

«Μοριακή ανίχνευση μέσω αλληλούχισης Νοροϊών της ομάδας GI από περιβαλλοντικά δείγματα»

“Molecular detection of GI Noroviruses from environmental samples through sequencing”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαρκουλάτος Παναγιώτης

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

Κομιώτης Δημήτριος

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

Μόσιαλος Δημήτριος

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κύριο Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα θέμα ιδιαίτερα ενδιαφέρον, για την άποψη συνεργασία και κατανόηση εκ μέρους του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Κομιώτη Δημήτριο και τον κ. Μόσιαλο Δημήτριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κ. Ρούτερ Ειρήνη Γεωργία Άννα για την εξαιρετική συνεργασία και τη σημαντική καθοδήγησή της στην εκμάθηση όλων των καινούργιων τεχνικών που έπρεπε να εφαρμόσω στο εργαστήριο ώστε να πραγματοποιηθεί το πειραματικό μέρος της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά όσους δικούς μου ανθρώπους με στήριξαν και με ενθάρρυναν ώστε να μπορέσω να ολοκληρώσω το μεταπτυχιακό μου.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς τους γονείς μου Γεώργιο και Σωτηρία για τις αξίες και τις αρχές με τις οποίες με μεγάλωσαν. Τους ευχαριστώ για την στήριξη, την εμπιστοσύνη, την κατανόηση και την αγάπη που μου δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς τίποτα δε θα ήταν δυνατόν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	8
1.2 Ταξινόμηση.....	9
1.3 Βιολογία των νοροϊών.....	11
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	11
1.3.2 Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού.....	11
1.3.3 Δομή του ιού.....	14
1.3.4 Αντιγραφή του ιικού RNA.....	16
1.4 Ευαισθησία του ξενιστή και αλληλεπίδραση ιού-ξενιστή.....	17
1.5 Παθογένεια.....	19
1.6 Επιδημιολογία.....	20
1.7 Μοριακή επιδημιολογία γενετικών ομάδων – γενότυπων.....	23
1.8 Κλινικά συμπτώματα και μετάδοση του ιού.....	25
1.9 Θεραπεία.....	27
1.10 Εμβόλια.....	28
1.11 Διαγνωστικές μέθοδοι.....	30
1.12 Σκοπός της εργασίας.....	31
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
2.1 Πειραματικά στελέχη.....	32
2.1.1 Θετικοί μάρτυρες.....	32
2.1.2 Περιβαλλοντικά δείγματα.....	32
2.2 Επεξεργασία δειγμάτων.....	34
2.2.1 Μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων.....	34
2.2.2 Μέθοδος προσρόφησης-έκλυσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα.....	35
2.3 Εκχύλιση του ιικού RNA.....	35
2.4 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription – RT).....	36
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	37
2.5.1 Εκκινητικά μόρια.....	37
2.5.2 PCR.....	37
2.5.3 AUTONESTED PCR.....	38
2.6 Κλωνοποίηση.....	39
2.6.1 Καθαρισμός των προϊόντων PCR.....	39

2.6.2	Μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων PCR.....	39
2.6.3	Εύρεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των κλωνοποιημένων προϊόντων.....	43
2.6.4	Επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.....	44
2.6.5	Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.....	44
2.6.6	Αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας.....	45
2.6.7	Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών.....	45
2.6.8	Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.....	46
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
3.1	Αποτελέσματα PCR, AUTONESTED PCR.....	47
3.2	Αποτελέσματα της μοριακής κλωνοποίησης.....	47
3.3	Ταυτοποίηση μέσω αλληλούχισης στελεχών των θετικών δειγμάτων.....	48
3.4	Φυλογενετική ανάλυση στελεχών.....	48
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νοροϊοί αποτελούν το ένα από τα πέντε γένη της οικογένειας *Caliciviridae*. Το γένος διαιρείται σε πέντε γενετικές ομάδες από τις οποίες οι τρεις περιέχουν ανθρώπινους ιούς (I, II και IV). Το γονιδίωμα τους αποτελείται από ένα γραμμικό, μονόκλωνο, θετικής πολικότητας RNA μήκους 7.700 βάσεων και οργανώνεται σε τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Το ORF1 κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη, η οποία μετά από επεξεργασία παράγει τις ώριμες μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Τα ORF2 και ORF3 κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες του ιού, εκ των οποίων η VP1 είναι η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου και υπεύθυνη για τις αντιγονικές ιδιότητες του ιού. Οι νοροϊοί αποτελούν σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα, γνωστά για την πρόκληση επιδημικών εκδηλώσεων σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε επίπεδο πληθυσμών και θεωρούνται υπεύθυνοι για πάνω από το 96% όλων των περιπτώσεων μη βακτηριακής οξείας επιδημικής γαστρεντερίτιδας. Η απουσία συστημάτων κυτταροκαλλιέργειας και ενός μικρού ζωικού προτύπου περιορίζει τις γνώσεις για τη βιολογία, την παθογένεια και την αποτελεσματική αντιμετώπιση του ιού.

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε με μοριακές μεθόδους νοροϊούς της ομάδας GI από 30 περιβαλλοντικά δείγματα. Η ανίχνευση νοροϊών, πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της RT-PCR. Τα θετικά για τον ιό δείγματα αλληλουχήθηκαν και αναλύθηκαν φυλογενετικά.

Τα στελέχη EIS5, EX11, EIS6, AB9 και AB7 που ανιχνεύθηκαν, αποτελούν πέντε διαφορετικά νοροϊικά στελέχη και κατατάσσονται στην γενετική ομάδα GI. Για τα στελέχη EIS5, EIS6, AB9 και AB7 το κοντινότερο στέλεχος είναι το AY921623 που απομονώθηκε στη Γαλλία, ενώ για το στέλεχος EX11 η κοντινότερη του φυλογενετικά αλληλουχία είναι εκείνη του στελέχους Chiba virus. Ο *Chiba virus* διαθέτει θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA 7697 βάσεων και ανήκει στη γενετική ομάδα GI των νοροϊών.

ABSTRACT

Noroviruses is one of the five genera of *Caliciviridae* family. The genus is divided into five genogroups (I–V), of which three (I, II and IV) include human viruses. Their genome is a linear, positive, single strand RNA of 7.700 bases and is organized into three open reading frames (ORFs). ORF1 encodes a polyprotein which produces the mature non structural viral proteins. ORF2 and ORF3 encode the structural viral proteins from which VP1 is the major capsid protein. Noroviruses are important pathogens known to cause outbreaks of gastroenteritis at population level and are responsible for over 98% of all cases of acute epidemic non-bacterial gastroenteritis. The lack of cell culture systems and the existence of a small animal model limit our knowledge about the biology, the pathogenesis and effective treatment of norovirus.

In this study we tried to assess GI noroviruses from 30 environmental samples with molecular methods. RT-PCR with specific primers P78-P80 was applied, followed by autonested PCR to increase the sensitivity of the assay and then positive samples were cloned, sequenced bidirectionally and analyzed phylogenetically.

The five detected strains EIS5, EX11, EIS6, AB9 and AB7 consisted of five different noroviral strains belonging to genogroup GI. Strains EIS5, EIS6, AB9 and AB7 presented a similarity with strain AY921623 which was characterized in France while strain EX11 presented a similarity with Chiba virus. *Chiba* virus is GI virus with a positive, linear, single strand RNA of 7697 bases.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η λοιμώδης γαστρεντερίτιδα αποτελεί μια κοινή ασθένεια. Ως αιτία της νόσου, τα πρώτα χρόνια των ερευνών, αποδείχθηκαν τα βακτήρια, ενώ η καθιέρωση των ιών ως αιτιολογικός παράγοντας αποτέλεσε δύσκολη και μακροχρόνια διαδικασία (Karikian, 2000). Κατά τη δεκαετία του 1990, η χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας στη διάγνωση των ιών επέτρεψε τη συσχέτιση ενός μεγάλου ποσοστού περιπτώσεων μη βακτηριακής γαστρεντερίτιδας με τους νοροϊούς (Atmar and Estes, 2001). Σήμερα, οι νοροϊοί υπολογίζεται ότι ευθύνονται περίπου για το ήμισυ του συνόλου των κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας σε παγκόσμιο επίπεδο.

Για πρώτη φορά, το 1929, αναφέρεται στη βιβλιογραφία η ασθένεια του «χειμερινού εμετού» από το Zahorsky και περιγράφεται ως «ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από αιφνίδια έναρξη εμετού και διάρροιας, συμπτώματα που κορυφώνονται κατά τους χειμερινούς μήνες». Η συσχέτιση της ασθένειας με τον ιό αποδείχθηκε μέσω πειραμάτων, τις δεκαετίες 1940 και 1950. Τα πειραματικά αποτελέσματα εξαίρεσαν τα βακτήρια ως αιτιολογικό παράγοντα, δεδομένου ότι η ασθένεια μπορεί να μεταδοθεί από δείγματα κοπράνων που διέρχονται μέσω φίλτρων με μέγεθος πόρων που δεν επιτρέπει τη διέλευση των βακτηρίων (Karikian, 2000).

Διαδοχικές ερευνητικές μελέτες απέδειξαν ότι ο αιτιολογικός παράγοντας είχε την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται μέσα στον ξενιστή, η ταυτοποίηση, όμως, του οργανισμού δεν ήταν δυνατή χρησιμοποιώντας μεθόδους κυτταροκαλλιέργειας. Ωστόσο, ο ιός παρατηρήθηκε για πρώτη φορά μέσω ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας (IEM), το 1972 (Karikian *et al.*, 1972). Η σύνδεση του ιού με την ασθένεια εδραιώθηκε αποδεικνύοντας ότι τα αντισώματα από ορό ασθενών που ευρίσκονταν σε φάση ανάρρωσης, αντιδρούσαν με πρωτεΐνες του ιού.

Ο ιός ονομάστηκε *Norwalk* καθώς τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την προαναφερθείσα αναγνώριση, προήλθαν από μία επιδημία σε σχολείο του Norwalk στο Οχάιο (ΗΠΑ), που ξέσπασε το 1968, και κατά την οποία προσεβλήθη το 50% των παιδιών, αλλά και μεγάλος αριθμός συγγενών τους (Karikian *et al.*, 1972). Έκτοτε, απομονώθηκαν κι άλλοι ιοί με παρόμοια δομή, οι οποίοι αρχικά χαρακτηρίστηκαν *Norwalk-like* ιοί και στη συνέχεια, «μικροί ιοί κυκλικής διαμόρφωσης (small round structured virus)».

Μετά το 1990, με τη βοήθεια που προσέφερε η γενετική και η μέθοδος της κλωνοποίησης αναγνωρίστηκαν τέσσερα γένη και οι Norwalk ιοί μετονομάστηκαν σε Νορο-ιούς (Jiang *et al.*, 1990). Με τη νέα ταξινόμηση οι Νορο-ιοί ανήκουν στην οικογένεια των *Caliciviridae* η οποία περιλαμβάνει τέσσερα γένη με κυριότερους εκπροσώπους το γένος των Νορο-ιών (NLVs), που φαίνεται να προσβάλλουν συχνότερα τους ενήλικες και το γένος των Sapporo -ιών (SLVs) που προσβάλλουν κυρίως τα παιδιά.

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι νοροϊοί αποτελούν μία γενετικά ποικιλόμορφη ομάδα ιών που ανήκουν στην οικογένεια *Caliciviridae* (Green, 2007). Η οικογένεια *Caliciviridae* αποτελείται από τα 5 γένη των: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus*, *Vesivirus*, *Nebovirus*, τα οποία συμπεριλαμβάνουν παθογόνους ιούς που προσβάλλουν ή και όχι τον άνθρωπο (Green, 2007; Clarke *et al.*, 2011). Τα γένη *Norovirus* (NoV) και *Sapovirus* (SaV), είναι τα μόνα που περιλαμβάνουν ανθρώπινους παθογόνους παράγοντες, ενώ και τα δύο προκαλούν οξεία γαστρεντερίτιδα.

Τα γένη *Lagovirus*, *Vesivirus* και *Nebovirus* συμπεριλαμβάνουν παθογόνα που προσβάλλουν τα ζώα. Ο ιός RHDV (rabbit hemorrhagic disease virus) του γένους *Lagovirus*, προκαλεί μία συχνά θανατηφόρα ασθένεια στα κουνέλια, ο ιός FCV (feline calicivirus) του γένους *Vesivirus*, προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα οικόσιτων και άγριων γάτων και ο ιός Newbury-1 του γένους *Nebovirus*, αντίστοιχα, τα βοοειδή.

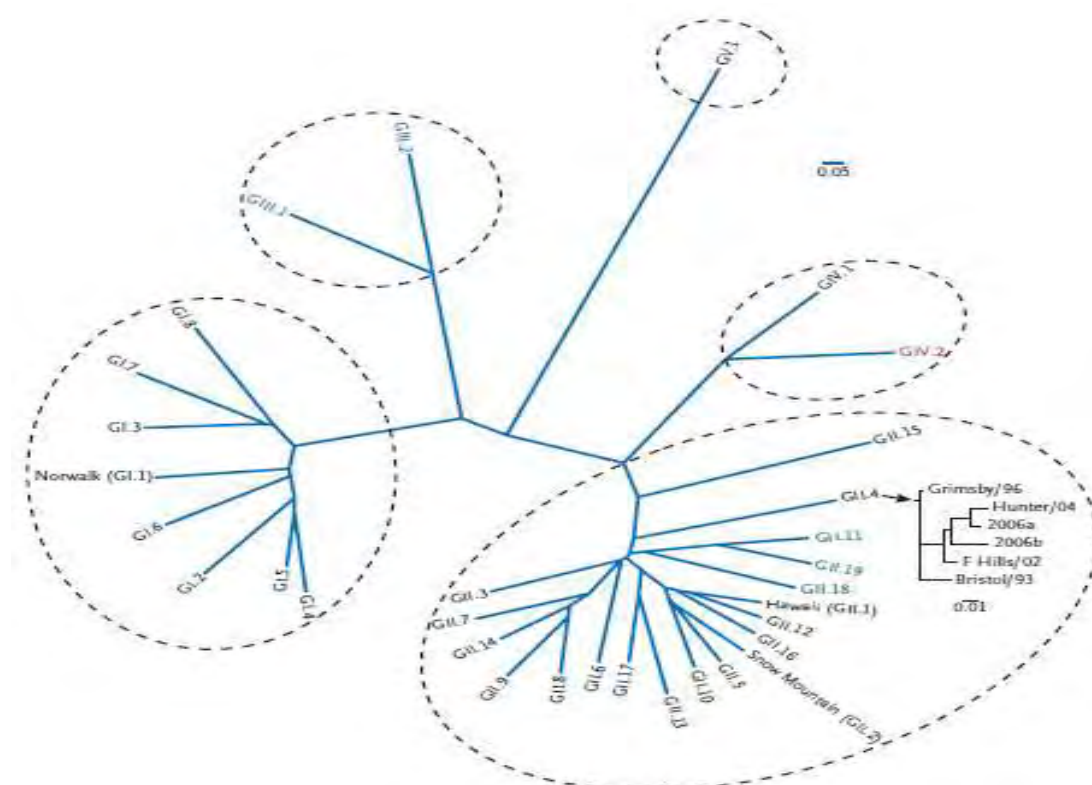
Στην οικογένεια *Caliciviridae* αποδίδονται και δύο αμφιλεγόμενα γένη, τα *Recovirus* και *Valovirus*. Ο ιός Tulane virus (TV), ο οποίος απομονώθηκε από δείγματα κοπράνων του είδους *Rhesus macaques* και ο St-Valrieu-like virus από κόπρανα χοίρων ανήκουν στα γένη *Recovirus* και *Valovirus*, αντίστοιχα (Farkas *et al.*, 2008).

Ιστορικά, η αναγνώριση των νοροϊών βασίστηκε σε πολλαπλές μελέτες δειγμάτων εθελοντών (Wyatt *et al.*, 1974), σε δοκιμές ορότυπου και στην παρατήρηση μέσω ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Δεδομένου ότι οι νοροϊοί δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε κυτταροκαλλιέργεια, η παρούσα ταξινόμησή τους βασίζεται

σε ομοιότητες στην πλήρη ή μερική αλληλουχία της κύριας πρωτεΐνης του καψιδίου VP 1 (Zheng *et al.*, 2006).

Οι νοροϊοί ταξινομούνται σε 5 γενετικές ομάδες: GI έως V, οι οποίες, διαδοχικά, υποδιαιρούνται σε τουλάχιστον 31 γενότυπους (Εικόνα 1). Συγκεκριμένα, οι ομάδες GI, GII και GIII υποδιαιρούνται περαιτέρω σε 8, 19 και 2 γενότυπους αντίστοιχα, ενώ οι ομάδες GIV και GV περιλαμβάνουν από έναν μόνο γενότυπο. Η διαφορά στην ακολουθία των αμινοξέων της καψιδικής πρωτεΐνης VP 1 είναι 43% μεταξύ των στελεχών της ίδιας γενετικής ομάδας και μεγαλύτερη του 61% μεταξύ 5 διαφορετικών γενετικών ομάδων. Τέλος, η διαφορά στην αλληλουχία των αμινοξέων της VP 1 μεταξύ των στελεχών του ίδιου γενότυπου ξεπερνά το 14% (Zheng *et al.*, 2006).

Οι νοροϊοί που προσβάλλουν τον ανθρώπινο οργανισμό έχουν συνδεθεί με τις γενετικές ομάδες GI, GII και GIV, οι ομάδες GIII και GV με τους νοροϊούς των βοοειδών και ποντικών, αντίστοιχα. Στην ομάδα GII ανήκει, επίσης, παθογόνο των χοίρων, ενώ στη GIV των αιλουροειδών (Wobus *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2006).



Εικόνα 1: Φυλογενετική ανάλυση των νοροϊών (Glass *et al.*, 2009).

1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Οι νοροϊοί ως καλυκοϊοί ταξινομούνται στα παθογόνα βιοασφάλειας επιπέδου 2. Εμφανίζουν υψηλή μολυσματική ικανότητα και σταθερότητα στο περιβάλλον, όπως αντίσταση σε θερμοκρασίες (60 °C), στην υπεριώδη ακτινοβολία, στην αιθανόλη, στη χλωρίωση και στα μέτρα αποστείρωσης (απολύμανση χεριών).

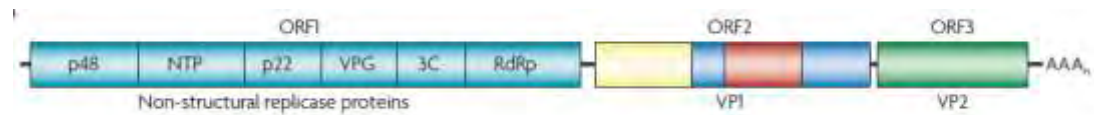
Πολλές πτυχές της βιολογίας του ιού δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητές. Το γεγονός αυτό, αποδίδεται κυρίως στην απουσία ενός συστήματος κυτταροκαλλιέργειας ή στην εύρεση ενός κατάλληλου μικρού ζωικού προτύπου για περαιτέρω μελέτη (Duizer *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2001).

Το πρώτο επιτυχημένο μοντέλο καλλιέργειας, το οποίο επιτεύχθηκε μόλις πριν από λίγα χρόνια, αφορούσε ιό που προσβάλλει ποντίκια. Πρόκειται για το στέλεχος Murine Norovirus 1 (MNV-1), το οποίο αναπτύχθηκε σε πρωτογενή καλλιέργεια δενδριτικών κυττάρων και μακροφάγων (Wobus *et al.*, 2004). Ωστόσο, πιο πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα, τα οποία επέτρεψαν το μερικό πολλαπλασιασμό και την έκφραση του ιού σε κύτταρα θηλαστικών και συγκεκριμένα σε ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα (Donaldson *et al.*, 2008).

1.3.2 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ

Η κατανόηση της γονιδιακής οργάνωσης του ιού άρχισε να διευκρινίζεται περίπου το 1990, όταν οι Jiang και Estes κλωνοποίησαν (Jiang *et al.*, 1990) και αλληλούχισαν το γονιδίωμα του ιού.

Το γονιδίωμα των νοροϊών είναι ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA περίπου 7.5 kb. Προστατεύεται από το περιβάλλον από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, αλλά δεν περιβάλλεται από φάκελο. Το γονιδίωμα είναι οργανωμένο σε 3 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs - open reading frames) (Εικόνα 2). Συνδέεται ομοιοπολικά στο 5' άκρο με πρωτεΐνη προερχόμενη από τον ιό και στο 3' άκρο εμφανίζεται μια πολυΑ ουρά (Green, 2007).



Εικόνα 2 : Οργάνωση γονιδιώματος νοροϊού σε 3 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (Donaldson *et al.*, 2010)

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF1 κωδικοποιεί μία μη δομική πολυπρωτεΐνη, η οποία υποβάλλεται σε επεξεργασία στο στάδιο της μετάφρασης και στο μεταμεταφραστικό στάδιο από την ιική πρωτεάση 3CL^{pro} (3C-like protease) σε τουλάχιστον 6 πρωτεΐνες (εικόνα 3). Ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο (N-terminal) της πολυπρωτεΐνης αυτές είναι:

Η p48 η οποία πιθανόν συμμετέχει στην κυτταρική επικοινωνία. Η έκφραση της p48 *in vitro* εντοπίστηκε στην συσκευή Golgi των κυττάρων, οδηγώντας έτσι, στην υπόθεση ότι παίζει ρόλο στην μεμβρανική αναδιάταξη και στην ενδοκυττάρια κίνηση (Ettayebi and Hardi, 2003; Fernandez *et al.*, 2004).

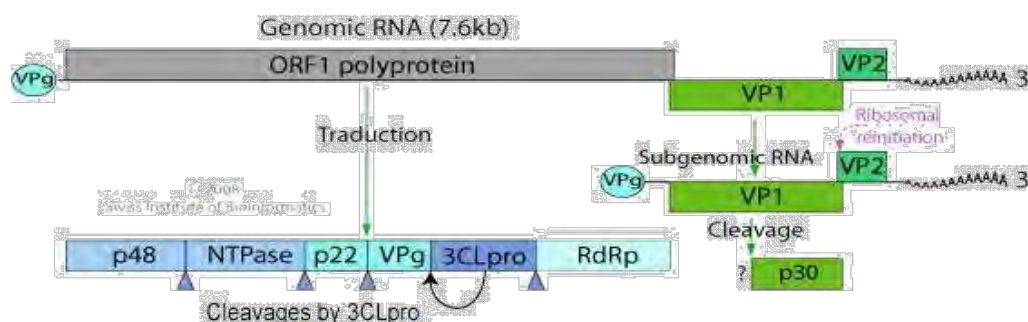
Η νουκλεοτιδική τριφωσφατάση NTPase δεσμεύει και υδρολύει NTPs.

Η p22 της οποίας η λειτουργία παραμένει άγνωστη αλλά παρουσιάζει ομοιότητες με την πρωτεΐνη 3A των *picorna* ιών.

Η VPg (virion protein, genome-linked), η οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του γονιδιώματος όπου παρέχει ένα κάλυμμα, και έχει προταθεί ότι αλληλεπιδρά με τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (Daughenbaugh *et al.*, 2003; Daughenbaugh *et al.*, 2006; Rohayem *et al.*, 2006; Blakeney *et al.*, 2003).

Η πρωτεάση (Pro) επεξεργάζεται την πολυπρωτεΐνη ORF1 των νοροϊών στις μεμονωμένες μη δομικές πρωτεΐνες, (Liu *et al.*, 1996; Sosnontsev *et al.*, 2006). Η ενεργή πλευρά της Pro περιλαμβάνει την καταλυτική ομάδα των His30, Glu54 και Cys139, που εντοπίζονται στο κέντρο μίας βαθιάς σχισμής μεταξύ του N και του C τελικού άκρου όπου ενώνονται με δεσμούς υδρογόνου (Nakamura *et al.*, 2005; Someya *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2006). Η His 157, είναι απαραίτητη στο υπόστρωμα πρόσδεσης (Zeitler *et al.*, 2006). Η πρωτεάση (Pro), εκτός από τον βασικό της ρόλο στην επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης, εμποδίζει την κυτταρική μετάφραση διασπώντας συγκεκριμένες περιοχές των κυτταρικών πρωτεϊνών, οι οποίες προσδένουν τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης και το RNA (Zeitler *et al.*, 2006).

Η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση των νοροϊών, έχει αποδειχτεί ότι είναι θεμελιώδης για την *in vitro* ιική αντιγραφή και εντάσσεται σαν μέλος της οικογένειας των Gly–Asp–Asp (GDD) πολυμερασών, όπου ανήκουν και πολλοί άλλοι θετικής πολικότητας RNA ιοί (Fukushi *et al.*, 2006). Οι λειτουργίες της ιικής πολυμεράσης στην αντιγραφή του ιικού γενόματος, για την σύνθεση του RNA, πραγματοποιούνται με την χρησιμοποίηση ενός VPg – εκκινήτικού μηχανισμού και της πολυαδενυλιωμένης ουράς στο 3' άκρο ως εκμαγείο (Fukushi *et al.*, 2006).



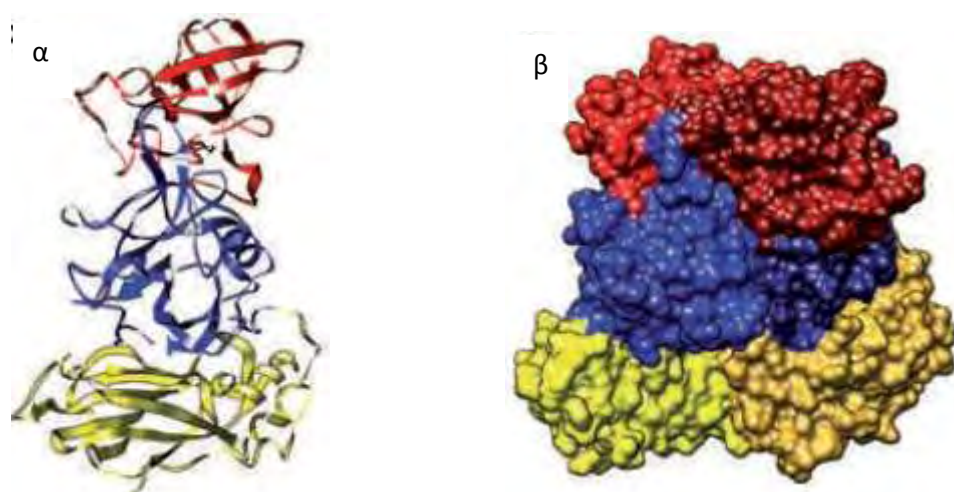
Εικόνα 3: Η πολυπρωτεΐνη ORF1 και οι 6 πρωτεΐνες που κωδικοποιεί.

Το πλαίσιο ανάγνωσης ORF2 κωδικοποιεί την κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου VP1 και το ORF3 μια μικρότερη δευτερεύουσα δομική πρωτεΐνη VP2 (Glass *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 1992). Η πρωτεΐνη VP1 του καψιδίου (εικόνα 4) διαιρείται περαιτέρω σε δύο κύριες περιοχές, τη συντηρημένη περιοχή κελύφους (S) και την περιοχή του προεξέχοντος βραχίονα (P), η οποία εμφανίζει ποικιλότητα. Η περιοχή P διαιρείται διαδοχικά σε P1 και P2. Η P2 υπομονάδα αποτελεί υπερμεταβλητή περιοχή και εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια του ιικού καψιδίου. Μέσω της υπομονάδας P2 οι νοροϊοί συνδέονται με ειδικούς υδατανθρακικούς υποδοχείς HBGAs (Histoblood Group Antigens), ένας μηχανισμός μέσω του οποίου διευκολύνεται η είσοδος του ιού στο γαστρεντερικό σωλήνα (Tan and Jiang, 2011).

Τα ισοσώματα (Virus like particles- VLPs) περιέχουν 180 αντίγραφα ή 90 διμερή της VP1 που συγκεντρώνονται σε εικοσαεδρικά μόρια (Prasad *et al.*, 1999).

Η δομική πρωτεΐνη VP2 απαντάται σε 2 ή 3 αντίγραφα ανά ισοσώματιο (Glass *et al.*, 2000; Hardy, 2005). Η λειτουργία της στην ιική αναπαραγωγή δεν έχει ακόμη καθοριστεί, αλλά εκτιμάται ότι αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης VP1 και

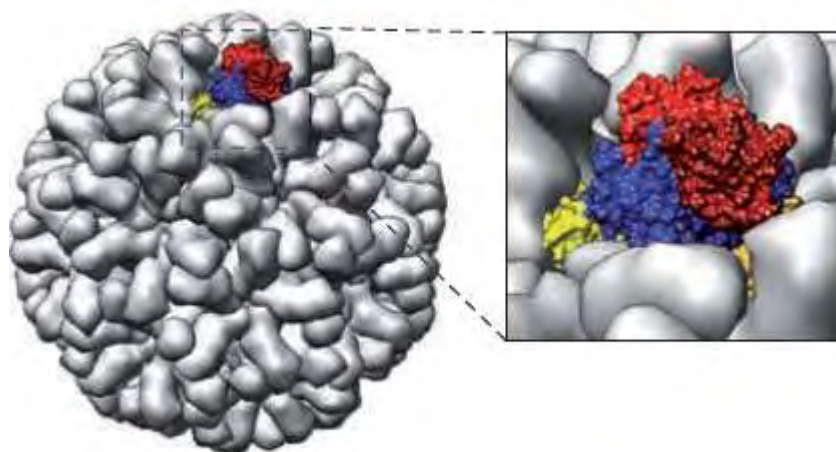
συμμετέχει στη δημιουργία του καψιδίου που περιβάλλει το ιικό γενετικό υλικό (Karst, 2010).



Εικόνα 4: (α) Η δομή του μονομερούς VP1. Απεικονίζεται η συντηρημένη περιοχή κελύφους (S) (κίτρινο χρώμα) και η περιοχή του προεξέχοντος βραχίονα (P) με τις υπομονάδες P1(μπλε) και P2 (κόκκινο). (β) Το A:B διμερές, αποτελείται από δύο μονομερή, το ένα από την αλυσίδα A, παρουσιάζεται στις «ανοιχτές» σκιές και η αλυσίδα B παρουσιάζεται στις σκοτεινότερες σκιές (Donaldson *et al.*, 2010).

1.3.3 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

Οι νοροϊοί είναι μικροί εικοσαεδρικοί ιοί διαμέτρου 27-32 nm. Το γονιδίωμα τους προστατεύεται από το περιβάλλον από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, αλλά δεν περιβάλλεται από φάκελο. Όπως προαναφέρθηκε, χαρακτηρίζονται από την έλλειψη ενός αξιόπιστου συστήματος κυτταροκαλλιέργειας και ενός μικρού ζωικού προτύπου, εμποδίζοντας τη διεξοδική μελέτη της μορφολογίας και της δομής τους. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν ανασυνδυασμένα συστήματα έκφρασης, τα οποία επιτρέπουν την *in vitro* παραγωγή της πρωτεΐνης του καψιδίου του ιού, η οποία αυτοσυναρμολογείται σε ιικά σωματίδια (Virus like particles- VLPs). Τα ιικά σωματίδια είναι μορφολογικά και αντιγονικά όμοια με τον εγγενή ιό (εικόνα 5) και διατηρούν τις ανοσοποιητικές και αντιγονικές ιδιότητες του (Green *et al.*, 1993; Baric *et al.*, 2002).



Εικόνα 5: Απεικόνιση ιικού σωματιδίου. Το VLP σχηματίζεται από 180 μονομερή της πρωτεΐνης του καψιδίου που συναρμολογούνται μέσω διαφορετικών διμερών. Παρατηρείται με χρωματισμό το A-B διμερές που προεξέχει από το καψίδιο και αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα και τις θέσεις της αντιγονικής ποικιλότητας (Donaldson *et al.*, 2010).

Δύο ανασυνδυασμένα συστήματα έκφρασης που έχουν χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα είναι το *Baculovirus* replicon και το Venezuelan equine encephalitis (VEE) replicon (Jiang *et al.*, 1992). Η χρήση της γενετικής μηχανικής επέτρεψε την έκφραση των περιοχών ORF2 και ORF3 του γονιδιώματος του νοροϊού. Η ανάλυση των προϊόντων αποκάλυψε ότι το ORF2 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 58 kDa η οποία αυτοσυναρμολογείται και σχηματίζει ανασυνδυασμένα σωματίδια όμοια με το φυσικό καψίδιο του ιού Norwalk, καθώς και μία πρωτεΐνη μικρότερου μοριακού βάρους (34 kDa) με αντιγονικές ιδιότητες.

Με τη βοήθεια της Cryo – EM (κρυο – ηλεκτρονική μικροσκοπία), της κρυσταλλογραφίας ακτίνας X και της υπολογιστικής απεικόνισης μελετήθηκε η τρισδιάστατη δομή του ανασυνδυασμένου καψιδίου του ιού Norwalk (Prasad *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1999). Το ιικό καψίδιο συγκροτείται από 180 αντίγραφα της καψιδικής πρωτεΐνης, τα οποία οργανώνονται σε 90 διμερή με μια εικοσαεδρική συμμετρία T=3 (Prasad *et al.*, 1994). Επιπλέον, ευδιάκριτα διμερή ενώνονται και διαμορφώνουν μια υψηλότερη δομή προσδίδοντας στο μόριο το σχήμα κυπέλλου (Prasad *et al.*, 1999).

1.3.4 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΊΚΟΥ RNA

Η αντιγραφή του νοροϊού δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως αλλά πιστεύεται πως η διαδικασία μοιάζει με αυτή που ακολουθούν τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας *Caliciviridae* που διαθέτουν θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA. Το ισωματίδιο αλληλεπιδρά με το κύτταρο-ξενιστή, εισέρχεται στο κύτταρο. Η αλληλεπίδραση με τον ξενιστή, πιθανόν, επιτυγχάνεται μέσω αναγνώρισης του ειδικού για τον ιό υποδοχέα, στην οποία συμμετέχουν κυτταρικοί υδρογονάνθρακες (Tan and Jiang, 2010). Οι ανθρώπινοι νοροϊοί συνδέονται με ειδικούς υδατανθρακικούς υποδοχείς HBGAs μέσω της υπομονάδας P2 της VP1. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση μεταξύ της VP1 και του HBGA δεν είναι αρκετή για την είσοδο του νοροϊού στον ξενιστή και πιθανολογείται η συμμετοχή μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης ως υποδοχέας ή συνυποδοχέας (Tan and Jiang, 2010).

Ακολουθεί η απέκδυση και το RNA ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-RNA μεταξύ της ιικής πρωτεΐνης VPg και των κυτταρικών παραγόντων έναρξης της μετάφρασης (eIFs) συμπεριλαμβανομένου του eIF4E, θεωρούνται απαραίτητες για την έναρξη της μετάφρασης του εισερχόμενου mRNA (Daughenbaugh *et al.*, 2003; Daughenbaugh *et al.*, 2006). Η ORF1 μεταφράζεται και παράγεται η μη δομική πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια υφίσταται πρωτεολυτικό διαχωρισμό από την 3C πρωτεάση (Sosnovtsev *et al.*, 2006).

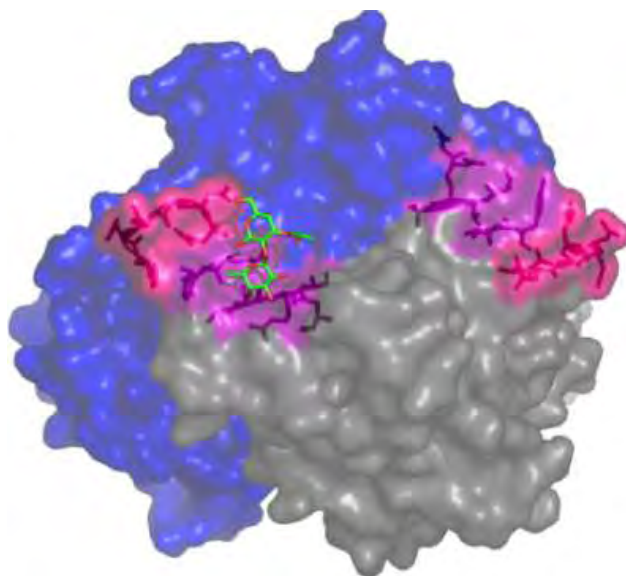
Για την αντιγραφή του RNA, το γενωμικό RNA λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση του RNA αρνητικής πολικότητας όπου το 3' άκρο του RNA θετικής πολικότητας ενισχύεται μέσω αλληλεπίδρασης με κυτταρικές πρωτεΐνες. Το νεοσυντιθέμενο RNA αρνητικής πολικότητας χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη μεταγραφή γενωμικού και υπογενωμικών RNA. Η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, η οποία κωδικοποιείται από την ιική πολυπρωτεΐνη καταλύει τις αντιδράσεις της μεταγραφής. Η άφθονη σύνθεση υπογενωμικών RNA συγκριτικά με του γενωμικού εξυπηρετεί τη σύνθεση των δύο δομικών πρωτεϊνών VP1 και VP2.

Τα τελικά στάδια της αντιγραφής του ιού: η συναρμολόγηση του ιικού σωματιδίου, η ωρίμανση και η απελευθέρωση του από το κύτταρο ξενιστή, δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά.

1.4 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΥ-ΞΕΝΙΣΤΗ

Υπάρχουν δυο αναγνωρισμένοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντίσταση στη μόλυνση από νοροϊό, οι γενετικοί παράγοντες και η επίκτητη ανοσία. Ο ρόλος της γενετικής αντίστασης αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά πριν από 30 χρόνια, όπου πειραματικές μελέτες για τον *Norwalk* ιό έδειξαν ότι οι συμμετέχοντες ήταν ευαίσθητοι ή ανθεκτικοί στην εκδήλωση συμπτωμάτων μετά από επαναλαμβανόμενη προσβολή από τον ιό (Parrino *et al.*, 1977).

Τα ιικά σωματίδια του *Norwalk* ιού, αποδείχτηκε ότι προσδένονται (εικόνα 6) στους υδατανθρακικούς υποδοχείς HBGAs (Histoblood Group Antigens). Τα HBGAs είναι σύμπλοκα υδατανθράκων που συνδέονται με πρωτεΐνες ή λιπίδια στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων και στο επιθήλιο του βλεννογόνου του αναπνευστικού, ουρογεννητικού, πεπτικού συστήματος, ή εντοπίζονται ως ελεύθεροι ολιγοσακχαρίτες σε βιολογικά υγρά όπως το γάλα και το σάλιο. Η ικανότητα των νοροϊών να προσδένονται στους HBGAs υποδοχείς, πιθανολογείται ότι καθορίζεται από ειδικά αμινοξέα, τα οποία εντοπίζονται στην P2 υποπεριοχή του καψιδίου



Εικόνα 6: Η δομή της P περιοχής ενός καψιδίου *GII.4* σε σύνδεση με τον υποδοχέα. Για κάθε A:B διμερές που αλληλεπιδρά, υπάρχουν δύο πανομοιότυπες περιοχές σύνδεσης που διαμορφώνονται από δύο ευδιάκριτες περιοχές στην εκτεθειμένη επιφάνεια. Η περιοχή 1 (μωβ), αλληλεπιδρά άμεσα με την ομάδα της φουκόζης του B-τριμερούς, διαμορφώνοντας ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου. Η περιοχή 2 (ροζ), παρέχει τις απομακρυσμένες αλληλεπιδράσεις, που σταθεροποιούν τη δέσμευση (Cao *et al.*, 2007).

Το μοντέλο πρόσδεσης των σωματιδίων στα HBGAs σχετίζεται με την ευαισθησία στη μόλυνση και στην ασθένεια (Lindesmith *et al.*, 2003). Τα ιικά σωματίδια του *Norwalk*, για παράδειγμα, δεν προσδέουν καλά *in vitro* στον τρισακχαρίτη της ομάδας αίματος B και τα άτομα που εκφράζουν το αντιγόνο της ομάδας B είναι λιγότερο πιθανό να νοσήσουν από τον ιό. Για τη σύνθεση των HBGAs είναι απαραίτητος ένας αριθμός ενζύμων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται η τρανσφεράση της φουκόζης 2 (FUT-2, secretor enzyme), το ένζυμο Lewis (FUT-3) και τα ένζυμα A και B. Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα μπορούν να τα καταστήσουν μη λειτουργικά, αλλάζοντας την έκφραση των HBGAs στην επιφάνεια του βλεννογόνου.

Το ένζυμο FUT-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία στη μόλυνση από νοροϊό, με αποτέλεσμα άτομα που δε διαθέτουν το λειτουργικό αυτό ένζυμο να είναι ανθεκτικά στη μόλυνση από GI.1, GII.3 και κυρίως GII.4 ιούς. Η παρατήρηση αυτή, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η γλυκάνη (Η τύπου 1) που παράγει το ένζυμο λειτουργεί ως ιικός υποδοχέας του *Norwalk*. Ωστόσο, όλα τα στελέχη των νοροϊών δεν εξαρτώνται από το ένζυμο FUT-2. Ο ιός *Snow Mountain*, ο οποίος αποτελεί GII.2 στέλεχος μπορεί να μολύνει άτομα στα οποία δεν εκφράζεται το ένζυμο FUT-2 (Lindesmith *et al.*, 2005). Ομοίως και ένας ιός GI.3 (Nordgren *et al.*, 2010). Το πρότυπο πρόσδεσης των νοροϊών στα HBGAs ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών γενότυπων (Shirato *et al.*, 2008) καθώς και μεταξύ των στελεχών του ίδιου γενότυπου (Lindesmith *et al.*, 2008). Με βάση την παραπάνω παρατήρηση είναι πιθανό ότι κάθε άτομο είναι γενετικά ευάλωτο σε ένα ή περισσότερους γενότυπους νοροϊών.

Η επίκτητη ανοσία αποτελεί το δεύτερο μηχανισμό μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η ανθεκτικότητα στη μόλυνση από νοροϊό. Άτομα που έχουν ήδη μολυνθεί από ένα στέλεχος και έχουν εκδηλώσει συμπτώματα, σε περίπτωση επανέκθεσής τους στο ίδιο στέλεχος σε διάστημα 6-14 εβδομάδων δεν εκδηλώνουν την ασθένεια (Parrino *et al.*, 1977). Η ανοσία δεν είναι μακράς διάρκειας και συμπτωματική νόσος είναι δυνατό να εκδηλωθεί σε περίπτωση επανέκθεσης στο ίδιο στέλεχος 2-3 χρόνια αργότερα. Η ανοσία εμφανίζει ειδικότητα ως προς το στέλεχος και έκθεση σε ορολογικά διακριτό στέλεχος οδηγεί σε συμπτωματική νόσο. Ο ακριβής τρόπος που επιτυγχάνεται η ανοσία δεν έχει ακόμη καθοριστεί. Ωστόσο, έχει προταθεί η δράση ενός αντισώματος το οποίο μπλοκάρει την πρόσδεση του ιικού σωματιδίου στους υδατανθρακικούς υποδοχείς HBGAs. Υψηλά επίπεδα αντισωμάτων έχουν συσχετιστεί με μειωμένη

πιθανότητα μόλυνσης, ενώ αντίστοιχες μελέτες συσχέτισαν τη χαμηλή συχνότητα μόλυνσης με την απουσία αντισωμάτων. Το παραπάνω παράδοξο μπορεί να εξηγηθεί ως εξής: χαμηλά επίπεδα αντισωμάτων σε άτομα γενετικά ανθεκτικά σε συγκεκριμένο στέλεχος και υψηλότερα επίπεδα σε άτομα τα οποία πρόσφατα μολύνθηκαν από ένα σχετικό στέλεχος.

1.5 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Οι γνώσεις γύρω από την παθογένεια του νοροϊού είναι περιορισμένες λόγω της έλλειψης συστήματος κυτταροκαλλιέργειας και ενός κατάλληλου μικρού ζωικού προτύπου. Προέρχονται, κυρίως, από φυσικές, ιστολογικές και βιοχημικές μελέτες εθελοντών.

Ο εμετός και η διάρροια είναι δύο κοινά συμπτώματα της ασθένειας από νοροϊό και πιο ειδικά, της οξείας γαστρεντερίτιδας. Η διάρροια μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές αιτίες, όπως η εισροή ανιόντων μέσα στον αυλό ή η διαταραχή της πέψης παραγόντων όπως οι δισακχαρίτες. Η αλλαγή της κίνησης των ιόντων μπορεί να συμβαίνει είτε μέσω μεταφορέων είτε μέσω πλευρικών χώρων μεταξύ των κυττάρων που καθορίζονται από ισχυρούς συνδέσμους. Η ιϊκή 3C πρωτεάση, η οποία συμμετέχει στη μετάφραση του ξενιστή, πιθανόν ευθύνεται για την αλλαγή στην ισορροπία των ιόντων. Συνεπώς, η αναστολή της μετάφρασης θα μπορούσε να επηρεάσει τα ποσοστά αυτών των ρυθμιστών της ομοιόστασης του εντέρου (Rocha-Pereira and Nascimento, 2012).

Ο νοροϊός πιστεύεται ότι μολύνει κύτταρα του άνω τμήματος του λεπτού εντέρου, ωστόσο ο ακριβής στόχος δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Προτάθηκε η μόλυνση δενδρικών κυττάρων από τον ανθρώπινο GI ιό. Οι Marionneau *et al*, χρησιμοποιώντας ιικά σωματίδια και τμήματα εντερικών ιστών, απέδειξαν ότι οι νοροϊοί προσδένονται, κυρίως, στις εντερικές λάχνες και λιγότερο στις κρύπτες (Marionneau *et al.*, 2002). Τέλος, οι Troeger *et al* (2009) παρατήρησαν αυξημένη έκκριση ανιόντων και ανοσοποιητική διείσδυση CD8+ λεμφοκυττάρων σε περιστατικά μόλυνσης από τον ιό.

Το σύμπτωμα του εμετού προκαλείται από ερεθίσματα στο αντίστοιχο κέντρο του προμήκη μυελού. Μελέτες εθελοντών έδειξαν την απουσία αλλοιώσεων στο γαστρικό

βλεπνογόνο μολυσμένων ατόμων, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην έκκριση υδροχλωρικού οξέος, πεψίνης ή ενδογενών παραγόντων.

1.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η κύρια πορεία μετάδοσης των νοροϊών είναι μέσω της στοματικής και γαστρεντερικής οδού, αν και έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις μετάδοσης μέσω της αναπνευστικής οδού. Η μόλυνση των τροφών, του νερού ή οι φομίτες και η άμεση εξάπλωση από άτομο σε άτομο έχουν ενοχοποιηθεί για κρούσματα γαστρεντερίτιδας από το νοροϊό. Κύριοι γενότυποι είναι πιθανό να σχετίζονται με συγκεκριμένες πορείες μετάδοσης. Τα στελέχη GII.4 συνδέονται κυρίως με μετάδοση του ιού μεταξύ ατόμων, ενώ στελέχη GI έχουν αναγνωρισθεί πιο συχνά σε κρούσματα που οφείλονται σε μαλάκια και οστρακοειδή (Atmar, 2010).

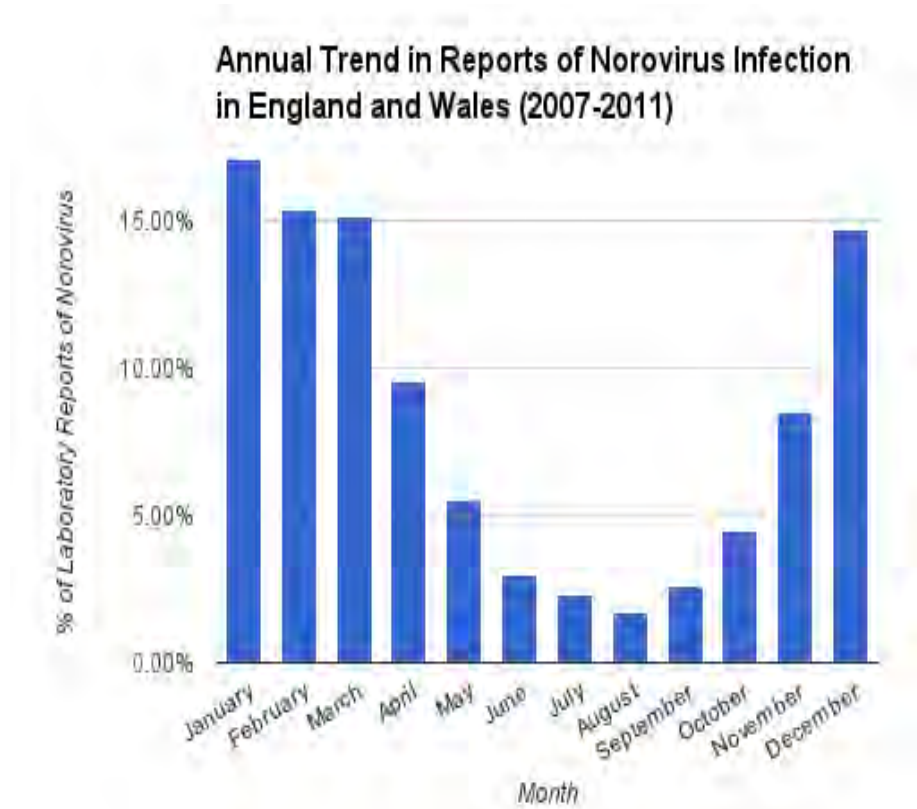
Ο ιός παρουσιάζει χαμηλή μολυσματική δόση (Glass *et al.*, 2009). Για τον ιό Norwalk εντοπίστηκαν μεταξύ 18 και 1000 ιικών μορίων, ενώ μεγαλύτερος αριθμός εντοπίστηκε σε περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας όπου εμπλέκονται μαλάκια (Teunis *et al.*, 2008). Η χαμηλή μολυσματική δόση επιτρέπει τη μετάδοση του ιού από άτομο σε άτομο πριν την εκδήλωση των συμπτωμάτων ή μέχρι και 3 εβδομάδες μετά την παύση των συμπτωμάτων (Atmar, 2010).

Οι νοροϊοί ευθύνονται για το 47-96% των κρουσμάτων οξείας γαστρεντερίτιδας και για το 5-36% των σποραδικών περιπτώσεων οξείας γαστρεντερίτιδας ανά τον κόσμο (Atmar, 2010).

Η δευτερογενής μετάδοση της μόλυνσης είναι κοινή σε συχνότητα μεγαλύτερη του 30%, επιτρέποντας την ενίσχυση της νόσου, ειδικά σε κλειστά περιβάλλοντα. Τέτοια κρούσματα εντοπίζονται συνήθως σε ιδρύματα υγειονομικής περίθαλψης (νοσοκομείο, γηροκομείο) και σε κρουαζιερόπλοια (Verhoef *et al.*, 2008). Στις περιπτώσεις αυτές απαιτείται αποκλεισμός του χώρου για εκτενέστερο καθαρισμό και απολύμανση, καθώς οι νοροϊοί εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις κοινές απολυμαντικές μεθόδους.

Οι νοροϊοί προκαλούν την ασθένεια σε όλη τη διάρκεια του έτους, αλλά σε εύκρατα κλίματα υπάρχει διακριτή εποχικότητα και εκδήλωση της νόσου κατά τους χειμερινούς μήνες. Κατά τη διάρκεια 21 χρόνων πραγματοποιήθηκαν 12 μελέτες σε 8 χώρες και έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης της νόσου ήταν χαμηλότερη κατά

τους χειμερινούς μήνες τόσο για σποραδικές περιπτώσεις όσο και για επιδημίες. Οι Lorman *et al.* (2003) έδειξαν ότι μείωση της θερμοκρασίας και της υγρασίας είναι δυνατό να αυξήσει τη συχνότητα των κρουσμάτων από νοροϊό. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Αγγλία και στην Ουαλία το χρονικό διάστημα 1995-2002, παρατηρήθηκε έξαρση της νόσου το καλοκαίρι του 2002, ωστόσο αποτελεί ένα σπάνιο περιστατικό (Rocha-Pereira and Nascimento, 2012).



Εικόνα 7: Στο γράφημα παρατηρείται ο μηνιαίος μέσος όρος εργαστηριακών αναφορών για νοροϊό στην Αγγλία και Ουαλία, το χρονικό διάστημα 2007-2011 (πηγή: <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/Norovirus/EpidemiologicalData/norovDataEwAge>)

Η έξαρση των μολύνσεων από νοροϊό κατά τους χειμερινούς μήνες (Εικόνα 7) εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, η ανοσία του πληθυσμού και η εμφάνιση νέων παραλλαγών του ιού. Στα στελέχη GII.4 οφείλονται τα αυξημένα ποσοστά κατά τους χειμερινούς μήνες. Αντίθετα, τα στελέχη GI δεν εμφανίζουν την ίδια εποχικότητα, γεγονός που οφείλεται στο ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα στο περιβάλλον. Οι GI νοροϊοί έχουν εντοπιστεί σε υγρά

απόβλητα σε χαμηλή αλλά, ωστόσο, σταθερή συγκέντρωση όλη τη διάρκεια του χρόνου (Rocha-Pereira and Nascimento, 2012).

Οι νοροϊοί της γενετικής ομάδας II αποτελούν τα κυρίαρχα παθογόνα στελέχη παγκοσμίως τουλάχιστον για τα 15 τελευταία χρόνια. Ανάμεσα σε αυτά, τα κυρίαρχα στελέχη είναι αυτά με γενότυπο GII.4, ενώ παρατηρείται αυξανόμενος αριθμός κρουσμάτων τα οποία συμπίπτουν με την εμφάνιση νέων παραλλαγών. Η πανδημία που τα στελέχη GII.4 προκαλούν, αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 90. Κατά τη διάρκεια του 1995-1996, το στέλεχος US95/96 αποτέλεσε αιτία για το 55% των κρουσμάτων στις Ηνωμένες Πολιτείες και για το 85% των κρουσμάτων στις Κάτω Χώρες. Μεταξύ του 2000 και του 2004, το στέλεχος US95/96 είχε αντικατασταθεί από δύο GII.4 νέες παραλλαγές. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το στέλεχος Farmington Hills συνδέθηκε τελικά με το 80% των κρουσμάτων οξείας γαστρεντερίτιδας (Donaldson *et al.*, 2008).

Η εμφάνιση νέων παραλλαγών είναι ανάλογη με αυτή των ιών της γρίπης, υποδηλώνοντας ότι η ανοσία του πληθυσμού πιθανόν υποκινεί την εξέλιξη των GII.4 ιών (Siebenga *et al.*, 2009). Παρόμοιο φαινόμενο γενετικής παρέκκλισης περιγράφηκε και για τα GII.2 στελέχη, αλλά μόνο για μη ανασυνδυασμένα στελέχη (Iritani *et al.*, 2008). Όσον αφορά στους υπόλοιπους γενότυπους των νοροϊών δεν έχει αποσαφηνιστεί εάν συμβαίνει αντιγονική παρέκκλιση.

Στην Ελλάδα οι ιογενείς επιδημίες γαστρεντερίτιδας επιτηρούνται μέσω του Συστήματος Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων (ΣΥΔΝ). Συνολικά, το διάστημα 2004-2012 δηλώθηκαν 36 επιδημίες που αποδόθηκαν σε ιό (πίνακας 1). Η πλειοψηφία αυτών των επιδημιών αποδόθηκε στον αναγραφόμενο αιτιολογικό παράγοντα μετά από εργαστηριακό έλεγχο κλινικών δειγμάτων. Σημειώνεται ότι, προκειμένου ο αιτιολογικός παράγοντας να επιβεβαιωθεί σε μια τροφιμογενή ή υδατογενή επιδημία, απαιτείται ανεύρεση του ίδιου παθογόνου σε κλινικά δείγματα και σε συγκεκριμένα τρόφιμα ή νερό. Από τον ακόλουθο πίνακα προκύπτει ότι συνήθως οι επιδημίες αυτές είναι μεγάλης έκτασης, με ήπια συμπτώματα και γρήγορη ανάρρωση. Η πλειονότητα των επιδημιών προκλήθηκε από νοροϊό.

Πίνακας 1: Δηλωθείσες επιδημίες ιογενούς αιτιολογίας με τουλάχιστον 10 κρούσματα. Ελλάδα 2004-2012 (www.keelpno.gr)

Έτος	Περιφέρεια	Αριθμός κρουσμάτων	Αριθμός νοσ/μενων	Αριθμός θανάτων	Απιολογικός παράγοντας*
2005	Πελ/νήσου	38	38	0	νοροϊός
2005	Αν.σ. Μακεδονίας/Θράκης	702	0	0	νοροϊός
2006	Αν.σ. Μακεδονίας/Θράκης	721	0	0	νοροϊός
2007	Θεσσαλίας	37	10	0	νοροϊός
2010	Ν. Αιγαίου	200	0	0	νοροϊός
2010	Θεσσαλίας	124	1	0	νοροϊός
2010	Ν. Αιγαίου	166	37	0	νοροϊός
2010	Β. Αιγαίου	64	0	0	νοροϊός
2011	Αττικής	36	18	0	νοροϊός
2012	Αττικής	63	-	0	νοροϊός
2012	Κεντρικής Μακεδονίας	80	1	0	νοροϊός
2012	Θεσσαλίας	986	-	0	ροταϊός
2012	Δυτικής Μακεδονίας	23	17	0	ροταϊός

1.7 ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ-ΓΕΝΟΤΥΠΩΝ

Οι γενετικές ομάδες GI και GII του νοροϊού αναγνωρίζονται σήμερα ως οι κυρίως υπεύθυνες για την πρόκληση επιδημιών και σποραδικών κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας από τον ιό, με την ομάδα GII να είναι η επικρατέστερη. Η επικράτησή της δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά έχουν διατυπωθεί κάποιες υποθέσεις. Στη γενετική ομάδα GII η περιοχή P είναι μεγαλύτερη από ότι στη γενετική ομάδα GI, χαρακτηριστικό που πιθανόν της επιτρέπει να μεταλλάσσεται πιο συχνά και να εξελίσσεται πιο γρήγορα. Καθίσταται έτσι ικανή να δημιουργεί νέα

στελέχη και να διαφεύγει από την ανοσία του γενικού πληθυσμού. Ιδιαίτερα μεγάλη διασπορά εμφανίζει ο γενότυπος GII.4.

Ο γενότυπος GII.4, ο οποίος βρέθηκε ότι προκαλεί συχνότερα λοίμωξη παγκοσμίως έχει συγκεντρώσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τον καθορισμό των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων του. Η ανάλυση της ακολουθίας και η μοριακή φυλογενετική ανάλυση των στελεχών του GII.4, έχουν δείξει ότι μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω σε υποομάδες, όπου η κάθε μία σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο πανδημικό κρούσμα (Lindesmith *et al.*, 2008). Αυτές οι υποομάδες, περιλαμβάνουν την υποομάδα Camberwell, στην οποία υπάγονται οι ιοί που απομονώθηκαν από το 1987 ως το 1995, την Grimsby 1995 - 2002, την Farmington Hills 2002 - 2004, την Hunter 2004 – 2006, την Sakai 2004 - 2006 και την υποομάδα Minerva η οποία έχει πρόσφατα οριστεί περιλαμβάνοντας ιούς που ανιχνεύτηκαν από το 2006 και μετά. Καθώς η υποομάδα Camberwell θεωρείται ως η αρχική, δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί εάν οι ιοί της GII.4 προέκυψαν κατά την δεκαετία του '80 ή ήταν ενδημικοί στους ανθρώπινους πληθυσμούς και προγενέστερα. Αναλύσεις των φυλογενετικών δέντρων της GII.4 των βορειών έδειξαν ότι οι ιοί αυτοί εξελίχθηκαν όντως μέσω της εξέλιξης και πως μερικές υποομάδες τους διατηρήθηκαν για αρκετά έτη (Lindesmith *et al.*, 2008; Siebenga *et al.*, 2007).

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση σχετικά με τη συμπεριφορά του ιού για τη μολυσματικότητά του και, πιθανόν, την παθογένεια της νόσου είναι η εξής: όταν εμφανίζεται ένας νέος υπότυπος του, αυτός είναι συχνά και ο υπεύθυνος του μεγαλύτερου ποσοστού των επιδημιών. Η εμφάνιση νέων στελεχών σχετίζεται με την αύξηση της συχνότητας της λοίμωξης. Για την πανδημική διασπορά του γονότυπου GII.4, έχει διατυπωθεί μία γενετική υπόθεση η οποία έχει ως βάση τις αντιγονικές παραλλαγές των στελεχών του στο σημείο σύνδεσης με τους υποδοχείς του. Η γενετική αυτή εξέλιξη του ιού υποδεικνύει τον πιθανό μηχανισμό επικράτησης του γονότυπου GII.4.

Σε χαρτογράφηση που πραγματοποιήθηκε στη δομή του στελέχους VA387 της GII.4 των βορειών, για την μελέτη της ποικιλομορφίας μεταξύ των υποομάδων αποδείχτηκε, ότι ένα μεγάλο μέρος της ποικιλομορφίας μεταξύ αυτών βρίσκεται μέσα ή κοντά στις περιοχές δέσμευσης. Από τις παρατηρήσεις αυτές, προέκυψε η υπόθεση ότι, οι μεταβλητές περιοχές επιτρέπουν σε διαφορετικούς ιούς της GII.4 υποομάδας να παρακάμψουν την ανθρώπινη άνοση απάντηση αλλάζοντας τις περιοχές

αναγνώρισης των αντισωμάτων. Τέλος, σε πιο πρόσφατη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι η GII.4 ομάδα μπορεί και εξελίσσεται κατά την διάρκεια της ανοσοποιητικής απάντησης.

1.8 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

Τα συμπτώματα της μόλυνσης από νοροϊό και ειδικότερα, η γαστρεντερίτιδα περιλαμβάνουν ναυτία, εμετό και διάρροια, και μερικές φορές συνοδεύονται από πονοκέφαλο, χαμηλό πυρετό και μυϊκό πόνο (Nordgren *et al.*, 2010).

Οι νοροϊοί μολύνουν άτομα όλων των ηλικιών. Το πιο συχνό σύμπτωμα στα παιδιά είναι ο εμετός, ενώ μεταξύ των ενηλίκων η διάρροια. Η περίοδος επώασης ποικίλει από 12 ως 50 ώρες και η ασθένεια είναι γενικά αυτοπεριοριζόμενη με συμπτώματα που αποχωρούν στις 12-72 ώρες. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις τα συμπτώματα διαρκούν περισσότερο, ειδικά, σε παιδιά, σε ηλικιωμένους και σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Rocha-Pereira and Nascimento, 2012). Δυστυχώς, η πραγματική νοσηρότητα καθώς και τα ποσοστά θνησιμότητας που προκύπτουν μετά από τις μολύνσεις του ιού στους πληθυσμούς υψηλού κινδύνου παραμένουν ακαθόριστα, καθώς επίσης και ο αντίκτυπος της μόλυνσης του ιού σε νήπια και στα παιδιά στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Ο GII.4 νοροϊός, αναλογικά με τους υπόλοιπους γενότυπους, έχει συσχετιστεί με πολλά σοβαρά επεισόδια οξείας γαστρεντερίτιδας σε βρέφη, τα οποία εμφανίζουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα διάρροια (Huhti *et al.*, 2011).

Η μετάδοση του ανθρώπινου νοροϊού γίνεται από άτομο σε άτομο, μπορεί να είναι τροφιμογενής και υδατογενής (Εικόνα 8).

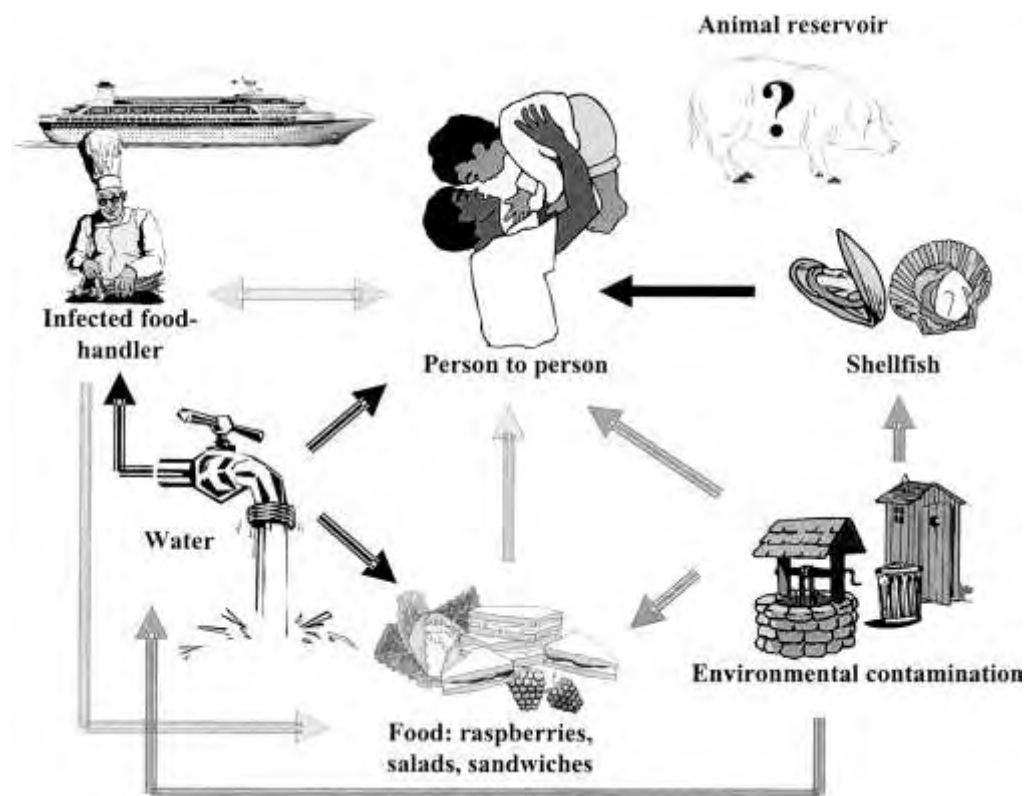
Η μετάδοση από άτομο σε άτομο γίνεται άμεσα μέσω της κοπρανοστοματικής οδού ή του σχηματισμού αερολυμάτων από τον εμετό (ρουκετοειδής έμετος) και έμμεσα μέσω επαφής με μολυσμένες περιβαλλοντικές επιφάνειες.

Η τροφιμογενής μετάδοση λαμβάνει χώρα μέσω μολυσμένων τροφίμων. Περιπτώματα είναι δυνατόν να μολύνουν τις τροφές κατά τη διάρκεια παραγωγής τους. Μόλυνση των οστρακοειδών μπορεί να λάβει χώρα πριν τη συγκομιδή, όπως και των βατόμουρων. Η συγκομιδή των μολυσμένων καρπών πιθανόν οφείλεται στην άρδευση με μολυσμένο από περιττώματα νερό, στη μετάδοση του ιού μέσω ήδη μολυσμένων εργατών (Falkenhorst *et al.*, 2005). Άλλες τροφές όπως τα αλλαντικά

και οι σαλάτες μολύνονται και στο χώρο προετοιμασίας τους από μολυσμένους χειριστές (Malek *et al.*, 2005).

Επιπλέον, το νερό μπορεί να αποτελέσει όχημα μετάδοσης του νοροϊού με αποτέλεσμα την εκδήλωση κρουσμάτων σε μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού (Yoder *et al.*, 2004; 2008). Τέτοιας έκτασης κρούσματα σχετίζονται και με νερό που έχει μολυνθεί από σηπτική διαρροή δεξαμενής, από ακαθαρσίες υπονόμων (Beller *et al.*, 1997), ή από προβλήματα στα συστήματα χλωρίωσης (Kukkula *et al.*, 1999).

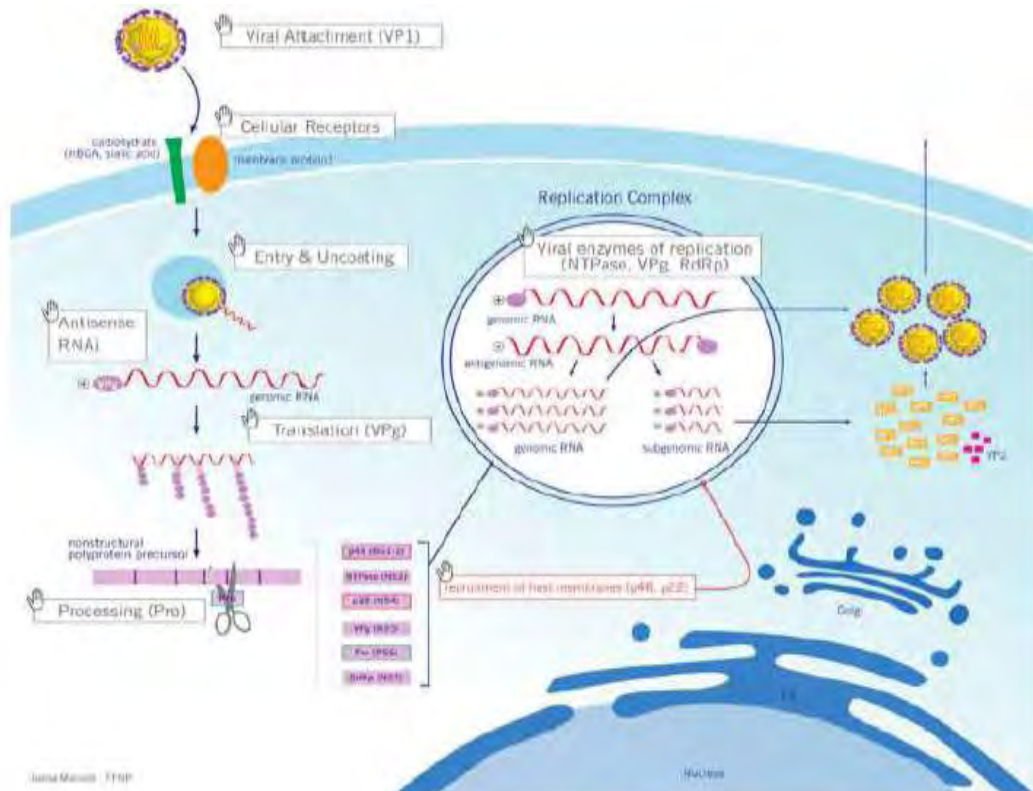
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί και η περίπτωση των ζωνοσώων. Οι *caliciviruses* είναι σημαντικά παθογόνα στα ζώα όπως και στους ανθρώπους. Πρόσφατες ανακαλύψεις έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην πιθανότητα μετάδοσης μεταξύ των ζώων. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, ο μοριακός χαρακτηρισμός των *caliciviruses* των βοοειδών απέδειξε ότι είναι περισσότερο όμοιοι με τους ανθρώπινους νοροϊούς από ότι με τους ζωικούς. Επιπλέον, αυτοί οι ιοί προκαλούν διάρροια σε νεογέννητα μοσχάρια κάτω από πειραματικές συνθήκες (Liu *et al.*, 1999).



Εικόνα 8 :Απεικόνιση του τρόπου μετάδοσης των νοροϊών (Lindesmith *et al.*, 2008).

1.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει ειδική αντική θεραπεία έναντι του νοροϊού. Η περιορισμένη διαθέσιμη πληροφορία για την οργάνωση του γονιδιώματος του ιού, τις λειτουργίες των δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών, την αντιγραφή και την αλληλεπίδραση ιού και ξενιστή μπορούν να αποτελέσουν ενδεχόμενους στόχους και στρατηγικές που αναστέλλουν τον κύκλο ζωής των νοροϊών (εικόνα 9).



Εικόνα 9 :Στοχεύοντας (με το χεράκι) τα βήματα της αναπαραγωγής του ιού (Rocha-Pereira and Nascimento, 2012).

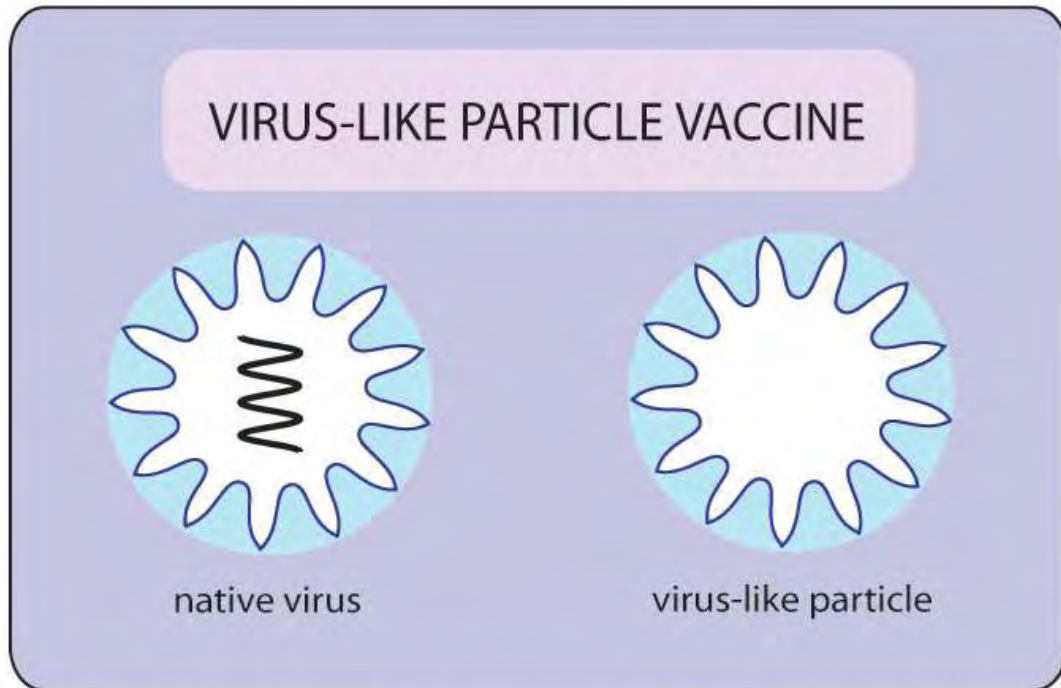
Οι έρευνες οι οποίες οδήγησαν στην ανακάλυψη ότι ο ιός αναγνωρίζει ως ειδικούς υποδοχείς σύνδεσης του με τον ξενιστή τα αντιγόνα των συστημάτων HBGAs και στη διευκρίνιση της δομής και της λειτουργίας του καψιδίου του ιού στα σημεία αυτά, ίσως οδηγήσουν την ανεύρεση αντικών φαρμάκων, τα οποία θα παρεμποδίσουν αυτή τη σύνδεση (Tan and Jiang, 2007). Τα αντικά φάρμακα θα μπορούν να είναι είτε συνθετικά, είτε φυσικά προϊόντα με δομή πανομοιότυπη με τους υποδοχείς του ιού. Τα αντικά φάρμακα θα μπορούν να λειτουργούν είτε συνδεδεμένα με τα ιικά σωματίδια, είτε ανταγωνιζόμενα αυτά στα σημεία σύνδεσης με

τους υποδοχείς. Ωστόσο, το εντερικό επιθήλιο είναι μεγάλο σε έκταση και τα αντιγόνα των συστημάτων HBGAs αφθονούν, με αποτέλεσμα το φάρμακο να δυσκολεύεται να μπλοκάρει όλα τα σημεία σύνδεσης. Επίσης, το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου είναι ένα σύνθετο περιβάλλον με πληθώρα παραγόντων, οι οποίοι πιθανόν να παρεμβαίνουν στην αλληλεπίδραση ιού και ξενιστή. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό πως το αντικό φάρμακο θα πρέπει να έχει μεγάλη σταθερότητα και ισχυρή χημική συγγένεια με τα σημεία σύνδεσης (Tan and Jiang, 2007).

Μία άλλη πιθανή εναλλακτική λύση ειδικής αντικής θεραπείας είναι η παραγωγή ειδικών αντισωμάτων. Πρόκειται για αντισώματα που δρουν έναντι του ιού και είναι πολύ αποτελεσματικά στο να αναστέλλουν τη σύνδεση ιού-υποδοχέα. Η προσέγγιση αυτή είναι δυνατό να υποστηριχτεί λόγω της ταχείας προόδου στην τεχνολογία παραγωγής ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων (Tan and Jiang, 2007). Ο σχεδιασμός ενός φαρμάκου, το οποίο θα απομακρύνει τον ιό από τον ξενιστή αποτελεί ακόμη μία πιθανή στρατηγική (Bluth *et al.*, 2007).

1.10 ΕΜΒΟΛΙΑ

Η δυσκολία κατανόησης της ανοσίας έναντι του ιού και η αδυναμία καλλιέργειας του, καθυστέρησε την έρευνα σχετικά με την παραγωγή εμβολίου έναντι του νοροϊού, η οποία διαδέχτηκε την παραγωγή ανασυνδυασμένων σωματιδίων που μοιάζουν με τα ιικά (rVLP). Τον Σεπτέμβριο του 2009 παρουσιάστηκε ένα εμβόλιο κατά των νοροϊών, το οποίο δεν θα διατίθεται σε ενέσιμη μορφή, αλλά σε μορφή σκόνης. Η κατασκευή του εμβολίου βασίζεται στα μόρια VLP, που αποτελούν πηγή παραγωγής του καψιδιακού αντιγόνου και σε ένα μονοφωσφορικό λιπίδιο A (Monophosphoryl Lipid A) το οποίο ενισχύει την ρινική λήψη (εικόνα 10). Η πρώτη φάση των δοκιμών ασφαλείας έχει ολοκληρωθεί και τα στοιχεία που προέκυψαν, έδειξαν ότι το εμβόλιο δεν εμφάνισε καμιά σοβαρή επιπλοκή ενώ παρείχε την κατάλληλη ανοσοποίηση. Οι δοκιμές έχουν προγραμματιστεί να συνεχιστούν με μια μελέτη πρόκλησης του οργανισμού από ζωντανούς ιούς, προκειμένου να αξιολογηθεί περαιτέρω η ασφάλεια και η ταχύτητα της προστασίας που παρέχει το εμβόλιο κατά της μόλυνσης από νοροϊούς (www.clinicaltrials.gov), (www.ligocyte.com).



Εικόνα 10: Τα εμβόλια VLP σχεδιάζονται για να μιμηθούν την εξωτερική δομή της πρωτεΐνης έτσι ώστε να προκαλέσουν μια αποτελεσματική άνοση απάντηση. Επειδή τα VLP δεν ενσωματώνουν το ιικό RNA, είναι ανίκανα να αναπαραχθούν στο σώμα και έτσι δεν μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση (www.ligocyte.com).

Η αναπαραγωγή μέσω της γενετικής μηχανικής (σε. *E coli*) μόνο της περιοχής P του καψιδίου και όχι ολόκληρου του rVLP αποτελεί μία εναλλακτική λύση, εύκολη και οικονομική, για τη δημιουργία εμβολίου καθώς η περιοχή αυτή είναι ισχυρά ανοσογόνος και εμπεριέχει το σημείο σύνδεσης με τον υποδοχέα (Tan and Jiang, 2007).

Η ταξινόμηση του ιού με βάση τα μοντέλα σύνδεσης με τα αντιγόνα των συστημάτων HBGAs, θα μπορούσε να βοηθήσει στη δημιουργία εμβολίων αποτελεσματικών έναντι μεγάλου εύρους ιικών στελεχών.

Έτσι, με την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου θα μπορέσει να μειωθεί η συχνότητα της επιδημικής ιικής γαστρεντερίτιδας, γεγονός που θα ωφελήσει κυρίως τα άτομα τα οποία υπάγονται στις ομάδες υψηλού κινδύνου, καθώς και τις αναπτυσσόμενες χώρες όπου οι συνθήκες υγιεινής είναι περιορισμένες (Estes *et al.*, 2000). Όπως συμβαίνει και με το αντιγριπικό εμβόλιο, το μελλοντικά εγκεκριμένο εμβόλιο κατά των νοροϊών θα πρέπει να ανανεώνεται κατά καιρούς.

1.11 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη σύντομη ιστορική διαδρομή της διαγνωστικής προσέγγισης της νόσου, από την εποχή της πρώτης ανίχνευσης του ιού έως σήμερα, έχουν χρησιμοποιηθεί οι ακόλουθες μέθοδοι, οι οποίες παρέχουν την δυνατότητα του προσδιορισμού του ιού: άμεση ηλεκτρονική μικροσκοπία, ανοσοηλεκτρονική μικροσκόπηση, ανοσο-αιμοσυγκολλητικές μέθοδοι, ραδιοανοσολογικές μέθοδοι, ανοσοενζυμικές μέθοδοι, μέθοδοι αποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blot), ανοσοχρωματογραφία και μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση του νουκλεϊκού οξέος του ιού και την ταυτοποίηση των στελεχών του (Atmar and Estes, 2001).

Στις δεκαετίες του 70 και του 80 πρωταρχικό μέσο διάγνωσης αποτέλεσε η ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η τεχνική αυτή, βασίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ιού. Το όνομα *Calicivirus* προέρχεται από την μορφή που εμφανίζουν τα ιικά σωματίδια κατά την παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Treanor and Dolin, 2000). Η μέθοδος εμφανίζει πλέον μικρή ευαισθησία σε σχέση με τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα.

Η ανίχνευση αντιγόνων αποτελεί ακόμη μία μέθοδο διάγνωσης της μόλυνσης από νοροϊό. Εμπορικά Kits που βασίζονται στην ELISA ή σε ανοσοχρωματογραφικές μεθόδους είναι διαθέσιμα. Η μέθοδος ELISA, πραγματοποιείται κάνοντας χρήση υπεράνοσου αντιορού και μπορεί να ανιχνεύσει τον ιό σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση. Η ανίχνευση των ικών αντιγόνων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στο μολυσμένο δείγμα μέσω πολυκλωνικών ή και μονοκλωνικών αντισωμάτων. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου, είναι η χαμηλή ευαισθησία, αναγνωρίζουν περίπου το 32% των σποραδικών περιπτώσεων μόλυνσης από νοροϊό. Η ευαισθησία των τεστ αυτών επηρεάζεται από το γενότυπο του ιού και δεν μπορούν να αναγνωρίσουν μερικούς όχι τόσο κοινούς γενότυπους (Atmar, 2010).

Οι διαγνωστικές δοκιμές πρώτης γενιάς, που έχουν αναπτυχθεί για να ανιχνεύουν μολύνσεις από νοροϊούς, περιλαμβάνουν την ηλεκτρονική μικροσκοπία (άμεση), την ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία (έμμεση) και την άνοση αιμοσυγκόλληση. Η επόμενη γενιά των δοκιμών περιλαμβάνει αυτές που αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση των αντιγόνων των ιών του Norwalk, όπως ο ραδιοανοσοπροσδιορισμός (RIA) και οι ανοσολογικές αντιδράσεις. Τέλος η Western Blot αποτελεί μια ακόμη προσέγγιση για την αξιολόγηση της αντίδρασης των αντισωμάτων σε μολυσμένα άτομα (Atmar and Estes, 2001).

Η γνώση του γονιδιώματος του ιού, επέτρεψε τον σχεδιασμό τεχνικών υβριδοποίησης του νουκλεϊκού οξέος καθώς και δοκιμών όπως η RT-PCR και η Real-Time ποσοτική PCR έτσι ώστε, να καταστεί εφικτή η ανίχνευση του ιού σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Αυτές οι μέθοδοι στοχεύουν συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου της πολυμεράσης, στις περιοχές ORF1/ ORF2. Η RT-PCR αποτελεί την πιο ευαίσθητη διαγνωστική δοκιμή για την ανίχνευση του ιού σε κλινικά δείγματα. Το πλεονέκτημα της είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει τα ιικά μόρια σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (100 ιικών σωματιδίων/ml) ακόμα και μετά το πέρας της οξείας κλινικής μόλυνσης. Επίσης, η ανίχνευση των νοροϊών είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί σε δείγματα τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα στους 4°C και για πολλά χρόνια στους - 70°C (Atmar and Estes, 2001). Ωστόσο, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας της μεθόδου απαιτείται μεγάλη προσοχή έτσι ώστε να αποτραπεί τυχόν μόλυνση του εργαστηρίου ή επιμολύνσεις αρνητικών δειγμάτων, ενώ για την εκτέλεση της μεθόδου είναι απαραίτητος ακριβός εξοπλισμός.

Έτσι, σε επιδημιολογικό επίπεδο, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός στελεχών, τα οποία είναι υπεύθυνα για διάφορα κρούσματα γαστρεντερίτιδας και ταυτόχρονα να αποκαλύψει τυχόν μεταλλάξεις των κυκλοφορούντων νοροϊκών στελεχών.

Τα τελευταία χρόνια, η Real-time RT-PCR επιτρέπει την άμεση εκτίμηση των κλινικών δειγμάτων, την αναγνώριση και ταξινόμηση των νοροϊών σε επίπεδο γενετικών ομάδων (Atmar, 2010).

1.12 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση μέσω μοριακών τεχνικών και αλληλούχισης, στελεχών νοροϊών που ανήκουν στην ομάδα GI, από περιβαλλοντικά δείγματα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

2.1.1 Θετικοί μάρτυρες

Για την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών της διατριβής αυτής, χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα τα οποία στάλθηκαν από την Αγγλία, ως θετικοί μάρτυρες, από επιβεβαιωμένα περιστατικά προσβολής από νοροϊό.

Πίνακας 2: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ I (GI)
GI 1
GI 2
GI 3

2.1.2 Περιβαλλοντικά δείγματα

Τα περιβαλλοντικά δείγματα, λήφθηκαν από βιολογικούς καθαρισμούς του ελλαδικού χώρου. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 30 δείγματα από τους βιολογικούς καθαρισμούς της Λάρισας, των Ιωαννίνων και των Τρικάλων, η κωδικοποίηση των οποίων παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 3).

Πίνακας 3: Κωδικοποίηση και προέλευση των δειγμάτων που εξετάστηκαν

ΟΝΟΜΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ
EIS1	Βιολ.Καθ.Λάρισα /είσοδος	9/7/2009
EIS2	Βιολ.Καθ.Λάρισα /είσοδος	5/8/2009
EIS3	Βιολ.Καθ.Λάρισα /είσοδος	5/8/2009
EIS4	Βιολ.Καθ.Λάρισα /είσοδος	5/8/2009

EIS5	Βιολ.Καθ.Λάρισα /είσοδος	5/8/2009
EIS6	Βιολ.Καθ.Λάρισα /είσοδος	17/6/2009
AB7	Βιολ.Καθ.Λάρισα /Α΄βαθμια	17/6/2009
AB8	Βιολ.Καθ.Λάρισα /Α΄βαθμια	9/7/2009
AB9	Βιολ.Καθ.Λάρισα /Α΄βαθμια	9/7/2009
AB10	Βιολ.Καθ.Λάρισα /Α΄βαθμια	17/6/2009
EX11	Βιολ.Καθ.Λάρισα /έξοδος	17/6/2009
EX12	Βιολ.Καθ.Λάρισα /είσοδος	9/7/2009
AB13	Βιολ.Καθ.Λάρισα /Α΄βαθμια	5/8/2009
EX14	Βιολ.Καθ.Λάρισα /έξοδος	9/7/2009
AB15	Βιολ.Καθ.Λάρισα /Α΄βαθμια	5/8/2009
AB18	Βιολ.Καθ.Λάρισα /Α΄βαθμια	5/8/2009
AB19	Βιολ.Καθ.Λάρισα /Α΄βαθμια	5/8/2009
LR1	Αστικά λύματα	14/7/2005
LR2	Αστικά λύματα	8/9/2005
LR3	Αστικά λύματα	6/10/2005
LR5	Αστικά λύματα	25/5/2006
LR6	Αστικά λύματα	16/6/2006
LR7	Αστικά λύματα	4/7/2006
LR8	Αστικά λύματα	13/7/2006
LR9	Αστικά λύματα	19/7/2006

LR10	Αστικά λύματα	2/8/2006
LR13	Αστικά λύματα	14/2/2007
GN1F	Βιολ. Καθαρισμός Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	21/9/2006
TR3F	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	18/1/2007
TR5	Αστικά λύματα	3/6/2007

2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων έλαβε χώρα με δύο διαφορετικούς τρόπους, την μέθοδο διαχωρισμού δύο φάσεων και την μέθοδο προσρόφησης – έκλυσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα.

2.2.1 Μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων

Αρχικά φυγοκεντρώνονται 500 ml δείγματος στα 1000 rpm για 2 min. Το ίζημα φυλάσσεται στους 4°C, ενώ ρυθμίζεται το pH του υπερκείμενου στο 7 – 7,5. Σε 500ml υπερκείμενου (7 – 7,5 pH) προστίθενται 39,5 ml 22% (W/V) dextran, 287 ml 29% (W/V) PEG6000 και 35ml NaCl 5 M (Sigma, USA). Το μείγμα αναδεύεται για 1 h στους 4°C και στην συνέχεια εισάγεται σε φιάλη διαχωρισμού, όπου και παραμένει στους 4°C για 48 h. Η κάτω φάση, όπου και συγκεντρώνονται τα ικκά σωματίδια, συλλέγεται και προστίθεται χλωροφόρμιο 20% v/v και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 1500 g για 20 min. Η πάνω φάση συλλέγεται σε πλαστικό σωλήνα, όπου και προστίθενται πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε τελικές συγκεντρώσεις 100 units/ml και 100μg/ml αντίστοιχα (WHO 2003). Ακολουθεί περαιτέρω συγκέντρωση του δείγματος με τη μέθοδο καθίζησης με PEG. Σε δείγμα όγκου 500 ml προστίθεται 10% W/V PEG6000 και NaCl (Sigma, USA) σε τελική συγκέντρωση 0,5 M. Το μείγμα αναδεύεται για 18h στους 4°C και ακολούθως

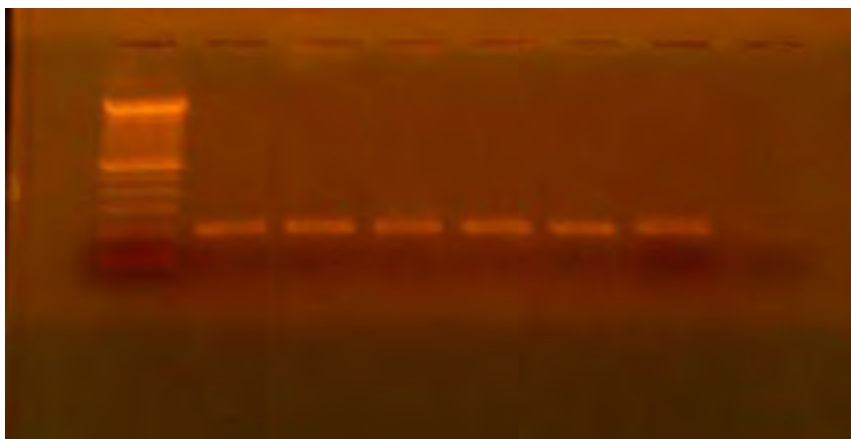
φυγοκεντρείται στις 11.000 rpm για 1h. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται σε 5 ml θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιεργειών (MM).

2.2.2 Μέθοδος προσρόφησης – έκλυσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα

Δείγμα όγκου 500 ml φυγοκεντρείται σε 1000 rpm για 2 min. Το υπερκείμενο συλλέγεται και ρυθμίζεται το pH στο 3,8 με την προσθήκη 3 N HCl. Στη συνέχεια, τα ιικά σωματίδια φορτίζονται θετικά παρουσία Mg^{2+} , με την προσθήκη $MgCl_2^{2+}$ (Merck, Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,05 M. Ακολουθεί αργή ανάδευση και φιλτράρισμα σε ηλεκτραρνητικά φορτισμένο φίλτρο (MF – Millipore), διαμέτρου 47mm και μέγεθος πόρου 3μm, στην επιφάνεια του οποίου προσροφούνται τα ιικά σωματίδια. Το φίλτρο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο δοχείο ζέσεως 250 ml, όπου προστίθενται 10 ml διαλύματος 0,05 M Tris pH 9, εμπλουτισμένου με 3% BSA. Η έκλυση πραγματοποιείται με αργή ανάδευση για 10 min. Αφού απομακρυνθεί το διάλυμα, η διαδικασία της έκλυσης επαναλαμβάνεται. Το φίλτρο φυλάσσεται στους 4⁰C, ενώ ρυθμίζεται το pH του συγκεντρωμένου δείγματος στο 7 με τη χρήση διαλύματος 3 N HCl. Ακολουθεί περαιτέρω συγκέντρωση του δείγματος με τη μέθοδο καθίζησης με PEG. Σε δείγμα όγκου 500 ml προστίθεται 10% W/V PEG6000 και NaCl (Sigma, USA) σε τελική συγκέντρωση 0,5 M. Το μείγμα αναδεύεται για 18h στους 4⁰C και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 11.000 rpm για 1h. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται σε 5 ml θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιεργειών (MM).

Για την εκχύλιση του ιικού RNA από τα επεξεργασμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το QIAamp® Viral RNA Mini Kit της εταιρείας Quiagen(Germany), ακολουθώντας τα προτεινόμενα συνοδευτικά πρωτόκολλα του κατασκευαστή.

Για την επιβεβαίωση μη ύπαρξης αναστολέων και της σωστής εκχύλισης εφαρμόστηκε μία επιπλέον αντίδραση PCR. Στην αντίδραση αυτή, χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών που έχουν στόχο το 16S rRNA γονίδιο των βακτηρίων, τα οποία συνυπάρχουν μέσα στο εκχυλισμένο δείγμα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι P11P (GAGGAAGGTGGGGATGACGT) και P13P (AGGCCCCGGGAACGTATTCAC) οι οποίοι αντιστοιχούν σε αλληλουχίες κοινές για όλα τα βακτήρια (Εικόνα 11). Το μέγεθος του προϊόντος που ενισχύθηκε ήταν 217 bp.



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά από εκχύλιση με τους εκκινητές P11P και P13P

2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (Reverse Transcription – RT)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι νοροϊοί περιέχουν ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την μετατροπή του σε συμπληρωματικό cDNA, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση PCR, η οποία θα καταστήσει εφικτή την ενίσχυση της περιοχής του γονιδιώματος που μας ενδιαφέρει.

Έτσι, αρχικά ετοιμάζεται το μίγμα το οποίο περιέχει: τυχαίους εκκινητές (random primers) d(N9) (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) (50nmol/μl, 1μl/tube), 10mM δεοξυτριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs, 1μl/tube, Invitrogen, UK) και απιονισμένο νερό (ddH₂O, Sigma, USA) ελεύθερο ριβονουκλεασών (5μl/tube). Σε εppendorf των 500μl προστίθεται 7μl/tube του μίγματος και 5μl του εκχυλισμένου ιικού RNA, ακολουθεί η φυγοκέντρηση και επώαση των εppendorfs στους 65°C για 5min. Μετά την επώαση, τα εppendorfs τοποθετούνται στον πάγο και ετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει 5X first strand Buffer (4μl/tube), 0,1M αντιοξειδωτικό διθειοθρεϊτόλη (DTT, 2μl/tube), αναστολέα ριβονουκλεασών (RNase out, 20units/μl, 0,5μl/tube), ddH₂O και η αντίστροφη μεταγραφή (0,5μl) (Reverse Transcriptase) M-MLV (200units/μl, Invitrogen, UK). Προστίθεται ποσότητα (8μl/tube) από το δεύτερο μίγμα και ακολουθεί φυγοκέντρηση και επώαση αυτών σε τρεις διαδοχικές θερμοκρασίες : 25°C για 10min, 37°C για 50min και 70°C για 15min.

2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

2.5.1 Εκκινητικά μόρια

Στα συμπληρωματικά cDNA τμήματα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της RT, εφαρμόζεται η αντίδραση PCR έτσι ώστε να ενισχυθούν. Τα εκκινητικά μόρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 4)

Πίνακας 4: Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη γενετική ομάδα GI ομάδα

PRIMER	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 5'-3'	Tm	ΘΕΣΗ GI - GII
P78	GGGCCCCCTGGTATAGGTAA	54.3	1682-1701 2C helicase
P80	TGGTGATGACTATAGCATCAGACACAAA	57.9	1943-1970 2C helicase

2.5.2 PCR

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την παρασκευή του μίγματος της αντίδρασης ήταν το ίδιο:

- cDNA (3μl)
- dNTPs 10mM, Invitrogen, UK, (5μl)
- Taq reaction buffer 10x, (5μl)
- Taq DNA πολυμεράση (5u/μl, Paq5000, Strategene, USA), (0,5μl)
- Primers (1μl από τον καθένα σε συγκέντρωση 50pmol), (2μl) και
- ddH₂O (nuclease free), (μέχρι τελικό όγκο 50μl)

Σε ορισμένες αντιδράσεις προστέθηκε επιπλέον MgCl₂ (50mM) ως συνπαράγοντας της Paq DNA Polymerase, έτσι ώστε να ενισχυθεί η ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης.

Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται:

ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του μορίου στόχου, στους 95°C για 2 min και στη συνέχεια

αποδιάταξη στους 95°C για 30 sec

υβριδοποίηση στους 50°C για 30 sec

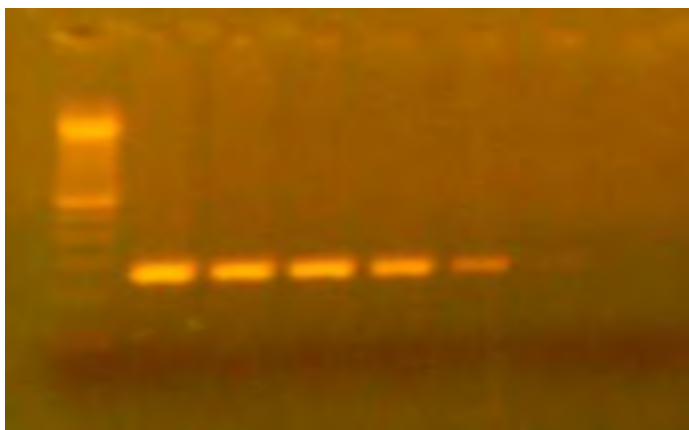
επιμήκυνση στους 70°C για 30 sec

} 25 κύκλοι

Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 5 min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων προϊόντων PCR.

2.5.3 Autonested PCR

Για την περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας της αντίδρασης, εφαρμόστηκε η Autonested PCR. Με την ολοκλήρωση της απλής PCR των 25 κύκλων, το προϊόν αυτής υποβάλλεται, σε μια δεύτερη PCR 40 κύκλων στις ίδιες συνθήκες και με το ίδιο εκκινητικό ζεύγος, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία. Το τελικό προϊόν που ενισχύθηκε είναι 288bp, (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση μετά από Autonested PCR με τους εκκινητές P78 και P80

2.6 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

2.6.1 Καθαρισμός των προϊόντων PCR

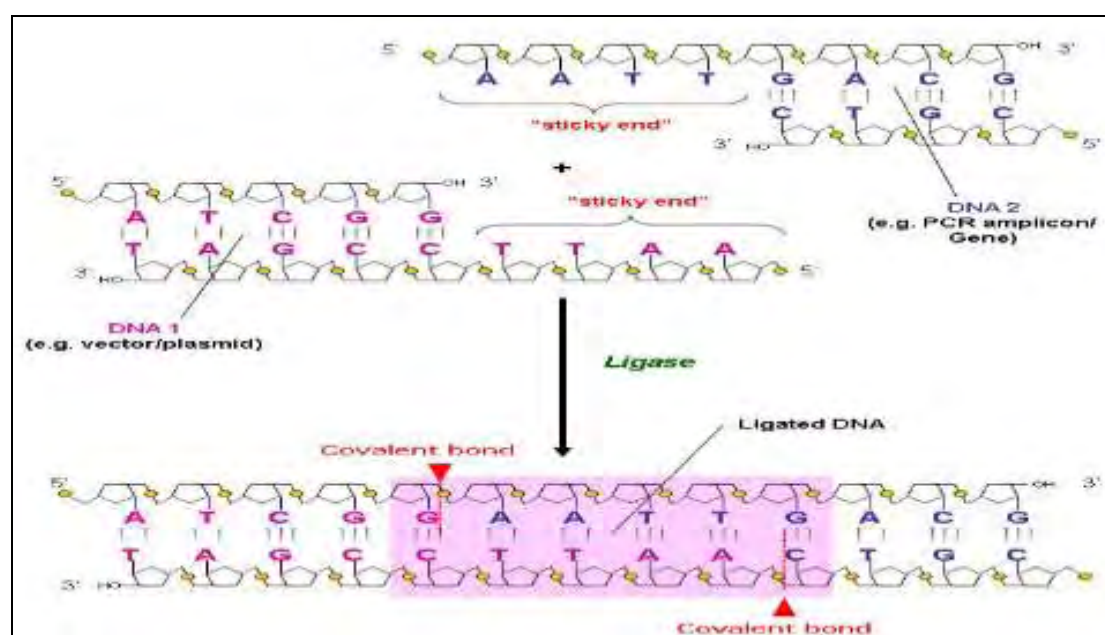
Τα θετικά προϊόντα της κάθε autonested PCR, ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ο προσδιορισμός του μήκους των επιθυμητών προϊόντων πραγματοποιείται με χρήση μάρτυρα μοριακού βάρους, 100bp DNA Ladder, ο οποίος εμφανίζει το μοριακό βάρος της κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100bp. Οι αντίστοιχες ζώνες στα προϊόντα της autonested PCR, απομονώνονται από το πήκτωμα και μεταφέρονται σε αποστειρωμένα tubes των 2 ml. Ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας το QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen, Germany), εφαρμόζοντας το εσωκλειστο, συνιστώμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

2.6.2 Μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων

Η διαδικασία, έλαβε χώρα για την αποφυγή ταυτόχρονης ύπαρξης περισσότερων του ενός στελέχους νοροϊών σε αυτά. Έτσι, κάθε κλώνος μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων που προέκυψε, περιείχε κλωνοποιημένο το γενωμικό τμήμα από μόνο ένα διακριτό στέλεχος. Για την πραγματοποίηση της μοριακής κλωνοποίησης των προϊόντων της autonested GoTaq PCR καθώς και την οπτική επιβεβαίωση της διαδικασίας, ακολουθήθηκαν τέσσερα διαδοχικά βήματα.

A. Αντίδραση λιγάσης

Σκοπός της αντίδρασης αυτής είναι να επιτραπεί η ενσωμάτωση του ενισχυμένου, πλέον, γενωμικού τμήματος σε πλασμίδιο (φορέα κλωνοποίησης). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι ο pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, USA).



Εικόνα 13: Αντίδραση λιγάσης

Ο φορέας αυτός, περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη (polylinker), η οποία περιέχει μία θέση ενσωμάτωσης με μονόκλωνες ουρές poly(T). Τα προϊόντα της PCR, μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης autonested GoTaq PCR, απέκτησαν στα άκρα τους poly(A) μονόκλωνες ουρές (συμπληρωματικά άκρα). Το γεγονός αυτό, επέτρεψε

στην T4 DNA λιγάση του βακτηριοφάγου, να πραγματοποιήσει την σύνδεση τους. Η συμπληρωματικότητα αυτών των άκρων, επέτρεψε στα δύο δίκλινα μόρια DNA να ενωθούν μέσω των φωσφοδιεστερικών δεσμών που δημιουργεί η λιγάση ανάμεσα στο 3'υδροξύλιο και την διπλανή 5'φωσφορική ομάδα του DNA, οδηγώντας τελικά στην ένθεση του προϊόντος της PCR (εικόνα 13).

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

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

Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E.coli DH5. Το στέλεχος αυτό δεν είναι ικανό να προκαλέσει ανασυνδυασμούς και κατασταλτικές μεταλλάξεις amber. Επίσης, η φ80 lacZ ΔM15 μετάλλαξη στην αλληλουχία του γενώματός του, επιτρέπει α-συμπληρωματικότητα με το αμινοτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης (τμήμα α) που κωδικοποιείται από τον φορέα κλωνοποίησης. Το τμήμα Ω της β-γαλακτοσιδάσης κωδικοποιείται από το βακτηριακό γένωμα. Τέλος, για τον σχηματισμό ενεργού ενζύμου, απαιτείται και το τμήμα α, το οποίο κωδικοποιείται από τον φορέα, εσωτερικά του οποίου υπάρχει η περιογή πολυσυνδέτη, που η παρουσία της δεν διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο.

Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με την συλλογή βακτηριακών κυττάρων, τα οποία είναι αποθηκευμένα στους -80°C και τη μεταφορά τους στο αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth (20g/L, Sigma, USA). Ακολουθεί η επώαση τους για 16h (overnight) στους 37°C στις 210 στροφές/λεπτό και στην συνέχεια μετρίεται η απορρόφηση τους σε OD₆₀₀, έτσι ώστε να διακοπεί η κυτταρική ανάπτυξη (τοποθέτηση σε πάγο) όταν τα κύτταρα φτάσουν στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους (0,450-0,550A). Στην συνέχεια, φυγοκεντρούνται στις 4000 rpm για 10min στους 4°C και απορρίπτεται το υπερκείμενο, διαλυτοποιείται το ίζημα σε παγωμένου CaCl₂ συγκέντρωσης 0,1M (Sigma, USA), η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά.

Γ. Μετασηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

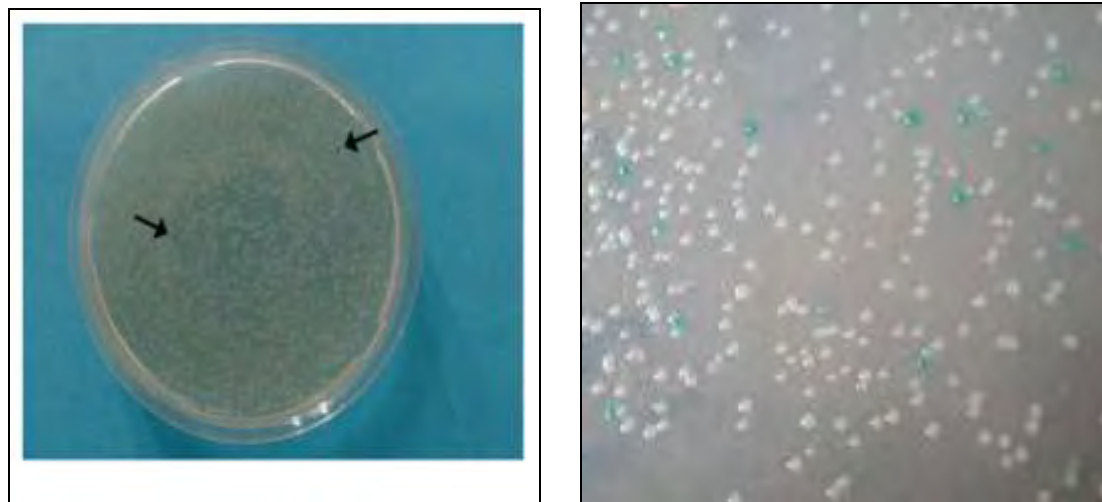
Η διαδικασία ενσωμάτωσης του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης στα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα, ξεκινά με τη μεταφορά αυτών σε αποστειρωμένα tubes. Ακολουθεί η προσθήκη του μισού ποσού της αντίδρασης της λιγάσης, του κάθε δείγματος, σε αντίστοιχο tube και μετά από ήπια ανάδευση, τοποθετούνται στον πάγο για 30min. Στην συνέχεια, επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 42°C για 90sec και ακολούθως μεταφέρονται και πάλι στον πάγο για 2min (heat shock). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας heat shock, μεταφέρεται ποσότητα των μετασηματισμένων δεκτικών κυττάρων σε falcon με LB Broth και επωάζονται στους 37°C στις 180 στροφές/λεπτό για 1h, ο σκοπός αυτής της επώασης είναι η «επούλωση» της πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων. Τέλος, επιστρώνεται ποσότητα από την κάθε καλλιέργεια σε τριβλίο, το οποίο περιέχει LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και αμπικιλίνη (6,6mg/ml) και κατόπιν προστίθεται ποσότητα της οργανικής ενώσεως X-gal (50mg/ml, Promega, USA). Τα τριβλία επωάζονται για 16h στους 37°C.

Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, η οποία παρεμβαίνει στη σύνδεση των μονάδων πεπτιδογλυκάνης και αναστέλλει τη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος, έτσι, αποτρέπεται η ανάπτυξη άλλων βακτηριακών κυττάρων στο τριβλίο καλλιέργειας, πέραν όσων έχουν μετασηματιστεί με τον φορέα κλωνοποίησης. Επίσης, στα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν, όταν αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την ουσία X-gal, η διάσπαση της από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος.

Έτσι, όταν στον φορέα κλωνοποίησης δεν έχει εισαχθεί στην περιοχή πολυσυνδέτη το επιθυμητό ένθεμα, παράγεται το τμήμα α της β-γαλακτοσιδάσης, σχηματίζοντας το ενεργό ένζυμο και η X-gal διασπάται παράγοντας μπλε αποικίες. Στην περίπτωση που έχει γίνει ένθεση του προϊόντος PCR στην περιοχή πολυσυνδέτη, το αναγνωστικό πλαίσιο του τμήματος α της β-γαλακτοσιδάσης διαταράσσεται, με αποτέλεσμα να μην παραχθεί το ενεργό ένζυμο και οι αποικίες να εμφανίζονται λευκές (εικόνα 14).

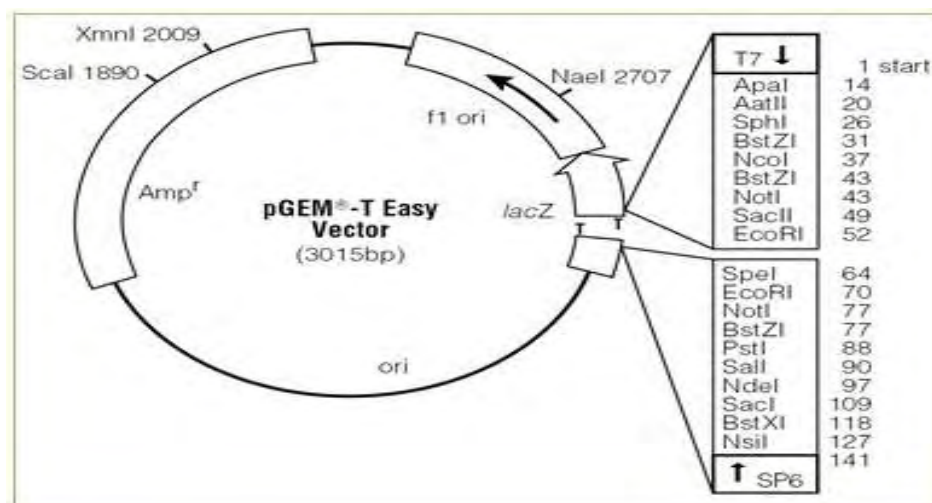
Η πειραματική διαδικασία συνεχίζεται με την συλλογή των λευκών αποικιών, την εισαγωγή τους στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth, το οποίο περιέχει αμπικιλίνη και ακολουθεί η επώαση τους για 16h στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό. Ακολουθεί η εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του NucleoSpin® Plasmid

(Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με το συνοδευτικό προτεινόμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή, έτσι ώστε να απομονωθεί ο ανασυνδυασμένος φορέας από τις λευκές αποικίες.



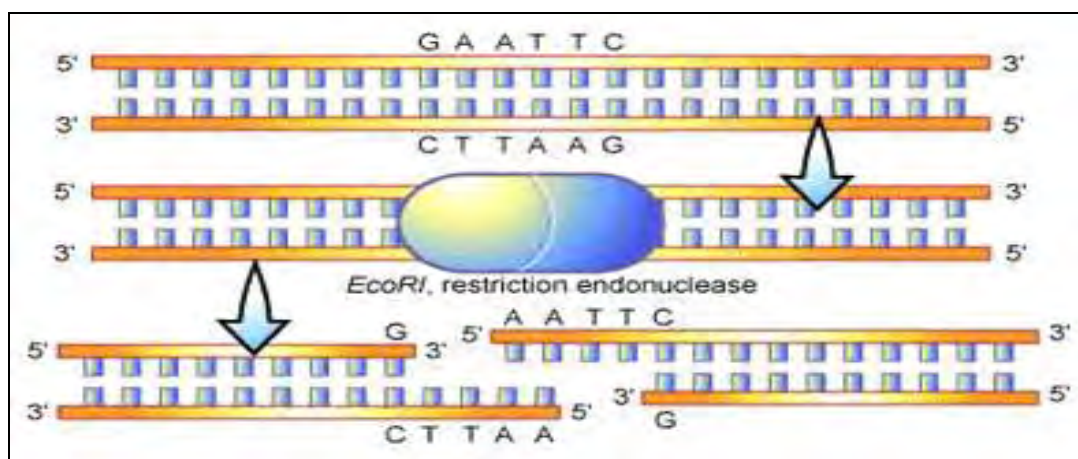
Εικόνα 14: Διάκριση μεταξύ μπλε και λευκών αποικιών για τον εντοπισμό ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης

Δ. Πέψη με EcoRI



Εικόνα 15 : Ο χάρτης του φορέα pGEM T-Easy, όπου παρατηρείται η θέση έναρξης αντιγραφής (ori), το γονίδιο β λακταμάση που προσφέρει ανθεκτικότητα στην Amp (Amp^r), το οπερόνιο lac, η θέση αναγνώρισης από ένζυμο περιορισμού, η θέση έναρξης της μεταγραφής από την T7 RNA πολυμεράση κ.λ.π. (Πηγή: εργαστηριακός οδηγός του kit της Promega “ Cloning PCR Products with pGEM-T and pGEM-T Easy Vectors”.)

Η πραγματοποίηση αυτής της αντίδρασης είναι σημαντική για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στον πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης (εικόνα 15). Η πέψη γίνεται με το ένζυμο περιορισμού EcoRI (Restriction Enzyme EcoRI, Takara Biomedical group, Shiga, Japan), του οποίου θέσεις αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη (εικόνα 16).



Εικόνα 16: Θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου EcoRI στον πλασμιδιακό φορέα (www.scq.ubc.ca)

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ποσότητα από το εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 10x H Buffer, ένζυμο EcoRI και ddH₂O. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2h, ενώ με το πέρας της επώασης προστέθηκαν 3μl 10x Loading Buffer έτσι ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Η ποσότητα που προκύπτει ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

2.6.3 Εύρεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των κλωνοποιημένων προϊόντων (αλληλούχιση)

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

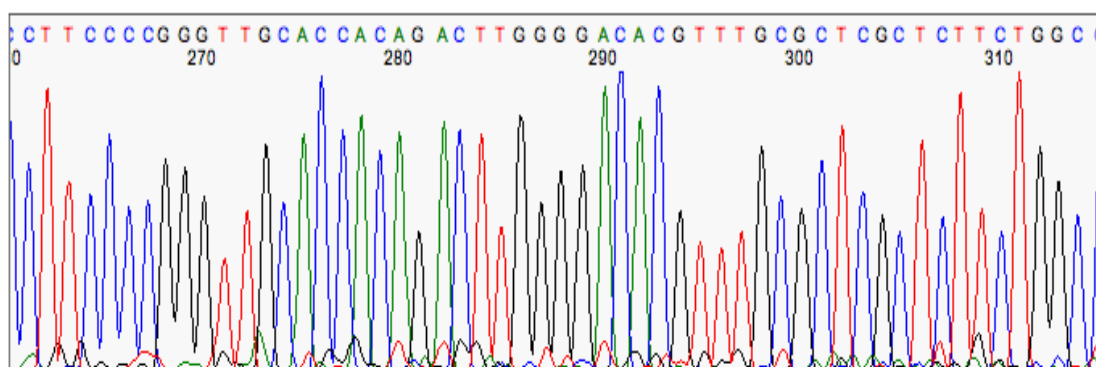
2.6.4 Επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κλωνοποιήθηκαν, μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα και εξελικτική τους σχέση συγκριτικά με τις αλληλουχίες προτύπων και κλινικών στελεχών των νοροϊών, καταχωρήθηκαν στην παγκόσμια γονιδιακή τράπεζα δεδομένων (GenBank).

Η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών αυτών πραγματοποιήθηκε με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής τα οποία αναφέρονται κατωτέρω και διατίθενται δωρεάν στο διαδίκτυο.

2.6.5 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, παραλαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος (εικόνα 17) πριν την επεξεργασία του οποίου, απαιτείται ο έλεγχος και η διόρθωση πιθανών λαθών. Τέτοια λάθη μπορεί να αποτελούν πιθανά κενά στην αλληλουχία, δηλαδή κορυφές του χρωματογραφήματος που δεν έχουν διαβαστεί και υπολείπονται από το κείμενο που αντιστοιχεί στην πρωτοδιάταξη της αλληλουχίας, καθώς και κάποιες κορυφές να αναγνωρίζονται ως N, δηλαδή ως πιθανή ύπαρξη στην συγκεκριμένη θέση, οποιασδήποτε από της A, T, G ή C βάσης. Στις περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η ασφαλής διόρθωση κάποιας αλληλουχίας, ζητείται η επανάληψη της αλληλούχισης (resequencing).



Εικόνα 17: Οι «κορυφές» του χρωματογραφήματος αντιστοιχούν στις διαφορετικές βάσεις της αλληλουχίας του DNA.

2.6.6 Αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας

Η αναζήτηση της κοντινότερης ή όμοιας αλληλουχίας πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο. Ο αλγόριθμος BLAST, αναζητά κατατεθειμένες αλληλουχίες ή τμήματα αυτών, στη GenBank, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την υπό μελέτη αλληλουχία. Η ποιότητα κάθε στοίχισης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές στοιχίσεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης (HSPs – high scoring segment pairs) καταγράφονται σε μορφή πίνακα. Ο πίνακας αυτός, παρουσιάζει τελικά τις πιο «συγγενικές» αλληλουχίες, κατά σειρά μειωμένης βαθμολογίας συσχέτισης κατά συνέπεια και ομολογίας.

2.6.7 Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών

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

Επίσης, με το πρόγραμμα ClustalW πραγματοποιήθηκαν οι στοιχίσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των νοροϊκών στελεχών των περιβαλλοντικών δειγμάτων που μελετήθηκαν, με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των στελεχών με τα οποία εμφανίζουν την υψηλότερη ομοιότητα αλληλουχίας το καθένα, καθώς επίσης και με των προτύπων στελεχών Norwalk (AF093797.1) όταν αναμένεται το στέλεχος να ανήκει στην γενετική ομάδα GI και Lordsdale (X86557.1) όταν αναμένεται να ανήκει στην γενετική ομάδα GII.

Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Gene Runner V. 3.05 για την ανάκτηση των αμινοξικών αλληλουχιών από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των στελεχών των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

2.6.8 Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων

Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έλαβε χώρα με τη μέθοδο Neighbor Joining – NJ, χρησιμοποιώντας την παράμετρο p-distance. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων ήταν το MEGA 4.

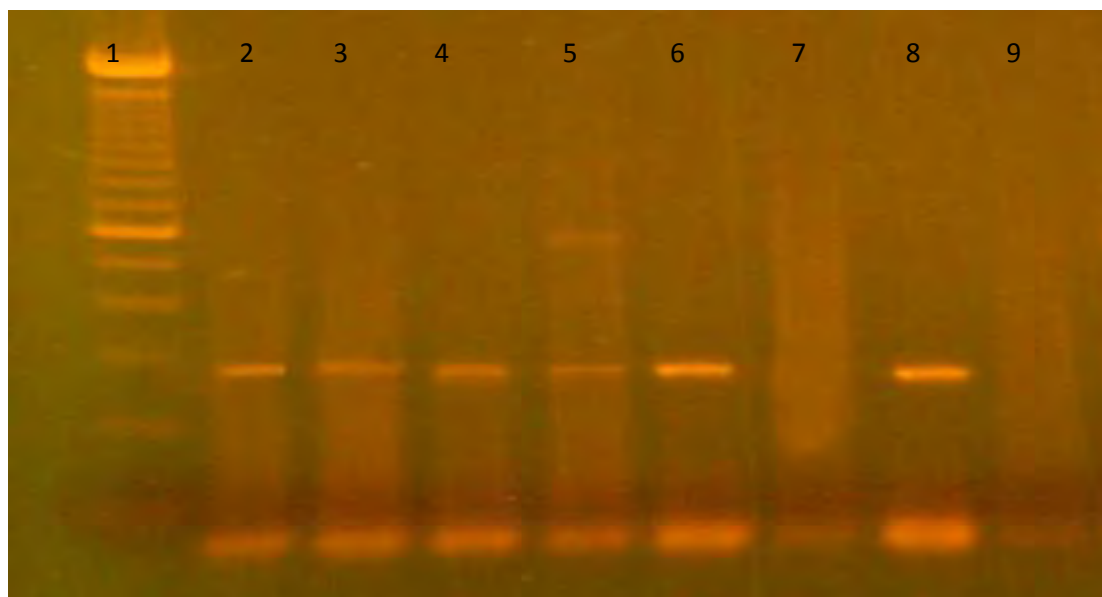
Η μέθοδος Neighbor Joining είναι μία μέθοδος πολλαπλής στοίχισης αλληλουχιών με ταυτόχρονη μετατροπή της διαφοροποίησης αυτών, όπως για παράδειγμα του ποσοστού των καταλοίπων που διαφέρουν μεταξύ των δύο αλληλουχιών, σε εξελικτική απόσταση. Η στοίχιση πραγματοποιείται προοδευτικά (Progressive Alignment).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

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR, AUTONESTED PCR

Το θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφής μετατράπηκε σε συμπληρωματικό cDNA. Ακολούθησε η αντίδραση PCR με το ζεύγος εκκινητών P78-P80. Για την περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας της αντίδρασης, εφαρμόστηκε η Autonested PCR.

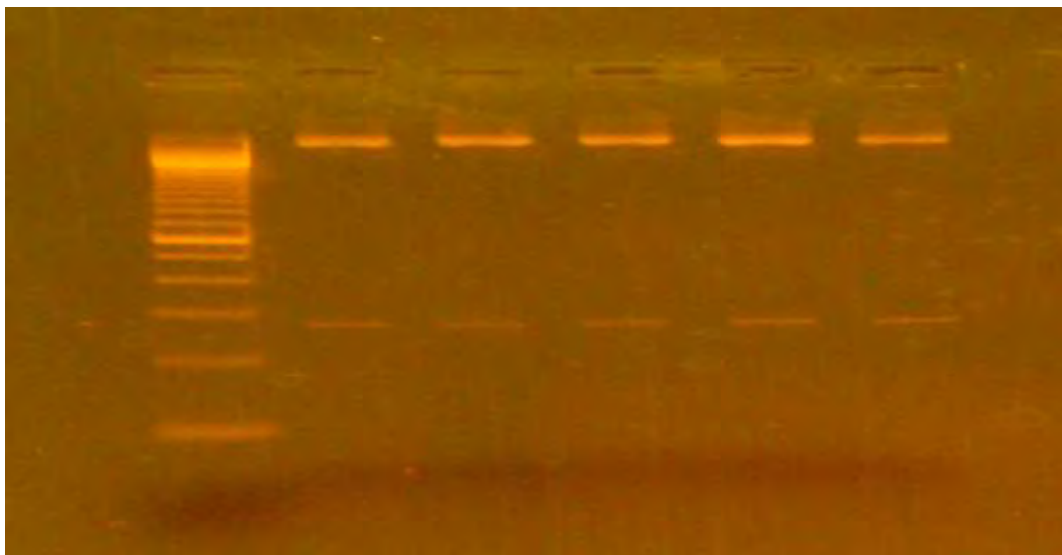


Εικόνα 18: Στο πήκτωμα παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια αποτελέσματα περιβαλλοντικών δειγμάτων μετά την εφαρμογή της autonested PCR με το ζεύγος εκκινητών P78- P80. Στο 1^ο πηγάδι αντιστοιχεί ο μάρτυρας μοριακού βάρους. Στα πηγάδια 2, 3, 4, 5 και 6 τα δείγματα EX11, AB7, AB9, EIS5 και EIS6 αντίστοιχα. Στο πηγάδι 7 ένα περιβαλλοντικό δείγμα το οποίο ήταν αρνητικό και τέλος στα πηγαδάκια 8 και 9 ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα.

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μοριακή κλωνοποίηση των δειγμάτων, περιλαμβάνει αρκετά στάδια έως ότου να γίνει εφικτός ο έλεγχος της επιτυχίας της αντίδρασης. Έτσι, ένας πρώτος έλεγχος πραγματοποιείται μετά την επιστροφή των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο που περιέχει την ουσία X-gal, με την παραγωγή λευκών αποικιών.

Ο δεύτερος έλεγχος, πραγματοποιείται με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Σκοπός της αντίδρασης αυτής, είναι η επιβεβαίωση της επιτυχούς ένθεσης ολόκληρης της αλληλουχίας του επιθυμητού προϊόντος της PCR, στη θέση ενσωμάτωσης του φορέα κλωνοποίησης (εικόνα 19).



Εικόνα 19: Ενδεικτική απεικόνιση πέψης με EcoRI

3.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μετά τη λήψη των χρωματογραφημάτων, την επεξεργασία και την αναζήτηση της κάθε ομόλογης αλληλουχίας, με την βοήθεια των προγραμμάτων βιοπληροφορικής, διαπιστώθηκε ότι, 5 από τα 30 περιβαλλοντικά δείγματα αντιπροσώπευαν ένα διαφορετικό νοροϊκό στέλεχος.

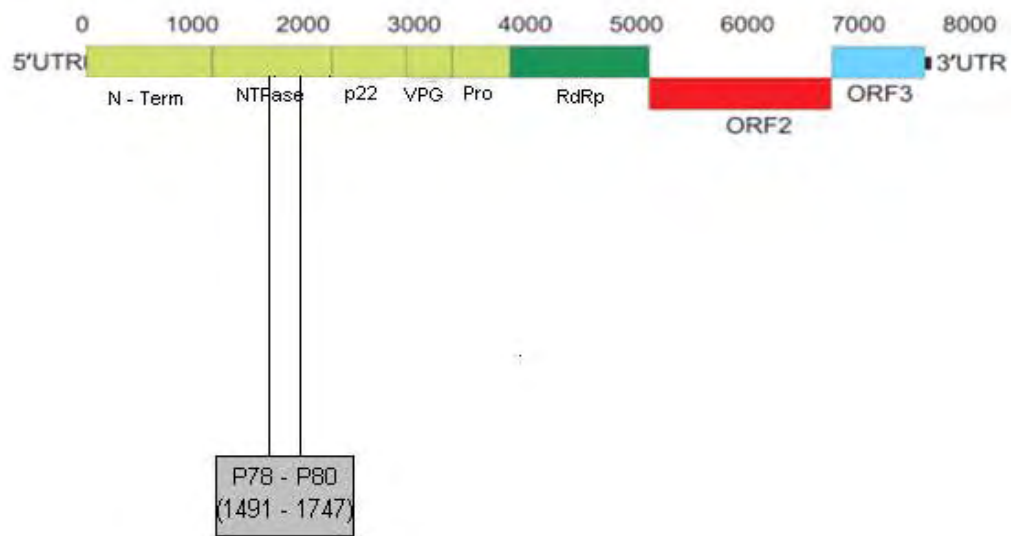
3.4 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Η κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων έχει ως σκοπό την ταξινόμηση του κάθε στελέχους, που εντοπίστηκε, σε επίπεδο γενετικής ομάδας. Έτσι, κάθε στέλεχος συγκρίθηκε με τα στελέχη όπου, με βάση το πρόγραμμα βιοπληροφορικής BLAST, εμφάνιζε μεγαλύτερη ομοιότητα καθώς και τις γενετικές ομάδες GI και GII, οι υποομάδες των οποίων, αποτελούν σημαντικά παθογόνα για τον άνθρωπο.

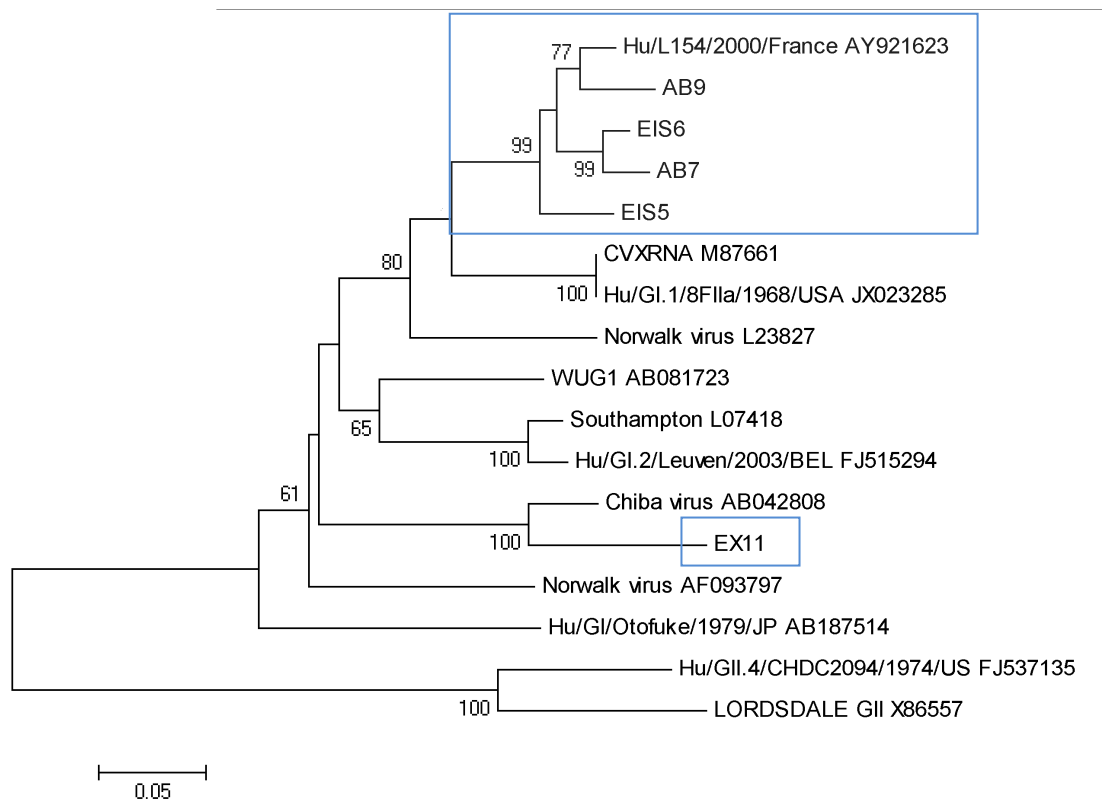
Περιβαλλοντικά στελέχη

Τα 5 από τα 30 περιβαλλοντικά δείγματα που αντιπροσωπεύουν ένα διαφορετικό νοροϊκό στέλεχος είναι τα :

- EIS5
- EX11
- EIS6
- AB9
- AB7



Σχήμα 1. Απεικόνιση των θέσεων αναγνώρισης των εκκινητών P78 – P80 που εντόπισαν τα 5 περιβαλλοντικά δείγματα στο γένωμα του ιού.



Σχήμα 2: Φυλογένεση των 5 στελεχών, κατασκευασμένη από τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στη γενωμική περιοχή του ORF1 και συγκεκριμένα από τα νουκλεοτίδια 1491 – 1747.

Τα στελέχη EIS5, EX11, EIS6, AB9 και AB7 (σχήμα 2) προέρχονται από τον βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας (πίνακας 2). Από την απεικόνιση τους στο φυλογενετικό δέντρο φαίνεται πως πρόκειται για 5 διαφορετικά νοροϊκά στελέχη. Τα στελέχη αυτά, κατατάσσονται στην γενετική ομάδα GI. Στο δέντρο έχουν τοποθετηθεί και στελέχη της γενετικής ομάδας GII ως μάρτυρες.

Για τα στελέχη EIS5, EIS6, AB9 και AB7 η κοντινότερη τους, φυλογενετικά, αλληλουχία είναι εκείνη με αριθμό καταχώρησης στη GenBank AY921623. Το στέλεχος AY921623 απομονώθηκε κατά τη διάρκεια μελέτης των Bon *et al.*, (2005) στη Γαλλία με θέμα «Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004.» Εμφανίζει 90% νουκλεοτιδική ομοιότητα με τον ιό *Norwalk*.

Για το στέλεχος EX11 η κοντινότερη του φυλογενετικά αλληλουχία είναι εκείνη του στελέχους *Chiba virus*. Ο *Chiba virus* ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στην περιφέρεια

Chiba της Ιαπωνίας το Δεκέμβριο του 1987, σε δείγματα κοπράνων ασθενούς με γαστρεντερίτιδα λόγω κατανάλωσης οστρακοειδών (Kasuga *et al.*,1990). Διαθέτει θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA 7697 βάσεων και ανήκει στη γενετική ομάδα GI των νοροϊών (Someya *et al.*, 2000).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι νοροϊοί αποτελούν σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα, γνωστά για την πρόκληση επιδημικών εκδηλώσεων σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε επίπεδο πληθυσμών και θεωρούνται υπεύθυνοι για πάνω από το 96% όλων των περιπτώσεων μη βακτηριακής οξείας επιδημικής γαστρεντερίτιδας

Η επιτυχής κλωνοποίηση του γονιδιώματος του ιού επέτρεψε να χαρακτηριστεί ο ιός ως calicivirus, δηλαδή ότι κατέχει ένα γραμμικό, θετικής πολικότητας, μονόκλωνο RNA (ssRNA) γονιδίωμα, 7.700 βάσεων περίπου, το οποίο περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, αλλά δε διαθέτει φάκελο. Στο 5' άκρο του γονιδιώματος βρίσκεται συνδεδεμένη μια πρωτεΐνη (VPg) ενώ στο 3' άκρο του μια πολύ-A ουρά. Επίσης, το ιικό γονιδίωμα οργανώνεται σε τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Το ORF1 κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη, η οποία παράγει τις ώριμες μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Τα ORF2 και ORF3 κωδικοποιούν για τις δομικές πρωτεΐνες, εκ των οποίων η VP1 είναι η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου και υπεύθυνη για τις αντιγονικές ιδιότητες του ιού.

Οι νοροϊοί εμφανίζουν υψηλή μολυσματική ικανότητα, μικρότερη από 10 ιοσωμάτια ανά άτομο και σταθερότητα στο περιβάλλον. Η ασθένεια που προκύπτει μετά από μόλυνση με τον ιό, συνήθως, δεν διαρκεί μεγάλο χρονικό διάστημα σε υγιείς ενήλικες (12 – 24 ώρες), αλλά μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές, κυρίως στις ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού, όπως τα μικρά παιδιά, οι ηλικιωμένοι και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Επίσης, οι νοροϊοί δεν προκαλούν πάντα μόνιμη ανοσοποίηση και σε συνδυασμό με την ευμεταβλητότητά τους, αποτελούν σημαντικό επιδημιολογικό κίνδυνο σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι νοροϊοί, διαφέρουν από τους υπόλοιπους εντερικούς ιούς κυρίως στο ότι επάγουν μια σχετικά βραχυπρόθεσμη ανοσία και έτσι τα άτομα που έχουν προσβληθεί από τον ιό παραμένουν ευαίσθητα σε ενδεχόμενη μόλυνση καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους.

Η μετάδοση τους γίνεται είτε από άτομο σε άτομο, είτε από μια μολυσμένη τροφή ή νερό. Απεκκρίνονται στα κόπρανα των μολυσμένων ατόμων και μέσω των συστημάτων αποχέτευσης μπορούν να φτάσουν σε διάφορες πηγές νερών καθώς και είναι ανθεκτικοί στις επεξεργασίες καθαρισμού λυμάτων ή πόσιμου νερού, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα και να αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Συνεπώς, η ανίχνευσή τους σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη δημόσια υγεία.

Η έλλειψη συστημάτων κυτταροκαλλιέργειας και μικρού ζωικού προτύπου επέτρεπε, μέχρι πρόσφατα, την ανίχνευσή τους μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Σήμερα, οι αποτελεσματικότερες διαθέσιμες μέθοδοι ανίχνευσης και μελέτης των νοροϊών είναι οι μοριακές, σε επίπεδο RNA γενώματος.

Η ανίχνευση των νοροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα μέσω της τεχνικής RT – PCR έρχεται αντιμέτωπη με το πρόβλημα της παραγωγής πολλών μη-ειδικών PCR προϊόντων εμποδίζοντας έτσι την σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Το πρόβλημα αυτό επιλύεται με την τεχνική της αλληλούχισης, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση των ειδικών PCR προϊόντων αφού προηγουμένως πραγματοποιηθεί καθαρισμός αυτών και κλωνοποίησή τους για την αποφυγή μιγμάτων ιικών στελεχών. Επίσης, λόγω της μικρής συγκέντρωσης ιοσωματιδίων στα περιβαλλοντικά δείγματα συνήθως απαιτείται η εφαρμογή των *autonested*, *nested* ή *seminested* PCR για την ανίχνευση των νοροϊών, γεγονός το οποίο αυξάνει τον κίνδυνο επιμολύνσεων των δειγμάτων. Τέλος, ένα σημαντικό πρόβλημα που σχετίζεται με την ανίχνευση των νοροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι η παρουσία αναστολέων της RT-PCR τεχνικής. Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την αποφυγή αυτού του προβλήματος όπως για παράδειγμα η χρησιμοποίηση εσωτερικών πρότυπων RNA μαρτύρων.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές και αλληλούχιση για την ανίχνευση νοροϊών GI από 30 περιβαλλοντικά δείγματα. Τα περιβαλλοντικά δείγματα προέρχονται από το βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας, των Τρικάλων και των Ιωαννίνων και από αστικά λύματα.

Όπως, έχει ήδη αναφερθεί, οι νοροϊοί περιέχουν ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την μετατροπή του σε συμπληρωματικό cDNA, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση PCR, η οποία θα καταστήσει εφικτή την ενίσχυση της περιοχής του γονιδιώματος που μας ενδιαφέρει. Στα συμπληρωματικά cDNA τμήματα που προκύπτουν μετά την εφαρμογή της αντίστροφης μεταγραφής (RT), εφαρμόζεται η αντίδραση PCR έτσι ώστε να ενισχυθούν. Για την ενίσχυση τους χρησιμοποιούνται οι ειδικοί εκκινητές P78-P80. Οι εκκινητές P78-P80 στοχεύουν την περιοχή του γονιδίου NTPase του αναγνωστικού πλαισίου ORF1, στις θέσεις 1491-1747. Για την περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας της αντίδρασης, εφαρμόστηκε η *Autonested* PCR.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση, καθώς υπήρχε η υποψία για ταυτόχρονη ύπαρξη των πάνω του ενός στελέχους νοροϊών σε αυτά. Έτσι, κάθε κλώνος μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων που προέκυψε, περιείχε κλωνοποιημένο το γονιδιακό τμήμα από μόνο ένα διακριτό στέλεχος. Τα ενισχυμένα προϊόντα της PCR αλληλουχίστηκαν και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων της βιοπληροφορικής. Διαπιστώθηκε ότι 5 από τα 30 περιβαλλοντικά δείγματα αντιπροσώπευαν το καθένα ένα διαφορετικό νοροϊκό στέλεχος.

Ακολούθησε η φυλογενετική ανάλυση των στελεχών EIS5, EX11, EIS6, AB9 και AB7 και κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο. Από την απεικόνιση τους στο φυλογενετικό δέντρο φαίνεται πως πρόκειται για 5 διαφορετικά νοροϊκά στελέχη. Τα στελέχη αυτά, κατατάσσονται στην γενετική ομάδα GI. Στο δέντρο απεικονίζονται και στελέχη της γενετικής ομάδας GII ως μάρτυρες.

Η αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών στην GenBank έδειξε ότι τα παραπάνω στελέχη εμφανίζουν ομολογία με στελέχη που ανήκουν στην γενετική ομάδα GI γεγονός το οποίο συμφωνεί με την ενίσχυση των αντίστοιχων PCR προϊόντων με τα ειδικά για την γενετική ομάδα GI εκκινητικά μόρια P78 – P80 που στοχεύουν στην περιοχή της νουκλεοτιδικής τριφωσφατάσης (NTPase) του ORF1, η οποία δεσμεύει και υδρολύει NTPs.

Για τα στελέχη EIS5, EIS6, AB9 και AB7 το κοντινότερο φυλογενετικά στέλεχος είναι αυτό με αριθμό καταχώρησης στη GenBank AY921623. Το στέλεχος AY921623 απομονώθηκε στη Γαλλία και εμφανίζει 90% νουκλεοτιδική ομοιότητα με τον ιό *Norwalk*. Για το στέλεχος EX11 το κοντινότερο φυλογενετικά στέλεχος είναι ο Chiba virus, ο οποίος ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στην περιφέρεια Chiba της Ιαπωνίας το Δεκέμβριο του 1987, σε δείγματα κοπράνων ασθενούς με γαστρεντερίτιδα λόγω κατανάλωσης οστρακοειδών (Kasuga *et al.*, 1990) και ανήκει στη γενετική ομάδα GI των νοροϊών (Someya *et al.*, 2000).

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία αποτελεί τμήμα μιας προσπάθειας για την αλληλούχιση GI στελεχών νοροϊών που κυκλοφορούν στον ελληνικό πληθυσμό και κρίνεται αναγκαία η αλληλούχιση τους, προκειμένου να καταστούν εφικτές φυλογενετικές και επιδημιολογικές μελέτες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Atmar RL, Estes MK. (2001) Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 14:15-37.
2. Atmar R.L (2010) Noroviruses: State of the Art. *Food Environ Virol* 2:117–126
3. Baric R. S., Yount B., Lindesmith L., Harrington P. R., Greene S. R., Tseng F. C., Davis N., Johnston R. E., Klapper D. G., Moe C. L. (2002). Expression and self-assembly of norwalk virus capsid protein from venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J Virol* 76:3023-30
4. Blakeney SJ, Cahill A, Reilly PA. (2003) Processing of NV nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology* 308:216–224.
5. Beller M, Ellis A, Lee SH, Drebot MA, et al. (1997) Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. International consequences. *JAMA* 278:563–8.
6. Bluth MH, Hardin RE, Tenner S, Zenilman ME, Threatte GA (2007) Laboratory diagnosis of gastrointestinal and pancreatic disorders. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 21th ed. China: Saunders Elsevier, 279-296.
7. Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, Pommepeuy M, Gallay A, Vaillant V, de Valk H, Chikhi-Brachet R, Flahaut A, Pothier P, Kohli E (2005) Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J Clin Microbiol*. 43(9):4659-64.
8. Cao S, et al. (2007) Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 81:5947–5957
9. Clarke, I.N., Estes, M.K., Green, K.Y., Hansman, G.S, Knowles, N.J., Koopmans, M.K., Matson, D.O., Meyers, G. Neill, J.D., Radford, A., Smith, A.W., Studdert, M.J., Thiel, H.-J. and Vinjé, J. (2012). Caliciviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. pp 977-986. San Diego: Elsevier.
10. Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME. (2003) The genome-linked protein VPg of the NV binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J*. 22:2852–2859.

11. Daughenbaugh KF, Wobus CE, Hardy ME. (2006) VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virology* 3:33.
12. Donaldson E.F., Lindesmith L.C., Lobue A.D., Baric R.S. (2008) Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations *Immunological Reviews* Vol. 225: 190–211
13. Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C., Lobue, A.D. & Baric, R.S. (2010). Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol* Vol.No. 3 pp. 231-241
14. Duizer, E., K. J. Schwab, F. H. Neill, R. L. Atmar, M. P. Koopmans, and M. K. Estes. (2004) Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J. Gen. Virol.* 85:79-87.
15. Estes M.K., Ball J.M., Guerrero R.A.. (2000) Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis* 181:S367-373.
16. Ettayebi K, Hardy ME. (2003) NV nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol.* 77:11790–11797.
17. Falkenhorst G, Krusell L, Lisby M, Madsen SB, Bottiger B, Molbak K. (2005) Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. *Euro Surveill* 10:E050922.2.
18. Farkas, T., Sestak, K., Wei, C. & Jiang, X. (2008). Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol* Vol.No. 11 pp. 5408-5416.
19. Fernandez-Vega, V., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., King, A.D., Mitra, T., Gorbalenya, A. & Green, K.Y. (2004). Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol* Vol.No. 9 pp. 4827-4837
20. Fukushi, S., Kojima, S., Takai, R., Hoshino, F.B., Oka, T., Takeda, N., Katayama, K. & Kageyama, T. (2004). Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of Norovirus. *J Virol* Vol.No. 8 pp. 3889-3896.
21. Glass, P.J., White, L.J., Ball, J.M., Leparac-Goffart, I., Hardy, M.E. & Estes, M.K. (2000). Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* Vol.No. 14 pp. 6581-6591.
22. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. (2009) Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 361(18), 1776–1785

23. Green, K. Y., R. M. Chanock, and A. Z. Kapikian. (2001) Human Caliciviruses, p. 841-874. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, vol. 1. Lippincott
24. Green, K.Y. (2007). Caliciviridae: The Noroviruses. In: *Fields Virology*, D.M. Knipe & P.M. Howley, pp. 949-979, Lippincott Williams & Wilkins
25. Green KY, Lew JF, Jiang X, Kapikian AZ, Estes MK. (1993) Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant NV capsid antigen with those of the native NV antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *J Clin Microbiol* 31:2185–2191.
26. Hardy, M.E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* Vol.No. 1 39 pp. 1-8.
27. Huhti, L., E.D. Szakal, L. Puustinen, M. Salminen, H. Huhtala, O. Valve, V. Blazevic, and T. Vesikari. (2011) Norovirus GII-4 Causes a More Severe Gastroenteritis Than Other Noroviruses in Young Children. *J Infect Dis*
28. Iritani, N., Kaida, A., Kubo, H., Abe, N., Murakami, T., Vennema, H., et al. (2008). Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 noroviruses. *Journal of Virology*, 82(15), 7336–7345.
29. Jiang X, Graham D, Wang K, Estes M. (1990) NV genome cloning and characterization. *Science* 250:1580–1583.
30. Jiang X, Wang M, Graham D, Estes M. (1992) Expression, self-assembly and antigenicity of the NV capsid protein. *J Virol*. 66:6527–6532.
31. Joana Rocha-Pereira and Maria São José Nascimento (2012). Targeting Norovirus: Strategies for the Discovery of New Antiviral Drugs, *Antiviral Drugs - Aspects of Clinical Use and Recent Advances*, Dr. Patrick Arbuthnot (Ed.), ISBN: 978-953-51-0256-4, InTech, DOI: 10.5772/32677.
32. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. (1972) Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10: 1075–1081.
33. Kapikian, S.V. Sosnovtsev, R.H. Purcell, and K.Y. Green. (2011) Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:325-330.
34. Karst, S.M. (2010). Pathogenesis of Noroviruses, *Emerging RNA Viruses*. *Viruses* Vol.No. 3 pp. 748-781.

35. Kasuga, K., Tokieda, M., Ohtawara, M., Utagawa, E., and Yamazaki, S. (1990). Small round structured virus associated with an outbreak of 499 FUNCTIONAL EXPRESSION OF 3C-LIKE PROTEASE IN *E. coli* acute gastroenteritis in Chiba, Japan. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 43,111-121
36. Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, von Bonsdorff CH. (1999) Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 180:1771–6.
37. Lindesmith L, et al. (2003) Human susceptibility and resistance to NV infection. *Nat Med* 9:548–553.
38. Lindesmith L, Moe C, Lependu J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. (2005) Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J Virol* 79:2900–2909.
39. Lindesmith LC, et al. (2008) Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 5:e31
40. Liu B, Clarke IN, Lambden PR. (1996) Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol* 70:2605–2610.
41. Liu BL, Lambden PR, Gunther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN. (1999) Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 73:819–825.
42. Malek M, Barzilay E, Kramer A, et al. (2005) Outbreak of norovirus infection among river rafters associated with packaged delicatessen meat, Grand Canyon, 2005. *Clin Infect Dis* 48:31–7.
43. Marionneau S., Ruvoen N., Le Moullac-Vaidye B., et al. (2002) Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122:1967-1977.
44. Nakamura, K., Someya, Y., Kumasaka, T., Ueno, G., Yamamoto, M., Sato, T., Takeda, N., Miyamura, T. & Tanaka, N. (2005). A norovirus protease structure provides insights into active and substrate binding site integrity. *J Virol* Vol.No. 21 pp. 13685-13693.
45. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. (1977) Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 297:86–89.

46. Prasad BV, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK. (1994) Three-dimensional structure of baculovirus-expressed NV capsids. *J Virol* 68: 5117–5125.
47. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. (1999) X-ray crystallographic structure of the NV capsid. *Science*. 286:287–290.
48. Rohayem J, Jager K, Robel I, Scheffler U, Temme A, Rudolph W (2006). Characterization of norovirus 3Dpol RNA-dependent RNA polymerase activity and initiation of RNA synthesis. *J Gen Virol*. 87:2621–2630
49. Shirato H., Ogawa S., Ito H., Sato T., Kameyama A., Narimatsu H., Xiaofan Z., Miyamura T., Wakita T., Ishii K. et al. (2008). Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol* 82:10756-67
50. Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B et al. (2007) Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 81:9932–9941
51. Siebenga, J. J., Vennema, H., Zheng, D. P., Vinje', J., Lee, B. E., Pang, X. L., et al. (2009). Norovirus illness is a global problem: Emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *Journal of Infectious Diseases*, 200(5), 802–812
52. Someya Y., Takeda N, Miyamura (2000) Complete sequence of the chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Virology* 20; 278(2): 490-500.
53. Someya Y, Takeda N, Miyamura T. (2002) Identification of active-site amino acid residues in the Chiba virus 3C-like protease. *J Virol*. 76:5949–5958.
54. Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Chang, K.O., Prikhodko, V.G., Thackray, L.B., Wobus, C.E., Karst, S.M., Virgin, H.W. & Green, K.Y. (2006). Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* Vol.No. 16 pp. (7816-7831).
55. Tan, M. & Jiang, X. (2007). Norovirus-host interaction: implications for disease control and prevention. *Expert Rev Mol Med*. 9: 1-22.
56. Tan, M. & Jiang, X. (2010). Virus-Host Interaction and Cellular Receptors of Caliciviruses. In: *Caliciviruses: Molecular and Cellular Virology*, X.J.J.a.K.Y.G. Grant S. Hansman, pp. 111-130, Caister Academic Press
57. Tan, M. & Jiang, X. (2011). Norovirus-host interaction: Multi-selections by human histoblood group antigens. *Trends Microbiol* Vol.No. 8 pp. 382-388.

58. Teunis PF, Moe CL, Liu P, et al. (2008) Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol* 80:1468–76.
59. Treanor JJ, Dolin R. (2000) Norwalk Virus and Other Caliciviruses. In: Mandell GL, Bennett JE, 5th Edition ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Vol. 2. Philadelphia: Churchill Livingstone.p: 1949-1956.
60. Troeger H., Loddenkemper C., Schneider T., Schreier E., Epple H. J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J. D. (2008). Structural And Functional Changes Of The Duodenum In Human Norovirus Infection. *Gut*
61. Verhoef, L., Depoortere, E., Boxman, I., Duizer, E., van Duynhoven, Y., Harris, J., et al. (2008). Emergence of new norovirus variants on spring cruise ships and prediction of winter epidemics. *Emerging Infectious Diseases*, 14(2), 238–243.
62. Ward JM, et al. (2006) Pathology of immunodeficient mice with naturally occurring murine norovirus infection. *Toxicol Pathol* 34:708–715.
63. Wobus C.E., Karst S.M., Thackray L.B., et al. (2004) Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology* 2:e432. Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
64. Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, et al. (1974) Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* 129:709–14.
65. Yoder JS, Blackburn BG, Craun GF, et al. (2004) Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water—United States, 2001–2002. *MMWR* 53(No. SS-8):1–22.
66. Yoder JS, Hlavsa MC, Craun GF, et al. (2008) Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events—United States, 2005–2006. *MMWR* 57(No. SS-9):1–29.
67. Zeitler CE, Estes MK, Venkataram Prasad BV. (2006) X-ray crystallographic structure of the NV protease at 1.5-Å resolution. *J Virol.* 80:5050–5058.
68. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. (2006) Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346:312–23.