον φάρυγγα. [4]

Όπως προαναφέρθηκε, οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae. Είναι οικουμενικοί, και μεταδίδονται κυρίως με την εντερική οδό.

Μέχρι σήμερα έχουν γνωστοποιηθεί 72 τύποι. Τους τύπους αυτούς τους διαχωρίζουμε σε 5 ομάδες:

1. Ιοί Πολιομυελίτιδας (Polioviruses) τύποι 1, 2, 3.
2. Ιοί Coxsackie A τύποι 1-22 και 24 και Coxsackie B τύποι 1-6
3. Ιοί ECHO τύποι 1-9 , 11-27 και 29-33
4. Εντεροϊοί 68-71
5. Ιός της ηπατίτιδας A (Hepatovirus)

Ακόμη έχουν ανακαλυφθεί και διάφοροι άλλοι εντεροϊοί πιθήκων, βοοειδών και χοίρων. [5, 18, 89, 90,92]

Κλινικά σύνδρομα που προκαλούν - Παθογένεια

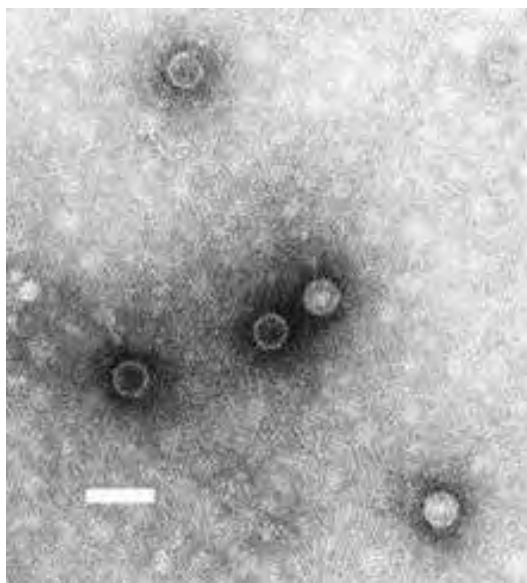
Οι εντεροϊοί οφείλονται για μια σειρά νοσημάτων που περιλαμβάνουν ασυμπτωματικές μολύνσεις, εγκεφαλίτιδα, παραλυτική πολιομυελίτιδα, άσηπτη μηνιγγίτιδα και μυοκαρδίτιδα.

Απομόνωση των εντεροϊών γίνεται από τον λάρυγγα καθώς επίσης και από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, τον φάρυγγα και τα κόπρανα. Η απομόνωση τους από τον λάρυγγα, τον φάρυγγα και τα κόπρανα είναι η πιο συχνή καθώς επίσης και πιο εύκολη μέθοδος απομόνωσης σε σχέση με την απομόνωση τους από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό η οποία είναι πιο δύσκολη αλλά η πιο ακριβέστερη μέθοδος.[5]

Οι πιο επιρρεπείς στις μολύνσεις που προκαλούν οι εντεροϊοί είναι τα νήπια και οι ασθενείς οι οποίοι βρίσκονται σε φάση ανοσοκαταστολής. [4,20,90]

i. Ιοί Πολιομυελίτιδας (Polioviruses) τύποι 1,2,3

Πρόκειται για παράσιτα τα οποία εντοπίζονται στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και στον φάρυγγα και είναι δυνατόν να προκαλέσουν την νόσο πολιομυελίτιδα. Υπάρχουν τρεις τύποι ιών πολιομυελίτιδας οι 1,2,3. Ο ιός της πολιομυελίτιδας έχει κυβική συμμετρία με διάμετρο 28 nm και έχει τα γενικά χαρακτηριστικά των εντεροϊών. Ο ιός εντοπίζεται κυρίως στον φάρυγγα και στον εντερικό σωλήνα και αποβάλλεται μέσω των κοπράνων πριν ακόμα εμφανιστούν τα συμπτώματα της νόσου.



Εικόνα 5. Ιός πολιομυελίτιδας Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Poliovirus> [14]

Παθογένεια

Η μόλυνση με τον ιό της πολιομυελίτιδας γίνεται μέσω της κοπροστοματικής οδού.

Έπειτα από την είσοδο του στον οργανισμό, εγκαθίσταται στις αμυγδαλές και πιο συγκεκριμένα στον λεμφικό ιστό και μέσω των λεμφικών αγγείων εισέρχεται στα βαθύτερα τραχηλικά και μεσεντέρια λεμφογάγγλια και μέσω αυτών στο αίμα. Στη συνέχεια μέσω του αίματος μεταφέρεται στα διάφορα όργανα όπου και πολλαπλασιάζεται. Έπειτα μεταφέρεται πάλι από τα όργανα στην κυκλοφορία του αίματος.

Συνήθως οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τον ιό της πολιομυελίτιδας είναι ασυμπτωματικές. Πιο σπάνια προκαλείται εκτροπική πολιομυελίτιδα, άσηπτη μηνιγγίτιδα, παραλυτική πολιομυελίτιδα.

Πίνακας 4. Λοιμώξεις προκαλούμενες από ιό της πολιομυελίτιδας.

ΜΟΡΦΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ
Ασυμπτωματική	90% των περιπτώσεων	Περιορισμός ιού στο στοματοφάρυγγα και στο έντερο Κανένα σύμπτωμα
Εκτροπική πολιομυελίτιδα	5% των περιπτώσεων	Ελαφρά εμπύρετη νόσος Μη ειδικά συμπτώματα
Άσηπτη μηνιγγίτιδα	1-2% των περιπτώσεων	Μηνιγγιτιδικά συμπτώματα (δυσκαμψία, άλγος σε ράχη και αυχένα, μυϊκοί σπασμοί)
Παραλυτική πολιομυελίτιδα	0,1-2% των περιπτώσεων	Μεταφορά ιού μέσω αίματος στο ΚΝΣ όπου εγκαθίσταται και πολλαπλασιάζεται στα κινητικά κύτταρα των πρόσθιων κεράτων του νωτιαίου μυελού και τους κινητικούς πυρήνες των εγκεφαλικών νεύρων

Επιδημιολογία

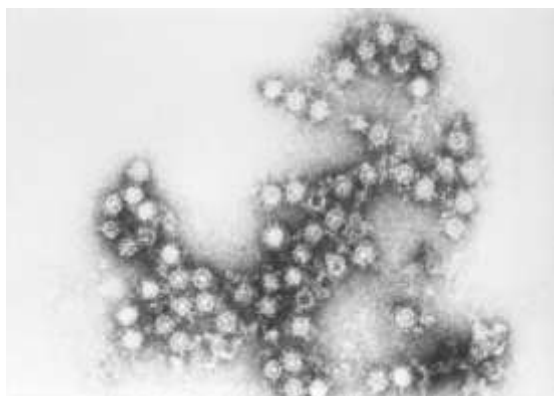
Οι polio ιοί που διοχετεύονται στο περιβάλλον μέσα από τις ανθρώπινες εκκρίσεις αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία καθώς είναι δυνατή η μετάδοση τους σε άτομα που δεν είναι εμβολιασμένα. [93]

ii. Ιοί Coxsackie τύπου A και B

Οι ιοί Coxsackie ανακαλύφθηκαν το 1948 στην πόλη Coxsackie της Ν. Υόρκης έπειτα από την απομόνωση τους από κόπρανα παιδιών. Η απομόνωση τους γίνεται από τα κόπρανα, από τον ρινοφάρυγγα ασθενών και υγιών φορέων καθώς επίσης και από λύματα.

Τύποι ιών Coxsackie

Τα στελέχη των ιών *Coxsackie* χωρίζονται σε δύο ομάδες. Στην ομάδα A η οποία περιλαμβάνει τα στελέχη 1-24 και στην ομάδα B η οποία περιλαμβάνει 6 στελέχη.



Εικόνα 6. Ιός Coxsackie B4

Παθογένεια

Οι λοιμώξεις που προκαλούν στον άνθρωπο οι ιοί *Coxsackie* είναι ποικίλες και εμφανίζονται κυρίως κατά τη διάρκεια του θέρους και το φθινόπωρο με τη μορφή εμπύρετων νοσημάτων βραχείας διάρκειας. Η μόλυνση από τους ιούς *Coxsackie* γίνεται, με την εντερική οδό και η επώαση της νόσου κυμαίνεται από 2 έως 9 μέρες. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται νοσήματα που προκαλούνται από τους ιούς Coxsackie καθώς και τα στελέχη των ιών τα οποία οφείλονται για τα νοσήματα αυτά.

Πίνακας 5. Τύποι ιών Coxsackie και ασθένειες που προκαλούν.

ΤΥΠΟΙ ΙΩΝ Coxsackie	ΣΤΕΛΕΧΗ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ
Τύπος Α	1-6, 8, 10, 22 4, 5, 9, 10, 16 7, 9 2, 10, 21, 24 24 4, 9, 18, 20-22, 24	Εμπύρετο νόσημα κατά το θέρος Ερπητική κυνάγχη Νόσος χειρών, ποδών και στόματος Άσηπτη μηνιγγίτιδα Λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος Οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα Λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος
Τύπος Β	1-5	Εμπύρετο νόσημα κατά το θέρος Επιδημική μυαλγία ή πλευροδυνία (ή νόσος Bornholm) Άσηπτη μηνιγγίτιδα Οξεία μυοκαρδίτιδα και οξεία περικαρδίτιδα Μεταϊκό σύνδρομο κοπώσεως Εμπλέκονται και στην παθογένεια του σακχαρώδους διαβήτη

Επιδημιολογία

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Νότια Αφρική, σε σταθμούς επεξεργασίας νερού, στα δείγματα ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 88% εντεροϊοί

Coxsackie B και polio ιοί σε ποσοστό 12%. (Grabow et al., 2004). Οι coxsackie ιοί αποτελούν σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα για την πρόκληση υδατογενών επιδημιών. [94]

iii. Ιοί ECHO

Οι ιοί ECHO πρωταπομονώθηκαν το 1950 κατά την καλλιέργεια κυττάρων με σκοπό την απομόνωση και την μελέτη ιών πολιομυελίτιδας. Το όνομα τους προκύπτει από τα αρχικά Enteric Cytopathogenic Human Orphan καθώς δεν ήταν γνωστό για το αν συνδέονται με κλινικά σύνδρομα. Μια ονομασία η οποία παρέμεινε ακόμη και μετά από την συσχέτιση τους με ασθένειες που προκαλούν.

Ιδιότητες ECHO ιών

Όπως όλοι οι εντεροϊοί, έτσι και οι ιοί ECHO απομονώνονται κυρίως από τα κόπρανα. Η μόλυνση γίνεται από την γαστρεντερική οδό και το αναπνευστικό σύστημα λόγω συνθηκών μειωμένης υγιεινής. Προσβάλλουν βρέφη και νήπια και επίσης σχετίζονται με υψηλά επίπεδα θνησιμότητας νηπίων.

Το μέγεθος των ιών αυτών κυμαίνεται από 24 έως 30 nm, περιχέουν καψίδιο, στο οποίο περικλείεται ένα μονόκλωνο τμήμα RNA μήκους 7,5 kb. Ακόμη, οι ιοί ECHO έχουν τις ίδιες γενικές ιδιότητες με τους υπόλοιπους εντεροϊούς που προαναφέρθηκαν.

Τύποι ιών ECHO

Υπάρχουν 30 τύποι ECHO ιών (1-34).

Παθογένεια

Έχει παρατηρηθεί ότι οι ECHO ιοί συνδέονται με την εμφάνιση κλινικών συνδρόμων όπως άσηπτη μηνιγγίτιδα, διάρροια, απλή πυρετική κίνηση, λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, εμπύρετη εξανθηματική νόσο καθώς και παρέσεις.

Επίσης το διάστημα 1976-1979 στις ΗΠΑ παρατηρήθηκε ότι οι ιοί ECHO ήταν υπεύθυνοι για το 78% των κρουσμάτων μηνιγγιτιδών και εγκεφαλίτιδων.

Πίνακας 6. Τύποι ιών ECHO και ασθένειες που προκαλούν.

ΤΥΠΟΙ ECHO ΙΩΝ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ
4, 6,9,11,14,16,18,25,30,31,33	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
4,9,18	Προκαλούν και την εμφάνιση εξανθημάτων
16	Εμπύρετη νόσο συνδεδεμένη από εξάνθημα «Εξανθηματική νόσος της Βοστώνης»

Επιδημιολογία

Οι λοιμώξεις από τους ιούς ECHO γίνονται κατά την διάρκεια του θέρους ή την αρχή του φθινοπώρου. Ακόμη, διαφορετικοί ορότυποι των ιών αυτών επικρατούν κατά καιρούς, καθώς κάποιοι ενδημούν και κάποιοι άλλοι ελλείπουν από συγκεκριμένες περιοχές χρόνο με τον χρόνο.

iv. Άλλοι τύποι εντεροϊών

Υπάρχει μια κατηγορία ιών οι οποίοι απομονώνονται από καλλιέργειες κυττάρων νεφρών πιθήκων, οι οποίοι εμφανίζουν της γενικές ιδιότητες των εντεροϊών και γι αυτό τους κατατάσσουμε στην οικογένεια των εντεροϊών. Οι ιοί αυτοί αριθμούνται από τον αριθμό 68.

Οι ιοί και κάποια χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7. Τύποι εντεροϊών και χαρακτηριστικά τους.

ΤΥΠΟΙ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	Εντεροϊός 68	Εντεροϊός 70	Εντεροϊός 71
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	Απομονώθηκε από το αναπνευστικό σύστημα ασθενούς παιδιού με πνευμονία ή βρογχολίτιδα.	Προκαλεί οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα.	Προκαλεί εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα, παραλύσεις παρόμοιες προς τις παρατηρούμενες της πολιομυελίτιδας.

2. Αδενοϊοί (adenovirus)

Ιστορική αναδρομή

Τα πρώτα μέλη της οικογένειας των αδενοϊών ανακαλύφθηκαν από τον Rowe και τους συναδέλφους του, το 1953. Η απομόνωση τους έγινε από κυτταρικές καλλιέργειες αδενοειδών εκβλαστήσεων και αμυγδαλών και γι αυτό ονομάστηκαν *αδενοϊοί*. Ακόμη, αδενοϊοί, έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο, τους πιθήκους, τα βοοειδή, τους χοίρους, τους κύνες, τα πρόβατα και τα πτηνά.

Αργότερα, το 1962, ο Trentin και η ομάδα του με πειράματα ανακάλυψαν ότι ένας τύπος αδενοϊού (τύπος 12) οφείλονταν για την εμφάνιση όγκων σε χάμστερ. Γεγονός το οποίο δημιούργησε υποψίες για την πρόκληση καρκίνου ανθρώπινης προέλευσης, αλλά αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί.

Αξίζει να σημειωθεί ότι πειράματα με τη χρήση των αδενοϊών έχουν συνεισφέρει στην μοριακή βιολογία και πιο συγκεκριμένα στην κατανόηση της διαδικασίας του ματίσματος.[40,41,42]

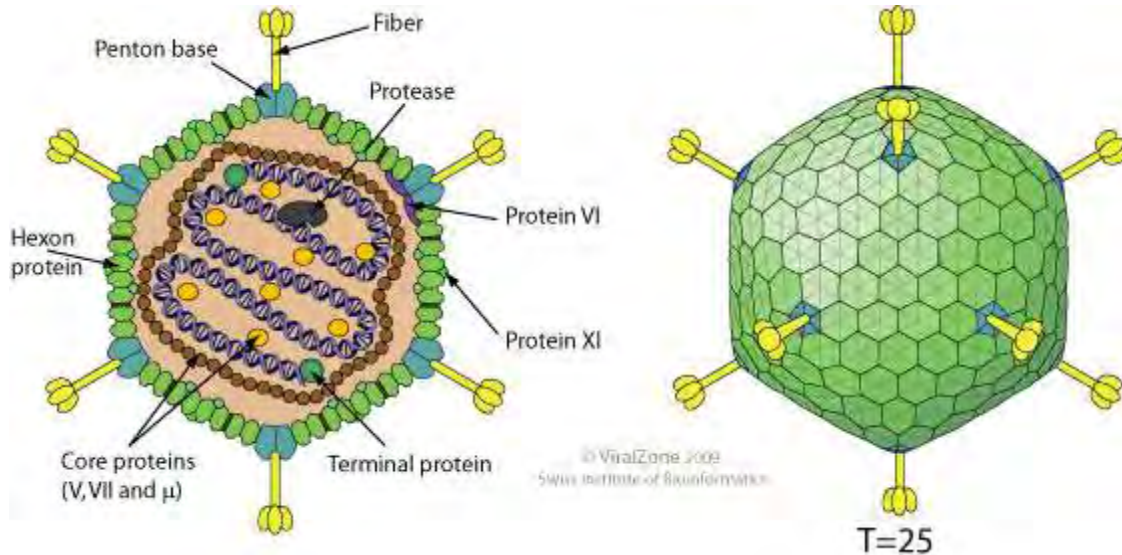
Δομή

Τα σωματίδια του αδενοϊού έχουν κυβική εικοσαεδρική συμμετρία και διάμετρο 70-90 nm, επίσης δεν έχουν περίβλημα (κυτταρικό φάκελο). Το καψίδιο του ιού είναι δομημένο από 252 καψομερίδια. Τα 12 καψομερίδια βρίσκονται στις κορυφές του εικοσάεδρου και φέρουν κεραίες οι οποίες καταλήγουν σε μικρή διόγκωση και καλούνται *πεντόνες*. Τα υπόλοιπα 240 καψομερίδια συναρμολογούν τις 20 πλευρές και τα άκρα του εικοσάεδρου και καλούνται *εξόνες*, λόγω της εξαγωνικής παράταξης.

- Το καψομερίδιο πεντόνιο είναι ένα ομοιοπολικό σύμπλεγμα δυο πρωτεϊνών, της 1) ομοπενταμερικής η οποία είναι η πρωτεΐνη της πεντονικής βάσης και της 2) ομοτριμερικής η οποία είναι η πρωτεΐνη των κεραίων.
- Το καψομερίδιο εξόνιο είναι ένα ψευδοεξαγωνικό τριμερές τοποθετημένο στις 20 πλευρές του εικοσάεδρου, που δημιουργείται από τριπλή επανάληψη των δυο β-βαρελιών στην βάση του κάθε

εξονίου. Τα εξόνια λόγω της διαφορετικής φύσεως τους κατατάσσονται σε 4 είδη: H1, H2, H3, H4.

[4,5,28,40,42,43,44,45,46,47]

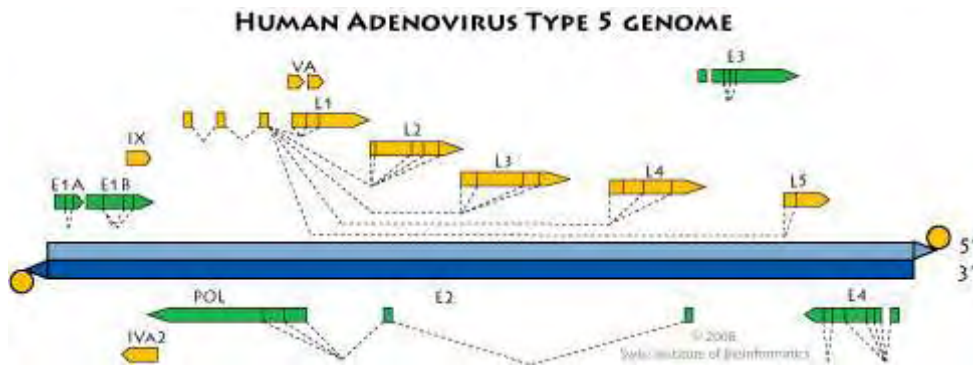


Εικόνα 7. Δομή αδενοϊού

Πηγή: http://expasy.org/viralzone/all_by_species/4.html [13]

Γονιδίωμα

Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης του Baltimore οι αδενοϊοί ανήκουν στην I κατηγορία ιών. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ιοί των οποίων το γενετικό υλικό είναι ένα δίκλωνο μόριο DNA. Το γένωμα του αδενοϊού είναι μη κυκλικό, γραμμικό δίκλωνο DNA περίπου 30-38kbp και περιέχει 30-40 γονίδια. Είναι ο μεγαλύτερος ιός της ομάδας του, η επιβίωση και η αντιγραφή του βασίζονται στον κύτταρο ξενιστή. Σε κάθε αλυσίδα του δίκλωνου DNA του, στα 5' άκρα βρίσκεται συνδεδεμένη μια τελική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 55kDa η οποία λειτουργεί ως εκκινήτης για την αντιγραφή του DNA του ιού και εγγυάται πως τα άκρα του γονιδιώματος έχουν αντιγραφεί πιστά. Ακόμη, το γονιδίωμα του κωδικοποιεί τόσο δομικές πρωτεΐνες αλλά και μη δομικές πρωτεΐνες. [19,21]



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση γονιδιώματος αδενοϊού
 Πηγή: http://expasy.org/viralzone/all_by_species/4.html [13]

➤ Δομικές πρωτεΐνες.

Κωδικοποιούνται περίπου 10 δομικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι τοποθετημένες στις κεραίες, στον πυρήνα και στο καψίδιο και είναι υπεύθυνες για τον πολλαπλασιασμό και την αναπαραγωγή του ιού. Πιο συγκεκριμένα είναι υπεύθυνες για την σταθερότητα, την πρόσδεση και την μεταφορά του γενετικού του υλικού στο κύτταρο ξενιστή καθώς και για την έναρξη της αντιγραφής του και το πακετάρισμα του γενετικού του υλικού.

➤ Μη δομικές πρωτεΐνες.

Στόχος των πρωτεϊνών αυτών είναι η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών του κυττάρου ξενιστή τα οποία είναι απαραίτητα για την σύνθεση του DNA, την ενεργοποίηση των γονιδίων του ιού και την προστασία του μολυσμένου κυττάρου από την ανοσολογική άμυνα.

Αντιγραφή αδενοϊού

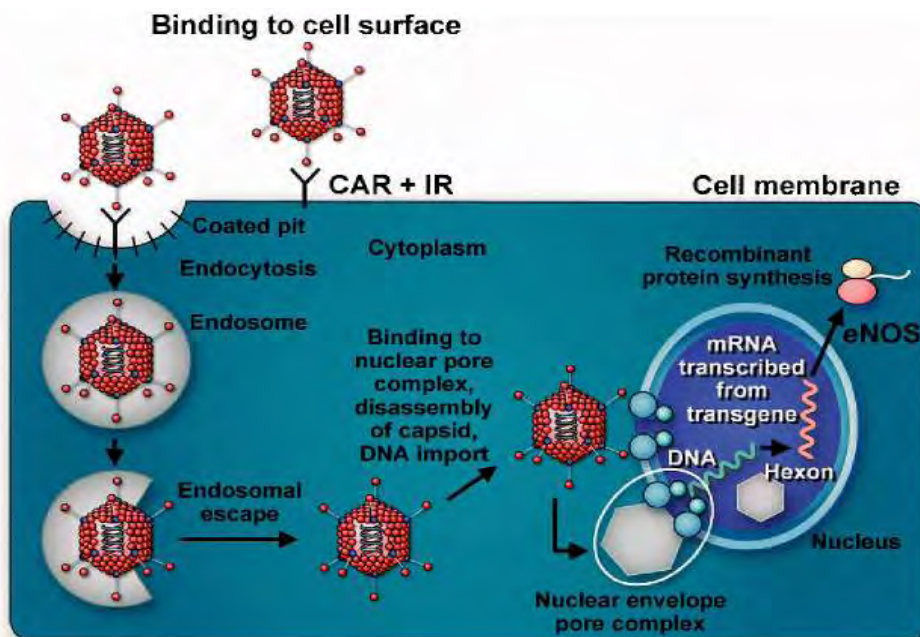
Η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός του ιού λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή έπειτα από μόλυνση του. Για να εισέλθει ο ιός στο κύτταρο είναι απαραίτητες δύο ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ιού και του κυττάρου.

- Πρώτα αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη της κεραίας με τον υποδοχέα στο κύτταρο-ξενιστή. Ο CD46 υποδοχέας είναι ειδικός για τους ορότυπους

της Β ομάδας ενώ ο υποδοχέας CAR (coxsackievirus adenovirus receptor) είναι ειδικός για τους ορότυπους των υπόλοιπων ομάδων. Ακόμη έχει παρατηρηθεί πως τα μόρια ΜHC και τα κατάλοιπα του σιαλικού οξέος μπορούν να λειτουργήσουν ως υποδοχείς.

- Ακολουθεί μια δεύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης της πεντανικής βάσης του ιού και του συν-υποδοχέα που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου ο οποίος είναι μια AV ιντεγρίνη.

Έπειτα από την σύνδεση του ιού στην επιφάνεια του κυττάρου, ο ιός μεταφέρεται στο εσωτερικό του μέσα σ' ένα ενδόσωμα. Μετά την είσοδο του ενδοσώματος στο εσωτερικό, οξινίζεται με αποτέλεσμα η δομή του ιού να υφίσταται αλλαγές και ο ιός να απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Στην συνέχεια, το νιρίον, εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου διαμέσου των πυρηνικών πόρων και με την βοήθεια μικροσωληνίσκων, όπου αρχίζει να πολλαπλασιάζεται.



Εικόνα 9. Μόλυνση του κυττάρου από αδενοϊό.

Πηγή: <http://www.nature.com/jcbfm/journal/v23/n11/images/9591473f5.jpg>
[12]

Κύκλος ζωής αδενοϊού

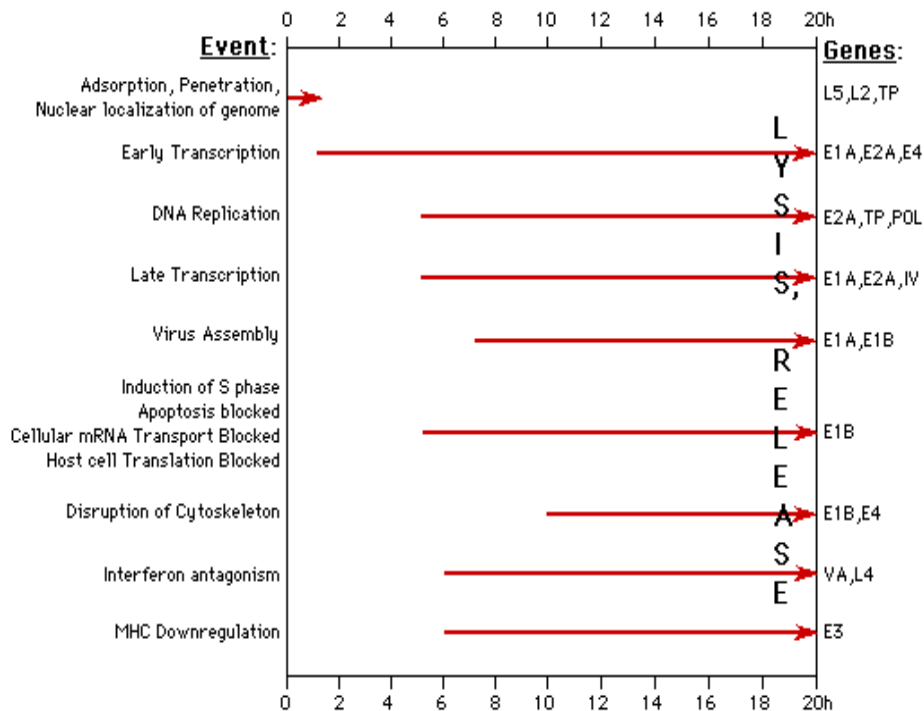
Ο κύκλος ζωής του ιού διακρίνεται σε δύο φάσεις, στην αρχική και την τελική.

- Αρχική φάση: εκφράζονται γονίδια τα οποία είναι χρήσιμα για την ιική αντιγραφή. Πιο συγκεκριμένα εκφράζονται τα γονίδια E1A,E1B,E2A,E2B,E3 και E4.
- Τελική φάση: εκφράζονται γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του καψιδίου τα οποία είναι τα L1,L2,L3,L4 και L5.

Τα γονίδια που εκφράζονται σε κάθε φάση, και ο ρόλος τους, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 8) καθώς και στο διάγραμμα που ακολουθεί (εικόνα 10).

Πίνακας 8. Εκφραζόμενα γονίδια σε κάθε φάση του κύκλου ζωής του αδενοϊού.

Φάση κύκλου	Γονίδια	Ρόλος
Αρχική	E2A,TP και POL	Αντιγραφή
	E1A,E2A, E4καιIV	Μεταγραφή
	E1B	Είσοδο κυττάρου στη φάση S, μεταφορά κυτταρικού mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα
	E1B και E4	Αποδόμηση του κυτταροσκελετού μολυσμένου κυττάρου
	E3	υπολειτουργία των MHC κυττάρων,
	E1A και E1B	συναρμολόγηση του ιού
Τελική	L2, L5 και TP	προσρόφηση του ιού και διείσδυση του γενετικού του υλικού
	VA και L4	τα προϊόντα τους είναι ανταγωνιστικά της ιντερφερόνης



Εικόνα 10. Ο κύκλος ζωής του αδενοϊού διαιρείται σε αρχική και τελική φάση
 Πηγή: <http://www.microbiologybytes.com/virology/Adenoviruses.html>

[28,40,42,47,63,64,65,66,67,68,69]

Ιδιότητες αδενοϊών

Οι αδενοϊοί είναι ανθεκτικοί στον αιθέρα ενώ καταστρέφονται με θέρμανση στους 56°C για 30 λεπτά. Επίσης είναι σταθεροί σε pH 6 έως 9. Μείωση του pH σε τιμές ≤ 2 ή αύξηση του pH σε τιμές ≤ 10 είναι καταστροφικές για τους αδενοϊούς.[4]

Τύποι

Οι αδενοϊοί αποτελούν την οικογένεια Adenoviridae η οποία διαιρείται σε 4 γένη, τα 1) Aviadenovirus, 2) Mastadenovirus, 3) Atadenovirus και 4) Siadenovirus.

Το γένος Mastadenovirus περιλαμβάνει του αδενοϊούς που προσβάλλουν τα θηλαστικά και πιο συγκεκριμένα τους αδενοϊούς του ανθρώπου, του πιθήκου, των χοίρων, των προβάτων, των ίππων και των κυνών. Το γένος Aviadenovirus περιλαμβάνει του αδενοϊούς που προσβάλλουν τα πτηνά.

Οι ανθρώπινοι αδενοϊοί βάση της ικανότητας αιμοσυγκόλλησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς και της % αναλογίας σε γουανίνη - κυτοσίνη του ιικού τους DNA, χωρίζονται σε 6 ομάδες (A – F). Στις ομάδες αυτές συνολικά περιέχονται 51 τύποι αδενοϊών οι οποίοι χαρακτηρίζονται από το γράμμα h και από έναν αριθμό (1 -

51). Οι ομάδες και τα στελέχη των αδενοϊών που περιέχουν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. [40,44,48,49,50]

Πίνακας 9. Τύποι αδενοϊών

Ομάδες	Τύποι
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 34, 35, 50
C	1, 2, 5, 6
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51
E	4
F	40, 41

Παθογένεια

Οι αδενοϊοί οφείλονται για μια αρκετά μεγάλη ποικιλία λοιμώξεων στο αναπνευστικό σύστημα, τον επιπεφυκότα, το ουροποιητικό, το γαστρεντερικό και το ΚΝΣ και σπανιότερα και σε άλλα σημεία.

Η είσοδος του ιού στον οργανισμό γίνεται όπως και σε όλους τους εντερικής προέλευσης ιούς μέσω της στοματοεντερικής οδού, έπειτα από απευθείας επαφή καθώς και μέσω του νερού.

Μπορούν να διατηρηθούν κρυφά μέσα στις αμυγδαλές (όπου μπορούν να παραμείνουν για χρόνια), στα αδενοειδή και σε άλλους λεμφικούς ιστούς και μπορούν εύκολα να ενεργοποιηθούν. Ακόμη, τα γένη του αδενοϊού μπορούν να κρύβονται και στα ουρά.[4]

Πίνακας 10. Τύποι αδενοϊών και ασθένειες που προκαλούν.

Τύποι Αδενοϊών	Κλινικά σύνδρομα τα οποία προκαλούν	Ηλικίες προσβαλλόμενων ατόμων
3, 4, 7, 14, 21	Οξεία αναπνευστική νόσος	Νεοσύλλεκτοι στρατιώτες
1, 2, 3, 7	Πνευμονία	Μικρά παιδιά
1, 2, 3, 5, 6, 7	Οξεία εμπύρετη φαρυγγίτιδα	Μικρά παιδιά
3, 7, 14	Φαρυγγοεπιπεφυκτικός πυρετός	Παιδιά σχολικής ηλικίας
8, 11, 19, 37	Επιδημική κερατοεπιπεφυκίτιδα	Όλες οι ηλικίες

11, 21	Οξεία αιμορραγική κυστίτιδα	Μικρά παιδιά
40, 41	Γαστρεντερίτιδα	Μικρά παιδιά
7	Εγκολεασμός εντέρου	Μικρά παιδιά
7	Μεσεντέριος αδενίτιδα	Μικρά παιδιά
7	Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα	Όλες οι ηλικίες

α. Αναπνευστικές παθήσεις στα παιδιά

Οι αδενοϊοί οφείλονται για το 10% περίπου της παιδικής πνευμονίας. Σε παιδιά ηλικίας από τεσσάρων ετών και κάτω οφείλονται για το 5% των έντονων αναπνευστικών λοιμώξεων και το 10% των λοιμώξεων αυτών θεραπεύεται σ αυτήν την ηλικία. Ενώ μπορούν να προκαλέσουν λαρυγγοτραχειοβρογχίτιδα οι πιο σοβαρές λοιμώξεις που προκαλούν είναι οι πνευμονίες. Οι τύποι οι οποίοι προκαλούν τις λοιμώξεις αυτές είναι οι 1, 2, 5 και 6.

β. Φαρυγγοεπιπεφυκτικός πυρετός

Οι τύποι των αδενοϊών 3,7 και 14 προκαλούν την ασθένεια αυτή της οποίας τα χαρακτηριστικά είναι ο υψηλός πυρετός, η αδενοειδής αύξηση και η επιπεφυκίτιδα. Η μόλυνση αυτή γίνεται κυρίως από τα κολυμβητήρια ενώ μπορεί να αποφευχθεί με χλωρίωση του νερού της πισίνας.

γ. Γαστρεντερίτιδα

Έχει παρατηρηθεί ότι 4-15% των παιδιών που νοσηλεύονται με γαστρεντερίτιδα οφείλεται σε μόλυνση από αδενοϊούς. Οι τύποι Ad3 ή Ad7 προκαλούν συστηματικά γαστρεντερίτιδα, προκαλώντας διάρροια και αναπνευστικά προβλήματα σ ένα παιδί με υψηλό πυρετό.

Ωστόσο, οι τύποι 40 και 41 ενοχοποιούνται ως αιτία οξείας γαστρεντερικού νόσου στα παιδιά. Ανευρίσκονται στα δείγματα των κοπράνων και χαρακτηρίζονται ως μη καλλιιεργούμενοι αδενοϊοί. Για την απομόνωση τους όμως χρησιμοποιείται το στέλεχος HEK-293.

δ. Οξεία αναπνευστική νόσος νεοσύλλεκτων στρατιωτών

Οι τύποι 3,4,7 και 21 οφείλονται για την ασθένεια αυτή ενώ έχει αναφερθεί και ο τύπος 14. Συμπτώματα της ασθένειας είναι ο πυρετός, η δυσφορία, η φαρυγγίτιδα και ο βήχας. Ενώ η πνευμονία εμφανίζεται στο 10% των περιπτώσεων. Τα ξεσπάσματα δεν περιλαμβάνουν τους παλιούς στρατιώτες αλλά προκαλούν μια υψηλή νοσηρότητα μεταξύ των πρόσφατα στρατολογημένων στρατιωτών.

ε. Οξεία αιμορραγική κυστίτιδα

Η οξεία αιμορραγική κυστίτιδα απαντάται στα παιδιά ηλικίας από 6-15 ετών και προκαλείται από τους τύπους 11 και 21. Συμπτώματα της ασθένειας αυτής είναι η δυσουρία με αιματουρία.

στ. Μεσεντέριος αδενίτιδα και εγκολεασμός του εντέρου

Στα παιδιά οι αδενοϊοί μπορούν να προκαλέσουν μεσεντέριο αδενίτιδα κατά την οποία παρατηρείται διόγκωση των λεμφαγγείων και εγκολεασμό του εντέρου όπου παρατηρείται αναδίπλωση του εντέρου και του αποφρακτικού ειλεού.

ζ. Μηνιγγίτιδα

Σπάνια έχει παρατηρηθεί πρόκληση μηνιγγίτιδας από αδενοϊούς. [9]

η. Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα

Σε περιπτώσεις ασθενών με μηνιγγοεγκεφαλίτιδα έχουν απομονωθεί αδενοϊοί από εγκεφαλική ουσία και ENY. Ενώ έχουν εμφανιστεί περιπτώσεις μηνιγγοεγκεφαλίτιδας έπειτα από επιδημίες πνευμονίας από τον τύπο 7, παρόλο αυτά δεν αποτελούν συχνά αίτια των λοιμώξεων αυτών.

θ. Κοκκίτης

Έχουν απομονωθεί αδενοϊοί από ασθενείς με Β. Κοκίτη, παρόλο αυτά η συμβολή του στο σύνδρομο είναι ακόμη άγνωστη.

ι. Μολύνσεις αδενοϊών σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς

Έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με AIDs μολύνσεις στα νεφρά προκαλούμενες από αδενοϊούς οι οποίοι απομονώνονται εύκολα από τα ούρα, ενώ συχνά απομονώνονται από τα κόπρανα των ασθενών αδενοϊοί της ομάδας D.

Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι οι μολύνσεις από αδενοϊούς σε παραλήπτες μεταμόσχευσης μυελού των οστών είναι υπεύθυνες για πλήρη θνησιμότητα. Παρόλο αυτά μέχρι στιγμής δεν έχει εξακριβωθεί ο ακριβής ρόλος τους σε παραλήπτες μεταμόσχευσης μυελού των οστών.

κ. Μολύνσεις του ματιού

Οι αδενοϊοί οφείλονται για μολύνσεις των ματιών όπως η θυλακοειδής επιπεφυκίτιδα και η επιδημική κερατοεπιπεφυκίτιδα.

Η θυλακοειδής επιπεφυκίτιδα ματιών είναι μέρος του φαρυγγοεπιπεφυκτικού πυρετού, επίσης μπορεί να απαντάται και ως ξεχωριστό σύνδρομο. Η μόλυνση συνήθως γίνεται από τα κολυμβητήρια.

Η επιδημική κερατοεπιπεφυκίτιδα είναι ένα ξεχωριστό σύνδρομο και χαρακτηρίζεται από μια επιθετική επιπεφυκίτιδα, άλγος, φωτοφοβία και λεμφοπάθεια. Η αδενοϊκή

κερατοεπιπεφικίτιδα επηρεάζει κυρίως τους άνδρες στις δυτικές χώρες ή τα παιδιά στην Ασία και διαρκεί από 4 έως 6 εβδομάδες. Για παράδειγμα, οι μαθητές της Αμερικής δε περιέχουν αντισώματα για τον Ad8, ενώ ο μισός παιδικός πληθυσμός της Ιαπωνίας ή της Ταϊβάν περιέχουν τέτοια αντισώματα.

[2,4,40,51-62]

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - Polymerase Chain Reaction (PCR)

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) έχει σαν βάση τον ειδικό πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας DNA και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Έχει πολύ μεγάλη ευαισθησία και γ' αυτό αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της Μοριακής Βιολογίας.

Πρωτοεφαρμόστηκε από τους Mullis, Falona και Saiki της εταιρίας Cetus δίνοντας το 1993 το βραβείο Νόμπελ Χημείας στον Dr Mullis.

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Με την τεχνική της PCR πραγματοποιείται η σύνθεση (και η ενίσχυση) ενός τμήματος DNA "in vitro". Μέσα σε λίγες ώρες το DNA στόχος πολλαπλασιάζεται σε χιλιάδες αντίγραφα, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Η αρχή της μεθόδου της PCR αναπτύχθηκε από τους Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του '60, και βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων του δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος.

Για την επιμήκυνση του DNA στόχου, το οποίο αποτελεί και το πρότυπο DNA στην PCR, απαιτούνται ένα ζεύγος εκκινητών αντίστροφης κατεύθυνσης (primers), δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), ιόντα Mg^{++} καθώς και το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση.

Η μέθοδος της PCR διακρίνεται σε τρία στάδια, την *μετουσίωση (denaturation)*, τον *υβριδισμό (annealing)* και την *επιμήκυνση (extension)*. Τα στάδια αυτά αποτελούν ένα κύκλο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης.

Στο πρώτο στάδιο της PCR το DNA στόχος μετουσιώνεται και μετατρέπεται από δίκλωνο σε μονόκλωνο. Στο δεύτερο στάδιο της PCR λαμβάνει χώρα ο υβριδισμός των δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία ονομάζονται εκκινιτές (primers), στις δύο πλευρές του DNA στόχου στους αντίστοιχους κλώνους. Στο τρίτο στάδιο της PCR γίνεται η σύνθεση του καινούργιου κλώνου, με την δράση του ενζύμου Taq πολυμεράση η οποία προσθέτει συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του κάθε εκκινητή. Έπειτα από την ολοκλήρωση και των τριών σταδίων έχουμε τον διπλασιασμό του DNA στόχου καθώς σχηματίζονται δύο νέες αλυσίδες-

κλώνοι-DNA συμπληρωματικές προς το αρχικό τμήμα. Επομένως στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης έχουμε 4 αλυσίδες DNA οι οποίες με την σειρά τους αποτελούν πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων. Μ' αυτόν τον τρόπο αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης αυξάνεται εκθετικά ο αριθμός των νεοσυντιθέμενων κλώνων του αρχικού DNA στόχου. Ο πολλαπλασιασμός του αρχικού DNA στόχου γίνεται με ρυθμό 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης.



Εικόνα 11. Θερμοκυκλοποιητής (μηχάνημα PCR)

Πηγή: www.beel-gist.org/apparatus_1.html

Όπως προαναφέρθηκε κάθε κύκλος PCR αποτελείται από τρία στάδια: 1)μετουσίωση, 2)υβριδισμό, 3)επιμήκυνση και το κάθε στάδιο περιλαμβάνει διαφορετική θερμοκρασία .

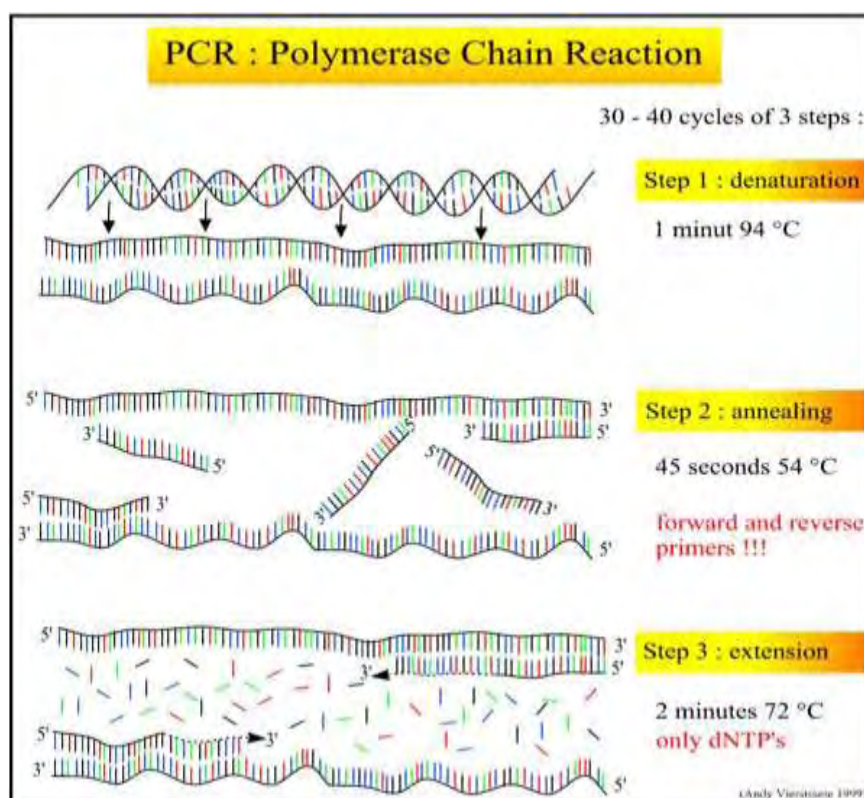
1^ο στάδιο: το DNA μετουσιώνεται σε θερμοκρασίες από 92 -95 °C για 30 sec. στο στάδιο αυτό οι υψηλές θερμοκρασίες προκαλούν την αποδιάταξη των νουκλεοτιδικών αλυσίδων και τον διαχωρισμό τους.

2^ο στάδιο: υβριδισμός των εκκινητών στις δύο πλευρές του DNA στόχου σε θερμοκρασία 50-65 °C για 1-2 min.

3^ο στάδιο: επιμήκυνση των εκκινητών με προσθήκη βάσεων στους νεοσυντιθέμενους κλώνους σε θερμοκρασία 70-78 °C για 1-2 min. [5,22,25, 26,28,29,30,31]

Η ειδικότητα της PCR εξαρτάται από:

- Την ειδική σύνδεση των εκκινητών στο DNA στόχο
- Την συγκέντρωση των ιόντων Mg^{++}
- Την συγκέντρωση του ενζύμου Taq πολυμεράση
- Την συγκέντρωση του DNA στόχου
- Την συγκέντρωση των εκκινητών
- Τον αριθμό των κύκλων



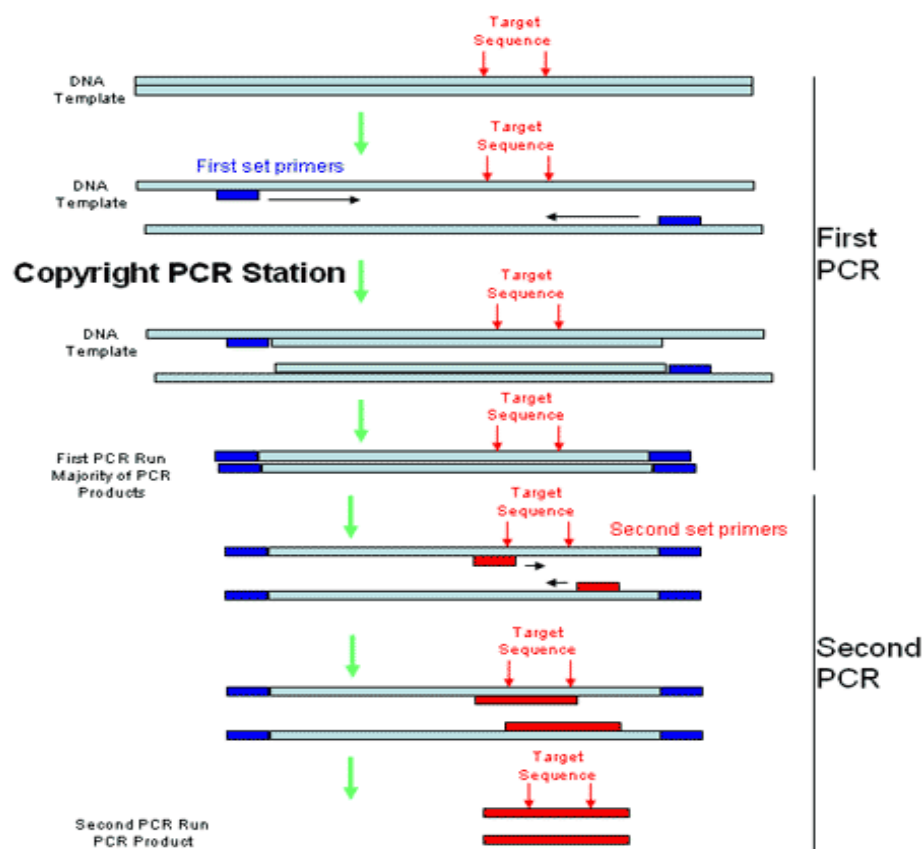
Εικόνα 12. Τα στάδια και οι θερμοκρασίες της PCR

Πηγή: http://www.le.ac.uk/ge/genie/vgec/images/PCR_000.jpg [38]

Η τεχνική της nested PCR (εσωτερική)

Η nested PCR ή εσωτερική PCR αποτελεί μια πιο «ευαίσθητη» τεχνική PCR, καθώς μπορούμε να αυξήσουμε περισσότερο την ευαισθησία του συστήματος με εφαρμογή της. Η τεχνική αυτή, εφαρμόζεται έπειτα από την εφαρμογή της 1^{ης} PCR. Στην συνέχεια χρησιμοποιούνται 1-2μl από το προϊόν της 1^{ης} PCR και ένα ζευγάρι εκκινητικών μορίων τα οποία είναι εσωτερικά (inner primers) των δύο αρχικών εκκινητικών μορίων (outer primers). Μ' αυτόν τον τρόπο ο αριθμός των αντιγράφων

που μπορούν να παραχθούν είναι $1,1 \times 10^{15}$. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να αυξήσει την ευαισθησία της αντίδρασης και να ελαχιστοποιήσει τα πιθανά μη ειδικά προϊόντα.[25,26,31,32, 91]



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου Nested PCR
Πηγή: <http://www.pcrstation.com/images/nested-pcr.gif> [39]

Η τεχνική της RT-PCR (αντίστροφης μεταγραφής)

Η τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Reverse Transcription PCR), είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του RNA.

Η μέθοδος αυτή αποτελείται από δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο συντίθεται το cDNA από το RNA, και στο δεύτερο πραγματοποιείται ο πολλαπλασιασμός του cDNA με εφαρμογή της PCR.

Για την παραγωγή του cDNA είναι απαραίτητα το mRNA ή RNA στόχος, το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (RT), dNTPs, εκκινητές και ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Οι εκκινητές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι τριών ειδών και επιλέγονται ανάλογα με τον στόχο που πρόκειται να επεκταθεί (mRNA ή RNA) και ανάλογα με

το μέγεθος του τμήματος που θέλουμε να μεταγράψουμε (ολόκληρο ή μέρος του mRNA ή RNA). Οι εκκινητές που επιλέγονται είναι:

α) oligo dT εκκινητές όταν ο στόχος είναι RNA, β) ειδικοί για μια συγκεκριμένη αλληλουχία εκκινητές όταν ο στόχος είναι mRNA ή RNA και ενδιαφερόμαστε για μια περιοχή από το σημείο του εκκινητή προς το 5' άκρο, και τέλος, γ) μείγμα τυχαίων εκκινητών όταν ο στόχος είναι mRNA ή RNA και ενδιαφερόμαστε να παράγουμε πληθυσμό cDNA τμημάτων τα οποία καλύπτουν τμήματα του RNA στόχου και όχι ολόκληρο το RNA. [17,25,26,91]

Πίνακας 11. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μοριακών τεχνικών PCR [18]

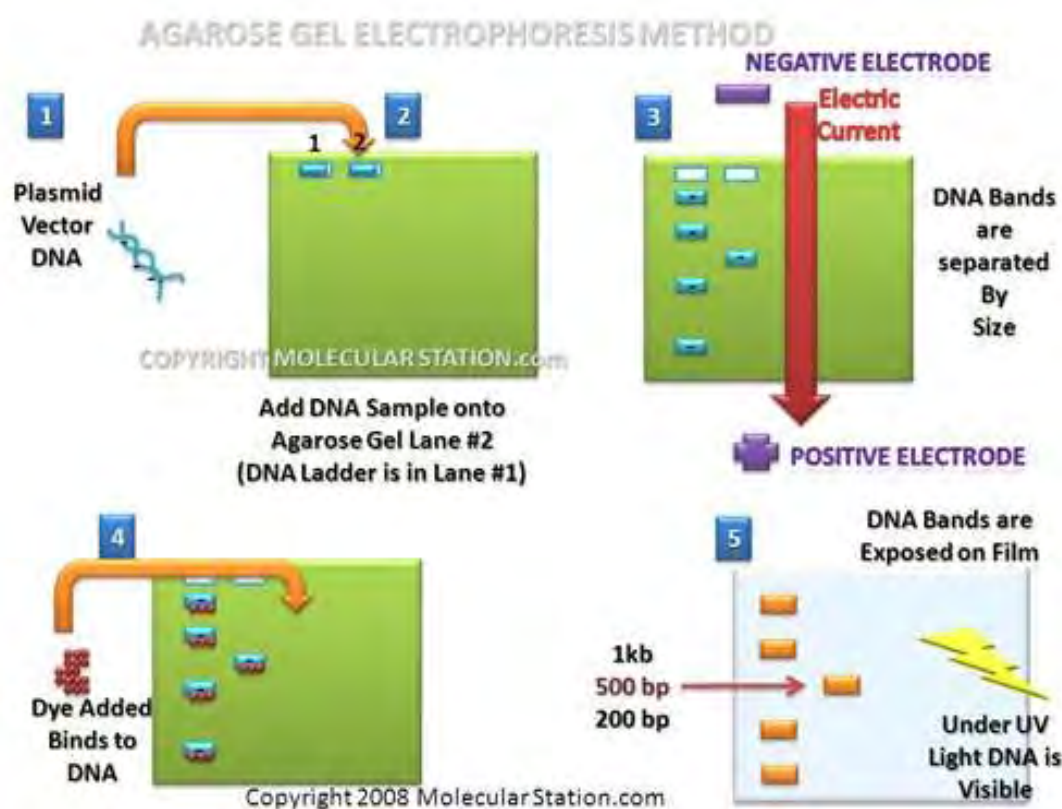
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ταχεία διάγνωση ▪ Υψηλή ευαισθησία ▪ Ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα δείγματος ▪ Ανίχνευση ακόμα και νεκρών ιών ▪ Ανίχνευση ιών που βρίσκονται σε λανθάνουσα μορφή ▪ Ανίχνευση ιών ενσωματωμένων στο DNA του κυττάρου 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Υψηλό κόστος ▪ Ειδικός εργαστηριακός εξοπλισμός ▪ Ανάγκη εξειδικευμένου προσωπικού ▪ Επιμολύνσεις (Ψευδώς θετικά αποτελέσματα) ▪ Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (μη ειδικοί primers ή πλημμελής απομόνωση γενετικού υλικού)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή είναι απλή, γρήγορη και όχι πολύ ακριβή. Χρησιμοποιείται ευρέως στην Μοριακή Βιολογία και στην Βιοχημεία και αποτελεί κοινή αφετηρία για πολλά πειράματα βιοτεχνολογίας.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA ή RNA. Με την βοήθεια της ηλεκτρικής ενέργειας, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των μορίων σε ένα πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης. Πιο συγκεκριμένα, το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες είναι μόρια ηλεκτρικά φορτισμένα, επομένως με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος στο πήκτωμα, τα μόρια κινούνται προς τον αντίθετο πόλο. Επειδή το

πήκτωμα είναι συμπαγές υλικό, καθώς τα μόρια κινούνται προς τον αντίθετο πόλο, τα κοντύτερα (μικρότερα σε μήκος) κινούνται γρηγορότερα ενώ τα μεγαλύτερα πιο αργά. Έτσι τα μικρότερα φθάνουν πιο κοντά στο τέλος του πήκτωματος ενώ τα μεγαλύτερα παραμένουν πιο κοντά στην αρχή. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης στο πήκτωμα παρατηρούνται τα τμήματα του υπό διαχωρισμού μορίου, διασκορπισμένα από την μια άκρη ως την άλλη. Τα μόρια μπορούν να εμφανιστούν με τη μορφή ζωνών και να διακριθούν με γυμνό μάτι, εάν έχουν χρωματιστεί πριν την έναρξη της ηλεκτροφόρησης. Επιπλέον η θέση του DNA στο πήκτωμα μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα εάν προστεθεί μια μικρή συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, η οποία αποτελεί φθορίζουσα χρωστική και δεσμεύεται στο DNA (παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA). Έτσι είναι δυνατό να δούμε τη θέση του DNA στο πήκτωμα, με υπεριώδες φως. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατόν να ανιχνευθούν ποσότητες DNA μέχρι και 1ng.



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση μεθόδου ηλεκτροφόρησης. Πηγή: <http://www.molecularstation.com>

Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ρεύματος.

1.Μέγεθος του DNA: Τα γραμμικά δίκλινα μόρια DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου (log) του μοριακού του βάρους.

2. Στερεοδιάταξη του DNA: Η υπερελικωμένη (κλειστή κυκλική μορφή), η ανοικτή κυκλική μορφή και το γραμμικό DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης.

3.Ένταση του ρεύματος: Σε χαμηλή τάση η κινητικότητα των γραμμικών τμημάτων του DNA είναι ανάλογη με τα volts που χρησιμοποιούνται. Αύξηση όμως της έντασης του ηλεκτρικού ρεύματος έχει ως αποτέλεσμα η κινητικότητα των τμημάτων DNA μεγάλου μοριακού βάρους, να αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή για κάθε κομμάτι DNA. έτσι με αύξηση της έντασης του ρεύματος και επομένως των volts μειώνεται η διαχωριστική ικανότητα και η αξιοπιστία των πηκτωμάτων.

4. Συγκέντρωση της αγαρόζης: Διαφορετικές συγκεντρώσεις αγαρόζης στα πηκτώματα επηρεάζουν διαφορετικά την κινητικότητα ενός τμήματος DNA. Έτσι, μπορεί να γίνει διαχωρισμός ενός μεγάλου εύρους μεγεθών DNA χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων αγαρόζης. Πηκτώματα με χαμηλά ποσοστά αγαρόζης είναι καλύτερα για το χωρισμό των μεγάλων μορίων DNA, πηκτώματα με υψηλότερα ποσοστά είναι καλύτερα για μικρότερα DNAs.

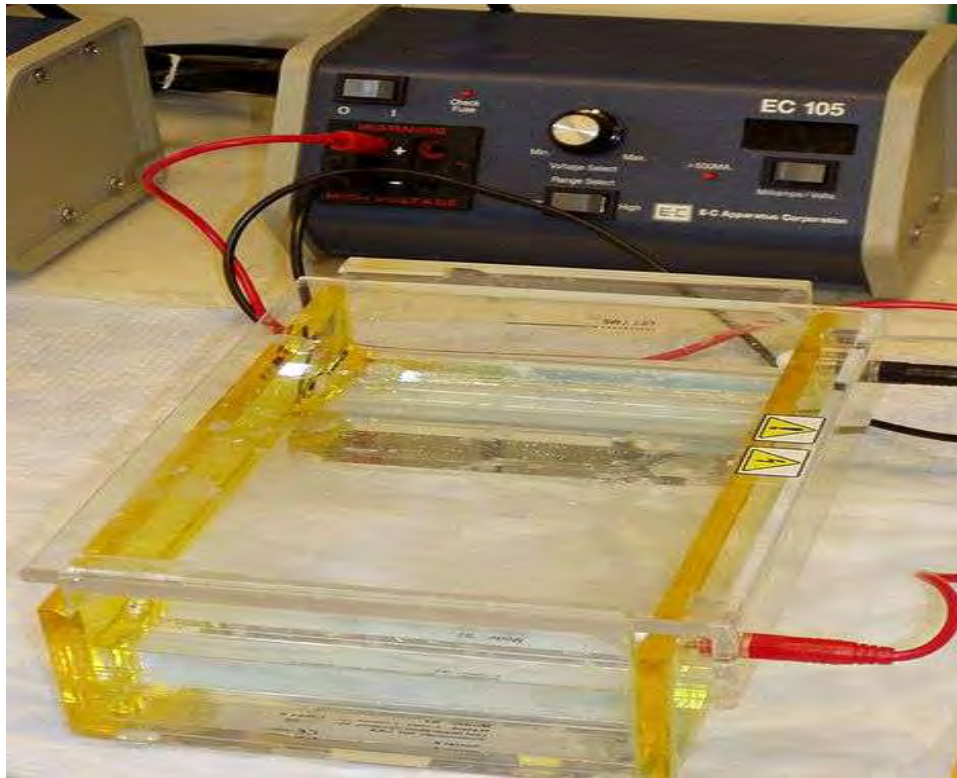
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα ποσοστά των πηκτωμάτων σε αγαρόζη και η αποδοτική σειρά του διαχωρισμού.

Πίνακας 12. Ποσοστά πηκτωμάτων σε αγαρόζη και αποδοτική σειρά διαχωρισμού.
[27]

PERCENTAGE OF AGAROSE IN GEL	EFFICIENT RANGE OF SEPARATION
0.3 %	5 kb – 60 kb
0.6 %	1 kb – 20 kb
0.7 %	800 bp – 10 kb
0.9 %	500 bp – 7 kb
1.2 %	400 bp – 6 kb
1.5 %	200 bp – 3 kb
2.0%	100 bp – 1.2 kb

Συσκευές και διαλύματα της μεθόδου

Για την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι συσκευών, σήμερα όμως χρησιμοποιούνται κυρίως οριζόντια πηκτώματα και όχι κάθετα. Η χρήση οριζοντίων πηκτωμάτων παρουσιάζουν τα εξής πλεονεκτήματα έναντι των κάθετων: α) απαιτούν χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης, β) η κατασκευή τους και η χρήση τους είναι εύκολη και γρήγορη, γ) είναι εύκολο να κατασκευαστεί πηκτωμα σε οποιαδήποτε διαστάσεις θέλουμε, δ) η συσκευή είναι φθηνή και δεν φθείρεται εύκολα. Τα ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση είναι ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν Tris-οξικό, ή Tris-βορικό (TBE), ή Tris-φωσφορικό οξύ σε 50-100 mM συγκέντρωση και pH 8. Βέβαια το ρυθμιστικό διάλυμα που προτιμάται πιο πολύ είναι το Tris-βορικό (TBE), ή Tris-φωσφορικό οξύ γιατί έχουν καλύτερη ρυθμιστική ικανότητα.[27,29,33]



Εικόνα 15. Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Πηγή: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gel_electrophoresis_apparatus.JPG

Νοσοκομεία και Δημόσια υγεία

Κάθε χώρα έχει μια διαφορετική υγειονομική πολιτική, ανάλογα με τις συνθήκες, τις παραδόσεις της και το επίπεδο διαβίωσης του πληθυσμού της, αλλά όλες οι χώρες μοιράζονται κάποιους κοινούς στόχους και αξίες. Μέσα σε αυτές τις αξίες περιλαμβάνονται το δικαίωμα όλων σε υψηλού επιπέδου δημόσια υγεία και υγειονομική περίθαλψη.

Ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελεί στόχο μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια, τα παράσιτα, οι μύκητες και οι ιοί. Η μόλυνση του ανθρώπινου πληθυσμού αποτελεί μέριμνα για την δημόσια υγεία. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν θεσπιστεί νομοθεσίες με τις οποίες λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα ελέγχου και πρόληψης. Τα μέτρα αυτά καθορίζουν τον τρόπο διαχείρισης, επεξεργασίας και διανομής του νερού που προορίζεται για πόση και κατανάλωση, την παραγωγή, επεξεργασία και διανομή των τροφίμων, τη χρησιμοποίηση φίλτρων για καθαρισμό των ατμοσφαιρικών παραγόντων. Σημαντικό εργαλείο ελέγχου και πρόληψης αποτελούν και οι εργαστηριακοί έλεγχοι.[73]

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γαστρεντερίτιδα και παιδιά

Η γαστρεντερίτιδα αποτελεί μια φλεγμονή του στομάχου και των εντέρων. Προκαλεί μια ποικιλία συμπτωμάτων όπως διάρροια, ναυτία, πυρετός και άλλα συμπτώματα του πεπτικού.

Βέβαια σήμερα στον βιομηχανοποιημένο κόσμο, τα κρούσματα παιδικής γαστρεντερίτιδας οφείλονται σε ιούς, βακτήρια και εντερικά παράσιτα.

- **Γαστρεντερίτιδα από ιούς:** οι ιοί οι οποίοι προκαλούν γαστρεντερίτιδα στα παιδιά είναι οι αδενοϊοί, οι εντεροϊοί, οι ρότα-ιοί, οι νοροϊοί και οι αστροϊοί. Βέβαια, ιδιαίτερα επιρρεπή είναι τα παιδιά κάτω των 5 ετών. Η μετάδοση τους γίνεται έπειτα από επαφή με μολυσμένα άτομα ή με μολυσμένα κόπρανα ενός ατόμου ή από της επιφάνειες που έχουν επίσης μολυνθεί με μολυσμένα κόπρανα. Μεταξύ των παιδιών είναι μεταδίδονται πολύ πιο εύκολα, διότι τα παιδιά δεν γνωρίζουν από σωστή υγιεινή (καθώς έρχονται συχνότερα σε επαφή με μολυσμένες επιφάνειες όπως βρώμικες πάνες, νύχια, τουαλέτες, βρώμικα παιχνίδια κτλ). Γι' αυτό απαιτείται ιδιαίτερη και καλή υγιεινή από τους ίδιους τους γονείς των παιδιών ή από τα άτομα που φροντίζουν τα παιδιά ώστε να αποφευχθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η περαιτέρω μετάδοση του ιού. Ακόμη πρέπει να σημειωθεί ότι, μερικοί από αυτούς τους ιούς, μπορούν να επιμολύνουν το πόσιμο νερό ή το φαγητό, ιδιαίτερα στις μη ανεπτυγμένες χώρες και στις αγροτικές περιοχές όπου οι αποχετεύσεις είναι ανεπαρκείς και μεταδοθούν μέσω αυτών.
- **Γαστρεντερίτιδα από τα βακτήρια:** Πολλές φορές στα τρόφιμα μπορούν να αναπτυχθούν βακτήρια, ενώ μερικές φορές τα βακτήρια αυτά παράγουν ενοχλητικές χημικές ουσίες που ονομάζονται τοξίνες. Εάν ένα παιδί τραφεί με αυτά τότε θα αρχίσουν τα συμπτώματα της γαστρεντερίτιδας. Τα συμπτώματα μπορούν να προκληθούν είτε από τα ίδια τα βακτήρια ή από τα υποπροϊόντα τους, που βρίσκονται στην επιφάνεια του φαγητού. Ακόμη, ορισμένοι τύποι επιθετικών βακτηρίων, όπως *Campylobacter*, *Salmonella* ή το *E.coli* 0157, μπορούν να προκαλέσουν τις σοβαρότερες μορφές τροφικής

δηλητηρίασης που συνοδεύεται με υψηλό πυρετό, σοβαρά γαστρεντερικά συμπτώματα και αφυδάτωση. Μπορούν να προκαλέσουν τα συμπτώματα αυτά ακόμη και σε παιδιά που είναι υγιή.

- **Γαστρεντερίτιδα από εντερικά παράσιτα** Η G. Lamblia, το παράσιτο που προκαλεί Giardiasis, είναι η πιο κοινή αιτία διάρροιας στα παιδιά και ιδιαίτερα στα νήπια. Η διάδοση των εντερικών παράσιτων μπορεί να γίνει μέσω μολυσμένων χεριών και επιφανειών, μέσω μολυσμένου νερού και τροφίμων. Σε παγκόσμιο επίπεδο η γαστρεντερίτιδα σκοτώνει από 3-5 εκατομμύρια παιδιά το χρόνο, και ιδιαίτερα στις μη ανεπτυγμένες χώρες όπου η υγιεινή και η υγειονομική περίθαλψη δεν είναι ανεπτυγμένη. Η αιτία θανάτου των παιδιών είναι η αφυδάτωση, η οποία προκαλείται από το συνδυασμό αυστηρής διάρροιας, εμετού και μη αναπλήρωσης του χαμένου ύδατος του σώματος. [70,71,72]

ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την περάτωση του πειράματος, καθώς και οι εταιρείες που τα προμήθευσαν περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας13. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

Υλικά	Εταιρία
Phosphate Buffered Saline (tablet form)	Fluka
Qiamp viral RNA mini kit	Qiagen
Metabion mi-PCR purification kit	Metabion
Pure ethanol	Riedel-de Haen
Primers	ΙΤΕ εργαστήριο μικροχημείας
Paq polymerase	Stratagene
Deoxynucleoide Triphosphates - dNTPs	Biolabs
Paq buffer	Stratagene
Ethidium Bromide	Applichem
Agarose	Applichem
Tris	Applichem
Ladder	New England Biolabs
Boric Acid	Applichem
EDTA - Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	Applichem
Qiagen One Step RT-PCR Kit	Qiagen

Υλικά και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα διαφορετικά στάδια της πειραματικής διαδικασίας:

- **Αραιώση**

Κατά την διαδικασία της αραιώσης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PBS.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

Αναλώσιμα	Μηχανήματα	Υλικά
Tips των 1000μl	Πιπέτα των 1000μl	Διάλυμα PBS 20X
Falcon των 15ml	Vortex	
Πλαστικούς κρίκους	Ηλεκτρονικός ζυγός	
Φύλλα αλουμινόχαρτου		

- **Απομόνωση γενετικού υλικού**

Κατά την διαδικασία της απομόνωσης του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

Αναλώσιμα	Μηχανήματα	Υλικά
Tips	Υδατόλουτρο	Καθαρή αιθανόλη
Πιπέτες	Vortex	Buffer AVL - Carrier RNA
Eppendorff tubes 1,5ml	Μικρό-φυγόκεντρος	Buffer AW1
Spin columns		Buffer AW2
Collection tubes		Buffer AVE

- **PCR**

Κατά την διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

Αναλώσιμα	Μηχανήματα	Υλικά
Tips	Μηχάνημα PCR	PCR buffer
Πιπέτες	Απαγωγός με UV	MgCl ₂
Eppendorff tubes 1,5ml και 0,5ml		dNTPs
		DTT

		Taq ή Paq πολυμεράση
		Primers
		H ₂ O

- **RT-PCR**

Κατά την διαδικασία της RT- PCR χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

Αναλώσιμα	Μηχανήματα	Υλικά
Tips	Μηχάνημα PCR	5x Qiagen One Step RT-PCR buffer
Πιπέτες	Απαγωγός με UV	Qiagen One Step RT-PCR Enzyme Mix
Eppendorff tubes 1,5ml και 0,5ml		dNTPs
		DTT
		RNase inhibitor
		Primers
		H ₂ O

- **Ηλεκτροφόρηση**

Κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

Αναλώσιμα	Μηχανήματα	Υλικά
Tips	Συσκευή ηλεκτροφόρησης	3g αγαρόζη
Πιπέτες	Φούρνος μικροκυμάτων	150ml TBE
Eppendorff tubes 1,5ml και 0,5ml		7λ βρωμιούχο αιθίδιο
Παραφίλμ		Loading buffer βρωμοφαινόλης
Δοχείο ζέσεως		Ladder

- ❖ Ακόμη, καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν απαραίτητη η χρήση εργαστηριακής ποδιάς και γαντιών καθώς και αποστειρωτικού διαλύματος (sterilium) για λόγους ασφάλειας.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

1. Το PBS σε διάλυμα παρασκευάζεται με την προσθήκη μιας ταμπλέτας σε 200ml dH₂O. Ύστερα το διάλυμα αναδεύεται καλά ώστε να διαλυθεί πλήρως η ταμπλέτα και αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 121°C, πίεση 1,5atm για 15 min (αυτόκαυστο).
2. Για την παρασκευή διαλύματος TBE 5x ακολουθείται η εξής διαδικασία: για ένα λίτρο διαλύματος TBE 5x χρησιμοποιούνται 54g Tris base, 27,5g boric acid και 20ml EDTA 0,5M pH8 τα οποία διαλύονται σε 1000ml νερού dH₂O. Το διάλυμα TBE 5x στην συνέχεια αραιώνεται σε TBE 0,5x. Διήθηση του διαλύματος προς αποφυγή συσσωματωμάτων.
3. Για την παρασκευή πηκτώματος αгарόζης 150ml ακολουθείται η εξής διαδικασία: προστίθενται σε 150ml TBE 0,5x, 3g αгарόζης σε σκόνη. Το διάλυμα εκτίθεται σε μικροκύματα μέχρι να διαλυθεί πλήρως η σκόνη στο διάλυτη. Έπειτα προστίθενται 5λ βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να παγώσει στο ειδικό σκαφίδιο. [37]
4. Για την παρασκευή loading buffer διαλύεται σε 100ml dH₂O στερεή βρωμοφαινόλη 0,25%. Έπειτα προστίθεται 40% w/v sucrose (σουκρόζη). Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση του διαλύματος.
5. Για την παρασκευή marker (ladder), προστίθενται σε 400λ dH₂O 50λ marker και 50λ μπλε της βρωμοφαινόλης.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΑ ΥΛΙΚΑ

1. Μείγμα dNTPs

Το μείγμα των dNTPs που χρησιμοποιήθηκε κατά την διαδικασία της PCR περιέχει ίσες συγκεντρώσεις των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων dATP, dTTP, dCTP, dGTP. Η συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιούνται συνήθως κυμαίνεται από 20 έως 200μM. Πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις δίνουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, ενώ αντίθετα πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 200μM έχουν ως αποτέλεσμα την ελάττωση της ειδικότητας και της αξιοπιστίας της αντίδρασης.

Ωστόσο, η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs σε κάθε πείραμα καθορίζεται εμπειρικά και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι οποίοι είναι η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου, η συγκέντρωση των εκκινητών, το μήκος των αντιγράφων του DNA καθώς και ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης PCR. [17,28]

2. Ιόντα Mg²⁺

Η προσθήκη ιόντων μαγνησίου γίνεται με τη μορφή MgCl₂. Σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, διευκολύνοντας την ενσωμάτωσή τους στην αλυσίδα του DNA. Ακόμη είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης, καθώς σταθεροποιούν την πρόσδεση της Taq πολυμεράσης με τους εκκινητές. Επίσης αυξάνουν την T_m του δίκλωνου μορίου του DNA και επηρεάζουν την αναδιάταξη των εκκινητών.

Η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 0,5-50μM αλλά συνήθως μεταξύ 1-1,5μM. Χαμηλότερη συγκέντρωση της ιδανικής οδηγεί σε χαμηλή απόδοση της αντίδρασης, ενώ υψηλότερη συγκέντρωση διευκολύνει την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Επίσης, απαιτείται βελτιστοποίηση της αντίδρασης για να βρεθεί η ιδανικότερη συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου για μια συγκεκριμένη αντίδραση. [17,28]

3. Rnase inhibitor

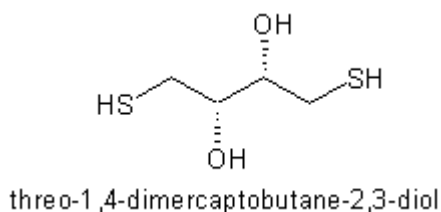
Ο αναστολέας RNάσης είναι ένα ανασυνδυασμένο ένζυμο μεγέθους 50 kd που βρίσκεται σε διάλυμα Buffer: 20mM HEPES-KOH, pH7.6; 50mM KCl; 8mM DTT; and 50% (v/v) glycerol. Έχει ενεργότητα 20 Units/μL και αποθηκεύεται στους -20o C.

4. Dithiothreitol (DTT)

Το Dithiothreitol (DTT) αποτελεί ένα μικρό οξειδοαναγωγικό μόριο γνωστό και ως αντιδραστήριο Cleland. Το όνομα του προκύπτει από τη θρεόζη, ένα σάκχαρο με 4 άνθρακες και απαντάται με τα εξής συνώνυμα:

- threo-1,4-dimercaptobutane-2,3-diol
- DL-threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol
- 1,4-dithio-DL-threitol
- ±-threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol

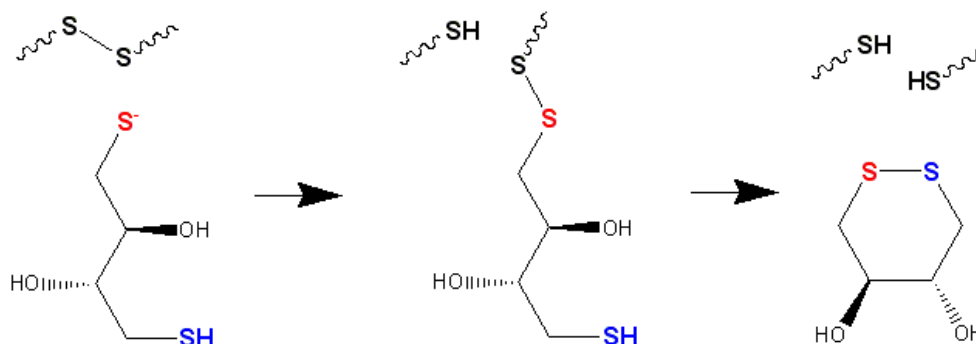
Ο τύπος του DTT είναι $C_4H_{10}O_2S_2$ και ο συντακτικός του τύπος φαίνεται στο σχήμα. Στην οξειδωμένη του μορφή απαντάται ως ένας δακτύλιος με 6 άνθρακες που περιέχει δισουλφιδικό δεσμό (βλέπε σχήμα). [23]



Σχήμα 1. Συντακτικός τύπος του DTT.

Πηγή: www.wikipedia.com

Ο ισχυρός αναγωγικός χαρακτήρας του DTT οφείλεται στον δακτύλιο και στον δισουλφιδικό του δεσμό. Η δράση του DTT ως ισχυρό αναγωγικό περιλαμβάνει την αναγωγή ενός τυπικού δισουλφιδικού δεσμού μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων (σχήμα). Το ενδιάμεσο προϊόν που προκύπτει είναι ασταθές λόγω της δευτέρης θειόλης του DTT η οποία έχει μεγάλη τάση να κυκλοποιεί το μόριο.



Σχήμα 2. Αναγωγή δισουλφιδικού δεσμού από το DTT.

Πηγή: www.wikipedia.com

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζεται η οξειδωμένη μορφή του δακτυλίου και ένας ανηγμένος δισουλφιδικός δεσμός. Ακόμη η αναγωγική δράση του DTT περιορίζεται σε pH πάνω από 7, καθώς μόνο η αρνητικά φορτισμένη μορφή του θείου ($-S^-$) είναι ενεργή, ενώ η πρωτονιωμένη μορφή ($-SH$) δεν είναι.

Ιδιότητες

Οι ιδιότητες του DTT συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 14. ιδιότητες DTT.

Μοριακό βάρος	154.3
Σημείο τήξης	42 °C
Σημείο βρασμού	124 °C
Οξειδωαναγωγική τάση	-0.33 V σε pH 7

Η οξείδωση από παρουσία του οξυγόνου του αέρα, καθιστά το DTT σχετικά ασταθή. Έτσι, η διάρκεια ζωής του (χρησιμότητα του) μπορεί να επεκταθεί με ψύξη.[23]

Εφαρμογές στην PCR

Η χρήση του DTT στην διαδικασία της PCR είναι ως αναγωγικό (ή αποπροστατευτικό) αντιδραστήριο του μεθυλιωμένου thiolated DNA.

Πιο συγκεκριμένα, τα τελικά άτομα θείου στο thiolated DNA έχουν την τάση να σχηματίζουν διμερή όταν είναι σε διάλυμα. Το φαινόμενο αυτό ενισχύεται παρουσία οξυγόνου. Ο σχηματισμός των διμερών αυτών μορφών έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των αντιδράσεων ζευγαρώματος των βάσεων. Έτσι, το DTT προστίθεται στο διάλυμα της PCR και επιτρέπει το ζευγάρωμα. Σε άλλες αντιδράσεις, το DTT αφαιρείται από το διάλυμα με μια διαδικασία που ονομάζεται αφαλάτωση.

5. TBE Buffer

Το TBE ή Tris/Borate/EDTA, είναι ένα διάλυμα που αποτελείται από Tris, βορικό οξύ, EDTA, και νερό

Το TBE χρησιμοποιείται στην μοριακή βιολογία σε διαδικασίες στις οποίες περιλαμβάνεται DNA. Η πιο συνηθισμένη διαδικασία είναι η ηλεκτροφόρηση.

- Το Tris είναι ένα buffer για ελαφρώς βασικά διαλύματα, το οποίο διατηρεί το DNA αποπρωτονιωμένο και διαλυτό στο νερό.
- Το EDTA δεσμεύεται σε δισθενή κατιόντα, κυρίως στο μαγνήσιο (Mg²⁺). Αυτά τα ιόντα είναι απαραίτητοι συμπαράγοντες για αρκετά ένζυμα. Το μαγνήσιο είναι συμπαράγοντας για ένζυμα που τροποποιούν DNA. [34]

6. Primers (εκκινητές)

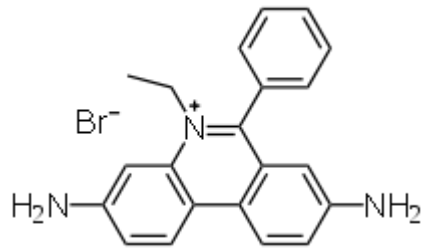
Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία για τους αδενοϊούς και για τους εντεροϊούς κατά την διάρκεια της RT και Nested PCR, καθώς και οι ιδιότητες τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 15. Εκκινητές αδενοϊών και εντεροϊών. [24]

Primer	Αλληλουχία	Στόχος	Μέγεθος	Tm at salt 1000.0mM	PCR product	Target gene
NENT1	TCCGGCCCCTGAATGCGGCTA	449-469	21	80.3 °C	123	5'NTR
NENT2	GAAACACGGACACCCAAAGTA	568-548	21	72.5 °C	123	5'NTR
HEXA	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC	18858-18882	25	80.5 °C	308	Hexon gene
HEXB	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT	19158-19136	23	80.4 °C	308	Hexon gene
NHEXA	GCCACCGAGACGTA CTT CAGCCTG	18937-18960	24	82.1 °C	143	Hexon gene
NHEXB	TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC	19079-19051	29	84.8 °C	143	Hexon gene

8. Ethidium bromide (βρωμιούχο αιθίδιο)

Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα αρωματική ένωση με χημικό τύπο C₂₁H₂₀BrN₃. Αποτελεί ένα πολύ δεσμευτικό μόριο και γι' αυτό στη μοριακή βιολογία χρησιμοποιείται ως χρωστική νουκλεϊκών οξέων και πιο συχνά στην τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης. Όταν εκτίθεται σε υπεριώδες φως, φθορίζει παίρνοντας ένα κόκκινο- πορτοκαλί χρώμα, εντείνοντας περίπου 20 φορές μετά την πρόσδεσή του με το DNA. Ακόμη, είναι ισχυρός μεταλλαξιγόνος παράγοντας, και πιθανώς είναι καρκινογόνο ή τερατογόνο καθιστώντας το εξαιρετικά επικίνδυνο για την υγεία. [28,35]



Σχήμα 3. Συντακτικός τύπος βρωμιούχου αιθιδίου

Πηγή: www.wikipedia.com

Ιδιότητες

Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει μοριακό βάρος 394.3139g/mol και σημείο τήξης 260 - 262° C.

9. Phosphate Buffered Saline (PBS)

Το Phosphate buffered saline (PBS) είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει ιόντα αλάτων, όπως χλωριούχο νάτριο, χλωριούχο κάλιο, φωσφορικό νάτριο και φωσφορικό κάλιο και χρησιμοποιείται στην βιολογική ερευνά, κυρίως για την διατήρηση της οσμωμοριακότητας των κυττάρων. Σε περίπτωση υψηλής συγκέντρωσης ιόντων αλάτων στο εσωτερικό του κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα την διαρροή του ύδατος στο εξωτερικό του κυττάρου και το κύτταρο συρρικνώνεται. Αντίθετα, σε περίπτωση χαμηλής συγκέντρωσης ιόντων αλάτων στο εσωτερικό του κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα την εισροή του ύδατος στο εσωτερικό του κυττάρου και το κύτταρο διογκώνεται. Άρα το PBS είναι ένα ισοτονικό και μη τοξικό διάλυμα και έχει πολλές χρήσεις.[28,36]

ΜΕΘΟΔΟΙ

Συνοπτικά, η μεθοδολογία ταυτοποίησης των ιών μπορεί να διαχωριστεί στα εξής στάδια-φάσεις:

- i. Δειγματοληψία
- ii. Αραίωση (Διάλυση σε PBS)
- iii. RNA/DNA extraction
- iv. PCR
- v. RT-PCR (για τους RNA ιούς)
- vi. Ηλεκτροφόρηση

i) Δειγματοληψία

Πηγή δειγματοληψίας ήταν η παιδιατρική κλινική του γενικού νοσοκομείου Δράμας. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία που χρησιμοποιούνται ως ουροσυλλέκτες (urc – box) των 100 ml. Μετά τη δειγματοληψία, τα δείγματα κοπράνων μεταφερόταν σε φορητό ψυγείο συντήρησης προς το εργαστήριο.

Εάν επρόκειτο να εξεταστούν την ίδια μέρα, διατηρούνταν στους 4° C. Εάν η αραίωση καθυστερούσε περισσότερο από 24 h το δείγμα ψύχονταν στους -20° C.

ii) Πρωτόκολλο αραίωσης

1. Ζύγισμα ποσότητας δείγματος με την χρήση ηλεκτρονικού ζυγού ακριβείας από 0,10g έως 1g.
2. Μεταφορά της ζυγισμένης ποσότητας του δείγματος σε Falcon των 15ml.
3. Υπολογισμός και μεταφορά ποσότητας διαλύματος PBS στο δείγμα.
4. Καλή ανάδευση με τη χρήση Vortex.
5. Αποθήκευση στους -20°.

iii) Πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού *Qiagen Kit*

❖ προπαρασκευή AVL-carrier RNA:

Αρχικά γίνεται επώαση του AVL στους 80° C ώστε να διαλυθεί το ίζημα για 1-5 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται διαλυτοποίηση του carrier RNA το οποίο βρίσκεται σε λυοφυλιωμένη μορφή, σε 1 ml AVL buffer. Έπειτα το διαλυτοποιημένο carrier RNA αναδεύεται με ολόκληρη την ποσότητα του

AVL. Το διάλυμα έπειτα από κάθε χρήση αποθηκεύεται στους 2-8° C για 6 μήνες ή σε θερμοκρασία δωματίου για 2 εβδομάδες.

Διαδικασία απομόνωσης- Qiagen Kit

1. Αρχικά τοποθετείται σε κάθε eppendorf tube των 1,5ml, 560 μl από το buffer AVL-carrier RNA
2. Προστίθεται σε κάθε eppendorf tube 140 μl δείγματος
3. Γίνεται ανάδευση με την χρήση Vortex για 15 sec
4. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15-20 °C)
5. Στη συνέχεια ακολουθεί μια σύντομη φυγοκέντρηση
6. Έπειτα προστίθεται σε κάθε eppendorf tube 560 μl καθαρή αιθανόλη
7. Ανάδευση με Vortex
8. Ακολουθεί μια ακόμη σύντομη φυγοκέντρηση
9. Σε κάθε στήλη προστίθενται 630μl δείγματος.
10. Φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στα 6000g (8000rpm)
11. Διατήρηση της στήλης και εφαρμογή σε καθαρό tube.
12. Επανάληψη των βημάτων 9-10-11
13. Στην συνέχεια προστίθενται στη στήλη 500μl buffer AW1
14. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στα 6000g (8000rpm)
15. Εφαρμογή της στήλης σε καθαρό tube
16. Προσθήκη στη στήλη 500μl buffer AW2
17. Φυγοκέντρηση για τρία λεπτά στα 14000rpm
18. Εφαρμογή της στήλης σε καθαρό tube
19. Φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στα 14000rpm
20. Εφαρμογή της στήλης σε καθαρό tube
21. Προσθήκη στη στήλη 60μl buffer AVE
22. Επώαση για ένα λεπτό
23. Φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στα 6000g (8000rpm).
24. Διατήρηση του περιεχόμενου του tube και μεταφορά σε καθαρό tube
25. Αποθήκευση στους -20° C

iv) PCR / RT-PCR (για τους RNA ιούς)

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων ακολουθεί η ενίσχυση του δείγματος με την τεχνική της PCR. Αρχικά εφαρμόζουμε την αντίστροφη μεταγραφή για τους RNA ιούς και στην συνέχεια την εσωτερική PCR για μεγαλύτερη ενίσχυση.

Στην εσωτερική (nested) PCR, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Paq πολυμεράση. Η Paq πολυμεράση είναι μία εναλλακτική εκδοχή της Taq πολυμεράσης. Παρέχει ποιοτικότερα αποτελέσματα PCR και είναι βελτιωμένη για τις γρήγορες εναλλαγές των κύκλων της PCR, για οικονομία χρόνου και αύξηση του προϊόντος.

❖ *Πρωτόκολλο RT – PCR Εντεροϊοί.*

Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ένα θετικό και ένα αρνητικό δείγμα. Το θετικό ήταν echovirus σε συγκέντρωση 10^{-1} ενώ το αρνητικό ήταν αποστειρωμένο dH₂O.

Για την ενίσχυση του γονιδιώματος των εντεροϊών χρησιμοποιήθηκε το RT-PCR Kit της Qiagen.

Στα 5λ δείγματος RNA προστέθηκαν 10λ 5x Qiagen one step RT-PCR buffer, 2λ Qiagen one step RT-PCR Enzyme mix, 3λ Primer NENT1, 3λ primer NENT2, 2λ dNTPs, 0,5λ RNase inhibitor και 24,5λ αποστειρωμένο dH₂O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50λ.

Το πρόγραμμα της συσκευής PCR είναι το εξής:

1^ο στάδιο: 42° C για 30 λεπτά
95° C για 15 λεπτά

2^ο στάδιο: 95° C για 2 λεπτά
55° C για 0,5 λεπτά
72° C για 1 λεπτό

Επανάληψη το 2^ο στάδιο 28 φορές (28 κύκλοι)

3^ο στάδιο: 72° C για 5 λεπτά

❖ *Πρωτόκολλο PCR – Αδενοϊοί*

Για κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ένα θετικό και ένα αρνητικό δείγμα. Το θετικό ήταν adenovirus στελέχους 41, συγκέντρωσης 10^{-2} ενώ το αρνητικό ήταν αποστειρωμένο dH₂O.

➤ 1^η PCR

Στα 10λ δείγματος προστέθηκαν 5λ PCR buffer της Paq, 0.5λ Paq πολυμεράση, 1λ Primer HexA, 1λ primer HexB, 0.5λ dNTPs και 32λ αποστειρωμένο dH₂O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50λ.

Το πρόγραμμα της συσκευής PCR είναι το εξής:

- 95° C για 2 λεπτά
- 95° C για 15 δευτερόλεπτα
- 55° C για 5 δευτερόλεπτα
- 72° C για 1 λεπτό
- Επανάληψη 28 κύκλων
- 72° C για 5 λεπτά

➤ nested PCR

Για την nested PCR που ακολουθεί, σε 1λ προϊόντος της πρώτης αντίδρασης PCR, προστέθηκαν 5λ PCR buffer, 0,5λ Taq πολυμεράση, 0,5λ dNTPs, 1λ Primer neHexA, 1λ Primer neHexB και 41λ αποστειρωμένο dH₂O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι επίσης 50λ.

Το πρόγραμμα της συσκευής PCR είναι το εξής:

- 95° C για 2 λεπτά
- 95° C για 15 δευτερόλεπτα
- 55° C για 5 δευτερόλεπτα
- 72° C για 1 λεπτό
- Επανάληψη 28 κύκλων
- 72° C για 5 λεπτά

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται απευθείας ή αποθηκεύονται στους -20 °C.

v) **Ηλεκτροφόρηση**

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Παρασκευάζεται 150 ml gel αγαρόζης 2% και προστίθενται σε αυτό 5λ βρωμιούχου αιθιδίου.
2. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται στο ειδικό σκαφίδιο μέχρι να στερεοποιηθεί.
3. Έπειτα προστίθεται 1λ ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (βρωμοφαινόλης) σε 14λ δείγματος (προϊόν PCR) με τη χρήση παραφίλμ.
4. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα στο gel με την εξής σειρά: ladder (marker), αρνητικό, δείγματα, θετικό. Μεταξύ όλων μεσολαβεί ένα κενό κελί.
5. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 100 V για 1-1,5ώρα περίπου.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το gel αγαρόζης εκτίθεται σε UV ακτινοβολία.

Το βρωμιούχο αιθίδιο συνδέεται με τις αλυσίδες του DNA, και γι' αυτό κάθε θετικό δείγμα εμφανίζει μία λευκή ζώνωση, ενώ το αρνητικό δείγμα δεν θα πρέπει να φέρει ζώνωση όταν εκτίθεται στο UV.

Με τον τρόπο αυτό διαπιστώνεται εάν ένα δείγμα φέρει ικό γενετικό υλικό ή όχι.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη σε κρούσματα γαστρεντερίτιδας που προσήλθαν στην παιδιατρική κλινική του Νοσοκομείου της Δράμας από τον Νοέμβριο του 2008 έως το Μάρτιο του 2010. Στο χρονικό αυτό διάστημα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν συνολικά 41 δείγματα, από παιδιά ηλικίας 1 έως 15 ετών. Κάθε δείγμα συνοδεύτηκε από ένα ερωτηματολόγιο, όπου είχε πληροφορίες για το φύλο, την ηλικία, την διεύθυνση κατοικίας, την έναρξη συμπτωμάτων, τα αποτελέσματα μικροβιολογικών εξετάσεων κ.α. των ασθενών.

Από τα 41 δείγματα που εξετάστηκαν βρέθηκαν 4 (τέσσερα) θετικά σε αδενοϊό ενώ δεν βρέθηκαν δείγματα θετικά σε εντεροϊό.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής παρουσιάζονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες. (πίνακες 16-26)

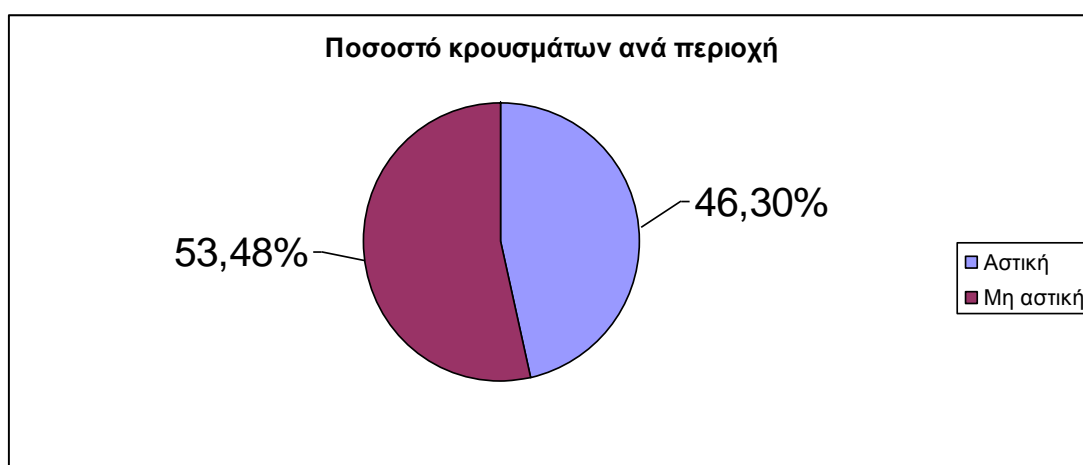
Τα περισσότερα κρούσματα γαστρεντερίτιδας που εξετάστηκαν εμφανίστηκαν σε παιδιά ηλικίας 5 χρονών.

Πίνακας 16. Ηλικίες κρουσμάτων

Ηλικία	Ποσοστό κρουσμάτων
1	12,2%
3	9,8%
4	4,9%
5	17,1%
6	2,4%
7	2,4%
8	2,4%
9	12,2%
10	9,8%
11	7,3%
12	7,3%
13	7,3%
15	4,9%

Τα κρούσματα κατανεμήθηκαν ανά περιοχή κατοικίας του ασθενούς, σε αστική και μη αστική περιοχή. Οι αστικές περιοχές αφορούν την πόλη της Δράμας ενώ οι μη αστικές περιοχές αφορούν τις περιοχές εκτός της πόλης της Δράμας. Παρατηρήθηκε ότι τα περισσότερα κρούσματα προέρχονταν από μη αστικές περιοχές.

Διάγραμμα 1. Ποσοστό κρουσμάτων ανά περιοχή.



Τα περισσότερα κρούσματα δεν είχαν σχέση με εμφάνιση κάποιου άλλου κρούσματος στο άμεσο περιβάλλον τους.

Πίνακας 18. Σχέση κρουσμάτων με άλλο κρούσμα.

	Σχέση με άλλο κρούσμα	
	OXI	ΝΑΙ
Ποσοστό κρουσμάτων	87,8%	12,2%

Τα περισσότερα κρούσματα γαστρεντερίτιδας που εξετάστηκαν εμφανίστηκαν σε παιδιά τα οποία πήγαιναν σχολείο.

Πίνακας 19. Σχέση κρουσμάτων με ομαδική διαβίωση.

	Σχολείο ομαδική διαβίωση	
	OXI	ΝΑΙ
Ποσοστό κρουσμάτων	34,1%	65,9%

Ένα μόνο κρούσμα είχε αλλοδαπή εθνικότητα.

Πίνακας 20. Αλλοδαπή εθνικότητα κρουσμάτων.

	Αλλοδαπή εθνικότητα	
	ΟΧΙ	ΝΑΙ
Ποσοστό κρουσμάτων	97,6%	2,4%

Τα περισσότερα κρούσματα γαστρεντερίτιδας παρουσιάστηκαν κατά τους χειμερινούς μήνες (από Οκτώβριο μέχρι Μάρτιο). Ενώ κατά τους θερινούς μήνες (από Απρίλιο μέχρι Σεπτέμβριο) τα κρούσματα ήταν λιγότερα. Πιο συγκεκριμένα τα περισσότερα κρούσματα παρατηρήθηκαν τους μήνες Απρίλιο και Δεκέμβριο.

Διάγραμμα 2. Ποσοστά εμφάνισης κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας κατά τη διάρκεια ενός έτους.



Το βασικότερο σύμπτωμα που παρατηρήθηκε στους ασθενείς ήταν η διάρροια. Μετά την διάρροια, τα πιο συχνά συμπτώματα που παρατηρήθηκαν ήταν ο πυρετός και ο εμετός. Σε σπάνια περιστατικά παρατηρήθηκε η ναυτία ενώ ένα μικρό ποσοστό των ασθενών που εξετάστηκαν παρουσίασαν κι άλλα συμπτώματα.

Πίνακας 23. Συμπτώματα

Συμπτώματα	Ποσοστό κρουσμάτων	
	ΟΧΙ	ΝΑΙ
Διάρροια	24,4%	75,6%
Εμετός	63,4%	36,6%

Ναυτία	90,2%	9,8%
Πυρετός	56,1%	43,9%
Άλλα συμπτώματα	80,5%	19,5%

Ποσοστό των κρουσμάτων που εξετάστηκαν ήταν θετικά σε Shigella, Campylobacter και Rotavirus, με το μεγαλύτερο απ' αυτά ποσοστό να είναι θετικό σε Rotavirus. Τα κλινικά αυτά ευρήματα των δειγμάτων προέρχονται από το μικροβιολογικό εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου της Δράμας.

Πίνακας 24. Κλινικά ευρήματα

Κλινικά ευρήματα	Ποσοστό κρουσμάτων	
	OXI	ΝΑΙ
Shigella	97,6%	2,4%
Campylobacter	90,2%	9,8%
Rotavirus	78,0%	22,0%

Όπως προαναφέρθηκε, από τα 41 δείγματα που εξετάστηκαν για αδενοϊό, βρέθηκαν 4 (τέσσερα) θετικά, τα οποία αποτελούν το ποσοστό του 9,8% των συνολικών δειγμάτων. Η ανίχνευση των θετικών σε αδενοϊό δειγμάτων έγινε με την χρήση της τεχνικής της PCR.

Πίνακας 25. Θετικά δείγματα σε Adenovirus – Αποτελέσματα PCR adenovirus

Ποσοστό κρουσμάτων	Adenovirus - PCR adenovirus	
	OXI	ΝΑΙ
	90,2%	9,8%

Τα θετικά σε αδενοϊό κρούσματα εμφανίστηκαν τους μήνες Ιανουάριο, Φεβρουάριο, Νοέμβριο και Δεκέμβριο.

Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι ένα από τα θετικά σε Adenovirus δείγματα, ήταν θετικό σε Rotavirus

Πίνακας 26. Χρονική κατανομή

ΜΗΝΕΣ	ΚΡΟΥΣΜΑΤΑ
Ιανουάριος	ΝΑΙ
Φεβρουάριος	ΟΧΙ
Μάρτιος	ΝΑΙ
Απρίλιος	ΟΧΙ
Μάιος	ΟΧΙ
Οκτώβριος	ΟΧΙ
Νοέμβριος	ΝΑΙ
Δεκέμβριος	ΝΑΙ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα κρούσματα γαστρεντερίτιδας συνήθως προκαλούνται λόγω μόλυνσης του εντέρου από μικροοργανισμούς με το 95% των περιπτώσεων να οφείλεται σε ιούς.

Σύμφωνα με έρευνες, η γαστρεντερίτιδα είναι η δεύτερη πιο συχνή ίωση μετά το κοινό κρυολόγημα λόγω της ευκολίας μετάδοσης της.

Σε υγιή άτομα δεν είναι τόσο απειλητική όσο σε ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού, όπως παιδιά, ηλικιωμένοι ή ασθενείς σε ανοσοκαταστολή. Στις ομάδες αυτές, η γαστρεντερίτιδα μπορεί να αποτελέσει μεγάλο κίνδυνο επειδή προκαλεί απώλεια υγρών και ηλεκτρολυτών (νάτριο, κάλιο). Παγκοσμίως προκαλούνται 1.5 εκατομμύρια θάνατοι σε παιδιά κάτω των 5 ετών, διότι τα παιδιά έχουν ιδιαίτερη προδιάθεση και η μόλυνση είναι κυρίαρχη μεταξύ ηλικιών από 6 έως 24 μηνών. Οι παράγοντες για υψηλές επιπτώσεις και θνησιμότητα είναι η ανεπάρκεια διαχείρισης απόβλητων, η χαμηλή ποιότητα του πόσιμου νερού, η φτωχή διατροφή, η απουσία εγκαταστάσεων βιολογικού καθαρισμού των λυμάτων, η ρύπανση του περιβάλλοντος, η αμέλεια καλής υγιεινής, η φτωχή κοινωνικοοικονομική κατάσταση και η διαβίωση στις επιβαρυνμένες οικογένειες.

Οι αδενοϊοί (τύποι 40-41) είναι μια από τις σημαντικότερες αιτίες της παιδικής γαστρεντερίτιδας μετά από τους ρότα-ιούς. Στις αναπτυγμένες χώρες οι επιπτώσεις μόλυνσης ποικίλουν από 1% έως 8%, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες το ποσοστό αυτό ποικίλει από 2% έως 32%.

Στην Ιταλία, οι Antonio et. Al. στην διετή έρευνα τους σε 414 δείγματα κοπράνων από ανήλικους ασθενείς, ανίχνευσαν αδενοϊούς σε ποσοστό 3,8%. Οι Levidiotou et al. σε εξαετή μελέτη, εξέτασαν 4604 δείγματα κοπράνων από παιδιά που προσήλθαν στο νοσοκομείο και το ποσοστό θετικών δειγμάτων για αδενοϊό ανέρχονταν σε 3.5%. Σε παραπλήσια εργασία που πραγματοποιήθηκε στην Κίνα οι Jin et. al. έλεγξαν 544 δείγματα κοπράνων από παιδιά που προσήλθαν στο νοσοκομείο και το ποσοστό θετικών δειγμάτων για αδενοϊό ήταν 3.3%. [84]

Ως κύριο σύμπτωμα, στους ανήλικους ασθενείς που προσήλθαν στο νοσοκομείο με κρούσματα γαστρεντερίτιδας, παρατηρήθηκε η διάρροια. Το δεύτερο πιο συχνό σύμπτωμα παρουσιάστηκε ο πυρετός και ως τρίτο σύμπτωμα ο εμετός. Οι Chuan Lin et. al. στην έρευνα τους, παρομοίως, διέγνωσαν την διάρροια ως κυρίαρχο σύμπτωμα, ενώ τον πυρετό ως δεύτερο και τον εμετό ως τρίτο σύμπτωμα. Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα πως οι παρατηρήσεις μας για τον κλινικό χαρακτηρισμό των

εντερικών αδενοϊών τύπου 40 και 41, συνάδουν με τις παρατηρήσεις των παραπάνω μελετών. Η διάρροια έχει παρατηρηθεί ως κύριο σύμπτωμα και από τους Levidiotou et. al..

Σε εποχιακή κατανομή, τα θετικά δείγματα παρατηρήθηκαν τους χειμερινούς μήνες και την άνοιξη. Οι Levidiotou et. Al, παρομοίως, εντόπισαν τα περισσότερα θετικά δείγματα την άνοιξη και το φθινόπωρο. Οι Hamsa et al τα περισσότερα θετικά εντόπισαν την άνοιξη και τους καλοκαιρινούς μήνες. Στη μελέτη των Chuan lin et al. τα περισσότερα θετικά δείγματα αναφέρονται το φθινόπωρο και τον χειμώνα. Οι Antonio et. al. τα περισσότερα θετικά για τον πρώτο χρόνο (2005-2006) εντόπισαν την άνοιξη και το φθινόπωρο, ενώ για τον δεύτερο χρόνο (2006-2007) τον χειμώνα και την άνοιξη. Σύμφωνα με τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι οι αδενοϊοί δεν έχουν συγκεκριμένη εποχιακή προτίμηση και μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση από την αρχή μέχρι το τέλος του χρόνου.

Η παρουσία των αδενοϊών εν αντιθέσει με τους εντεροϊούς οφείλεται στη μεγάλη ανθεκτικότητα που εμφανίζουν οι αδενοϊοί στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι εντεροϊοί είναι RNA ιοί και η απομόνωση τους με kit παρουσιάζει δυσκολίες με βάση το γεγονός ότι τα δείγματα είναι κόπρανα. Τα δείγματα των κοπράνων εμπεριέχουν αρκετούς αναστολείς σε βαθμό που μπορούν να αναστείλουν την ανίχνευση τους.

Ένα γεγονός ακόμα, που συντέλεσε στην μη εμφάνιση των εντεροϊών στα δείγματα μας, θεωρείται η χαμηλή επιδημιολογική τους αναφορά στην ευρύτερη περιοχή του νομού της Δράμας, σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει για την ανίχνευση εντερικών ιών σε λύματα βιολογικού καθαρισμού, από το Εργαστήριο Υγιεινής & Προστασίας Περιβάλλοντος του ΔΠΘ, στο Τμήμα Ιατρικής (data not shown). [85, 86, 87, 88]

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [18] Εισαγωγή στην Ιατρική Μικροβιολογία Ιολογία και Ανοσολογία, Ιωάννης Κ. Παπαπαναγιώτου, Βασιλική Κυριαζοπούλου-Δαλαϊάνα, University Studio Press
- [19] Σ.Ι. Κολιαής, Μικροβιολογία, τρίτη έκδοση, university studio press, Θεσσαλονίκη 2001
- [20] Beld et al. (2004) Highly sensitive assay for detection of enterovirus in clinical specimens by reverse transcription PCR with an armored RNA internal control. Journal of clinical microbiology, July 2004, vol. 42, no 7, p. 3059-3064
- [21] [Update on adenovirus and its vectors. J. Gen. Virol. \(2000\), 81: 2573-2604.](#)
- [22] <http://www.med.yale.edu>
- [23] www.wikipedia.org
- [24] www.virologo.com
- [25] Π. Μαρκουλάτος, Β. Σαμαρά, Γ. Μαρινάκης, Κ. Καπάρος, Π.Φουντουκίδου, Β. Κρικέλης, Ν. Σπύρου, Ν. Βαμβακόπουλος [1996], Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) στην διάγνωση των ιώσεων, Ελληνική Ιολογία 1(1): 83-88
- [26] Σημειώσεις του καθηγητή Π. Μαρκουλάτου στο εργαστήριο της Μικροβιολογίας - Ιολογίας, 3^ο εξάμηνο, τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- [27] Σημειώσεις του καθηγητή Κ. Μαθιόπουλου στο εργαστήριο της Μοριακής Βιολογίας Ι, 4^ο εξάμηνο, τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- [28] Σεβαστή Φιλιππίδου, Πτυχιακή Εργασία
- [29] James D. Watson, Richard M. Myers, Amy A Caudy, Jan A. Witkowski [2007], Ανασυνδρασμένο DNA. Τρίτη Αγγλική Έκδοση-Πρώτη Ελληνική Έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
- [30] http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction
- [31] Ιωάννης Κ. Παπαπαναγιώτου – Βασιλική Κυριαζοπούλου-Δαλαϊάνα [2005], Εισαγωγή στην Ιατρική Μικροβιολογία Ιολογία και Ανοσολογία. University Studio Press. Θεσσαλονίκη.
- [32] http://en.wikipedia.org/wiki/Nested_polymerase_chain_reaction
- [33] http://europa.eu/pol/health/index_el.htm
- [34] http://en.wikipedia.org/wiki/TBE_buffer
- [35] http://en.wikipedia.org/wiki/Ethidium_bromide
- [36] http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate_buffered_saline
- [37] Swenson P. D., G. Wadell, A. Allard, and J. C. Hierholzer [2003], Adenovi-

- Ruses. pp. 1404–1417. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. ASM Press. Washington. D.C
- [38] http://www.le.ac.uk/ge/genie/vgac/images/PCR_000.jpg
- [39] <http://www.pcrstation.com/images/nested-pcr.gif>
- [40] Δρ. Ελένη Καλκάνη-Μπουσιάκου [2008], *Ιολογία*. Εκδόσεις Ελλην
- [41] E. Sandra McFarlane [1970], *Antibody to onogenic virus in Cancer Patients*. Department of Microbiology. Dalhousie University. Halifax. Nova Scotia. Canada.
- [42] <http://www.stanford.edu/group/virus/adenovirus/2004takahashi/webpage/second.html>
- [43] <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch067.htm>
- [44] Hamid Jalal et al. [2005], First Reported Outbreak of Diarrhea Due to Adenovirus Infection in a Hematology Unit for Adults. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 43. pp. 2575–2580
- [45] W. C. Russell [2009], Adenoviruses: update on structure and function. *J. Gen. Virol.* Vol. 90. pp 1-20
- [46] Burnett, R. M. [1985], The structure of the adenovirus capsid II. The Packing symmetry of hexon and its implications for viral architecture. *J. Mol. Biol.* Vol. 185. pp. 125–143.
- [47] <http://www.genetherapynet.com/viral-vectors/adenoviruses.html>
- [48] Benjamin Clark and Mike McKendrick [2004], A review of viral gastroenteritis. *Curr. Opin. Dis.* Vol. 17. pp. 461-469.
- [49] Annika Allard et al [2001]. Rapid Typing Adenoviruses By a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 39. pp. 498-505
- [50] Morris Safford Jones II et al. [2007], New Adenovirus Species Found in a Patient Presenting with Gastroenteritis. *J. virol.* pp. 5978–5984.
- [51] Horwitz, M. S. [2001], Adenoviruses. pp. 2301-2326. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.). *Fields virology*. 4th ed. Lippincott/The Williams & Wilkins Co. Philadelphia. Pa.
- [52] Swenson, P. D., G. Wadell, A. Allard, and J. C. Hierholzer [2003], Adenoviruses. pp. 1404-1417. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. ASM Press. Washington. D.C.

- [53] Akiyama H . et al. [2001], Adenovirus is a key pathogen in hemorrhagic cystitis associated with bone marrow transplantation. *Clin. Infect. Dis.* Vol. 32. pp. 1325–1330.
- [54] Carter B. A. et al. [2002], Intravenous cidofovir therapy for disseminated adenovirus in a pediatric liver transplant recipient. *J. Clin. Transplantation.* Vol. 74. pp. 1050-1052.
- [55] Echavarria M. S. et al. [1999], PCR detection of adenovirus in a bone marrow transplant recipient: hemorrhagic cystitis as a presenting manifestation of disseminated disease. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 37. pp. 686–689.
- [56] Leslie Collier, John Oxford, Jim Pipkin [2000], *Human Virology*. Second Edition, Oxford University Press.
- [57] David O.White and Frank J.Fenner [1994], *Medical Virology*. Fourth edition. Academic press.
- [58] Swenson P. D., G. Wadell, A. Allard, and J. C. Hierholzer [2003], Adenoviruses. pp. 1404–1417. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. ASM Press. Washington. D.C
- [59] Hierholzer J. C. [1992], Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev* 5. pp. 262-274.
- [60] Ryan, M. A. K. et al. [2001], Two fatal cases of adenovirus-related illness in previously healthy young adults-Illinois. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 50. pp.553–555.
- [61] Helen Sarantis et al.[2004]. Comprehensive Detection and Serotyping of Human Adenoviruses by PCR and Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 42. pp. 3963-3969
- [62] <http://virology-online.com/viruses/Adenoviruses2.htm>
- [63] www.microbiologybytes.com/virology/adenoviruses.html
- [64] Arnberg, N. et al. [2000], Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J. Virol.* Vol. 74. pp. 42–48
- [65] Meier and Greber [2004], Adenovirus endocytosis. *J. Gene Med.* Vol. 6. pp. 152-163.
- [66] Anna Segerman et al. [2003], Adenovirus Type 11 Uses CD46 as a Cellular Receptor. *J. Virol.* Vol. 77. pp. 9183-9191.
- [67] Allan J.Cann [1997], *Principles of molecular virology*, Third Edition, University of Leicester. Uk. Academic press.

- [68] W. C. Russell [2000], [Update on adenovirus and its vectors. J. Gen. Virol. Vol. 81. pp. 2573-2604](#)
- [69] Δρ. Σκάβδης Γεώργιος [2007], Σημειώσεις στο μάθημα Τεχνολογία Μοριακής Βιολογίας II.
- [70] <http://www.everydayhealth.com/health-information/gastroenteritis-in-children-what-is-it.aspx>
- [71] C.Colomba et al. [2006], Viral gastroenteritis in children hospitalized in Sicily, Italy. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Vol. 25. pp. 570-575.
- [72] Jacques Rohayem 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. pp. 49-59
- [73] http://europa.eu/pol/health/index_el.htm
- [74] Albert Bosch [1998], Human enteric viruses in the water environment: a minireview. Internatl Microbiol. Vol. 1. pp. 191-196.
- [75] Artur Rze_ zutka, Nigel Cook [2004], Survival of human enteric viruses in the environment and food. FEMS Microbiology Reviews. Rev. 28. pp. 441-453.
- [76] Ansari, S.S., et al. [1988], Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. J. Clin. Microbiol. Vol. 26. pp. 1513–1518.
- [77] Enriquez, C.E. et al. [1995], Survival of enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. Water Res. Vol. 29. pp. 2548–2553.
- [78] Grigor'eva, et al.[1965], Survival of bacteria and viruses on vegetable crops irrigated with infected water. Hyg. Saint. Vol. 30. pp 357-361.
- [79] Lopman, B.A. et al. [2003], Viral gastroenteritis outbreaks in Europe. Emerg. Inf. Dis. 9. pp. 90–96.
- [80] Mead, P.S. et al.. [1999], Food-related illness and death in the United States. Emerg. Inf. Dis. 5. pp. 607–625.
- [81] Cook, N. and Myint, S.H. [1995], Modern methods for the detection of viruses in water and shellfish. Rev. Med. Microbiol. Vol. 6. pp. 207–216.
- [82] Wyn-Jones, A.P. and Sellwood, J. [2001], Enteric viruses in the aquatic environment. J. Appl. Microbiol. Vol. 91. pp. 945–962.
- [83] Enriquez, C.E. et al. [1995], Survival of enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. Water Res. Vol. 29. pp. 2548–2553.

