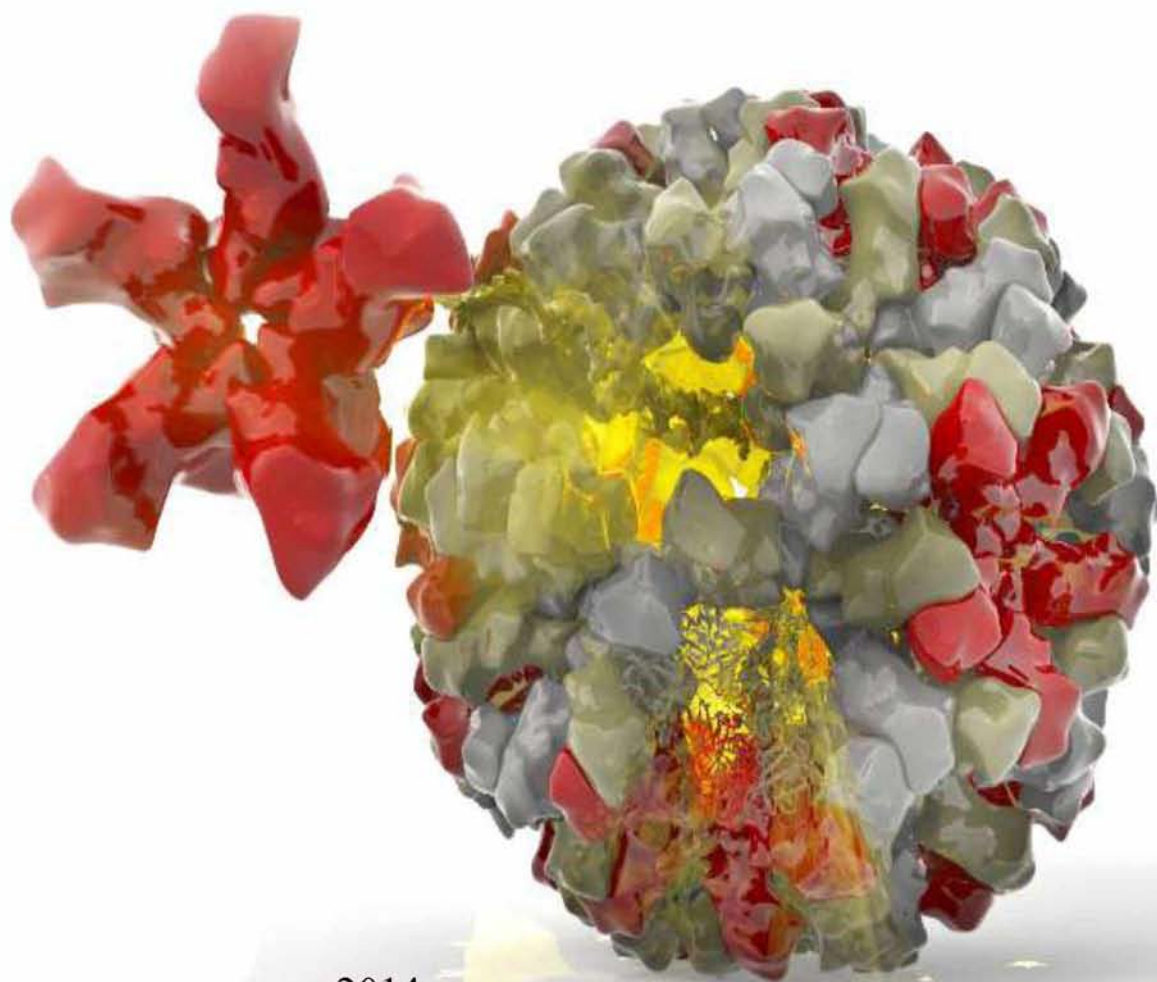


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Irina G.A. Ruether

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ
ΝΟΡΟΪΩΝ



«Μοριακή και φυλογενετική μελέτη των Νοροϊών»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

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

Σ. ΛΕΒΙΔΙΩΤΟΥ-ΣΤΕΦΑΝΟΥ

Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Β. ΚΡΙΚΕΛΗΣ

Καθηγητής Μικροβιολογίας
ΤΕΙ Λάρισας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

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

Σ. ΛΕΒΙΔΙΩΤΟΥ-ΣΤΕΦΑΝΟΥ

Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Β. ΚΡΙΚΕΛΗΣ

Καθηγητής Μικροβιολογίας
ΤΕΙ Λάρισας

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ. ΓΚΑΡΤΖΟΝΙΚΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη γενωμική
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Irina Georgia Anna Ruether

«Μοριακή και φυλογενετική μελέτη των Νοροϊών»

Irina Georgia Anna Ruether

2014

«Μοριακή και φυλογενετική μελέτη των Νοροϊών»

«Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας»

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 11

Συνολικός αριθμός σελίδων διατριβής: 122

Αριθμός πινάκων: 13

Αριθμός εικόνων: 33

Αριθμός φωτογραφιών: 0

Αριθμός παραρτημάτων: 0

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 153

Περίληψη

Οι Νοροϊοί αποτελούν σημαντικά παθογόνα του ανθρώπου, γνωστά για την πρόκληση οξείας γαστρεντερίτιδας. Είναι μέλη της οικογένειας Caliciviridae και με βάση τη γενετική ανάλυση της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RdRp) και περιοχών του καψιδίου, οι Νοροϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο χωρίζονται σε τρεις γενετικές ομάδες (GS), GI, GII και GIV, οι οποίες διαχωρίζονται περαιτέρω σε γενότυπους. Το γονιδίωμα των νοροϊών είναι ποικιλόμορφο καθώς οι ανασυνδυασμοί του ιικού RNA εξαρτώνται από διάφορους ανοσολογικούς και ενδοκυτταρικούς περιορισμούς, οι οποίοι μπορεί να επιτρέψουν την ανάδειξη βιώσιμων στελεχών.

Παγκοσμίως, οι Νοροϊοί χαρακτηρίζονται ως ο βασικός παράγοντας εμφάνισης γαστρεντερικών λοιμώξεων και ευθύνονται για το 96% των περιπτώσεων μη βακτηριακής οξείας επιδημικής γαστρεντερίτιδας. Σήμερα, η ιογενής γαστρεντερίτιδα είναι σε γενικές γραμμές καλά τεκμηριωμένη στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, σε αντίθεση με την Ελλάδα, όπου τα επιδημιολογικά στοιχεία που αφορούν την ιογενή γαστρεντερίτιδα Νοροϊικής προέλευσης εξακολουθούν να είναι ελλιπή. Για το λόγο αυτό στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν μελέτες, σε μοριακό επίπεδο, εντοπισμού και ελέγχου των κυκλοφορούντων Νοροϊικών στελεχών προκειμένου να παραχθούν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη, την παθογένεια και την εξάπλωση των ιών αυτών στον πληθυσμό της κεντρικής Ελλάδος. Συλλέχθηκαν λύματα και κλινικά δείγματα από την κεντρική Ελλάδα και αναπτύχθηκαν τεχνικές, οι οποίες επέτρεψαν τον χαρακτηρισμό των Νοροϊικών στελεχών σε μοριακό επίπεδο, τεκμηρίωσαν δε τις μεταξύ τους γενετικές σχέσεις και κατέταξαν τα στελέχη σε γενετικό και γενοτυπικό επίπεδο.

Το πρώτο στέλεχος Νοροϊών το οποίο χαρακτηρίστηκε κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής απομονώθηκε από το κλινικό δείγμα A6. Η ανίχνευση διεξήχθη αρχικά με την αντίδραση ELISA και ακολούθησε η ανίχνευση και ο μοριακός χαρακτηρισμός του εφαρμόζοντας RT-PCR και αλληλούχιση. Η μέθοδος RT-PCR που στόχευε στις συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος της GII γενετικής ομάδας, επέτρεψε τον χαρακτηρισμό του στελέχους A6 σε μοριακό επίπεδο και την ταξινόμηση του σε γενετικό και γενοτυπικό επίπεδο.

Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με άλλα στελέχη της GII γενετικής ομάδας, τα οποία είχαν ήδη ομαδοποιηθεί σε γενότυπους. Με βάση την φυλογενετική ανάλυση της αλληλουχίας, το στέλεχος A6 άνηκε στην GII γενετική ομάδα. Η μερική αλληλουχία του ORF1 γονιδίου και η πλήρης αλληλουχία του ORF2 γονιδίου έδειξαν ότι το ORF1 και το ORF2 ανήκαν σε δύο διαφορετικούς γενότυπους GII/9 και GII/6, αντίστοιχα, καθιστώντας προφανές ότι το στέλεχος A6 είναι ένα σπάνιο ανασυνδυασμένο στέλεχος εντός της GII γενετικής ομάδας μεταξύ των GII.9 και GII.6 γενότυπων αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, σε μια προσπάθεια μελέτης της κυκλοφορίας του ανασυνδυασμένου προαναφερθέντος στελέχους (A6), πραγματοποιήθηκε έρευνα για την ύπαρξη Νοροϊών σε μη επεξεργασμένα λύματα, για το χρονικό διάστημα 2006-2011 και έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων με τους ιούς που ανιχνεύθηκαν από κλινικά δείγματα στην ίδια περιοχή και κατά την ίδια χρονική περίοδο. Χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών τα οποία σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ενισχύουν μία μοναδική αλληλουχία η οποία καλύπτει το σημείο του ανασυνδυασμού μεταξύ των ORF1/ORF2 γονιδίων. Με βάση την γενετική ανάλυση ταυτοποιήθηκαν δεκατέσσερα από τα δεκαπέντε περιβαλλοντικά και οκτώ από τα δέκα κλινικά δείγματα, επιβεβαιώνοντας ότι ο συγκεκριμένος ανασυνδυασμός κυκλοφορούσε στον πληθυσμό της κεντρικής Ελλάδας από το 2006 έως 2011. Το σημείο ανασυνδυασμού ήταν εντός της περιοχής επικάλυψης των ORF1/ORF2 γονιδίων (GII.9/GII.6, αντίστοιχα) και προσδιορίστηκε με την χρήση του προγράμματος SimPlot στην νουκλεοτιδική θέση 5032 bp.

Τέλος, τρία ακόμη στελέχη Νοροϊών ανιχνεύθηκαν σε κλινικά δείγματα που συλλέχθηκαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων τα οποία έφεραν σπάνιους ανασυνδυασμούς. Δύο δείγματα μεταξύ των GII.9/GII.4 γενότυπων και ένα μεταξύ των GII.9/GII.7 γενετικών ομάδων. Επιπλέον ανιχνεύθηκε, ένα στέλεχος σε κλινικό δείγμα, το οποίο άνηκε στην GII γενετική ομάδα, στον γενότυπο τέσσερα, όπου μετά από τη φυλογενετική ανάλυση το στέλεχος αυτό σχημάτισε μονοφυλετικό κλάδο σε σχέση με τα υπόλοιπα GII.4 στελέχη.

Ευχαριστίες

Η πραγματοποίηση και η συγγραφή της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής θα αποτελούσε πολύ δύσκολο έργο χωρίς την απαραίτητη συνδρομή και συμπαράσταση ορισμένων ατόμων.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με την έρευνα από τη πρώτη στιγμή που ήρθα σε επαφή με το Εργαστήριο Ιολογίας – Μικροβιολογίας το 2009.

Μαζί του έκανα τη μεταπτυχιακή μου μελέτη αλλά και τη διδακτορική διατριβή. Όλα αυτά τα χρόνια μου έμαθε πολλά πράγματα, όπως το πώς να προσεγγίζω και να πραγματοποιώ τα πειράματα, πώς να αναλύω τα αποτελέσματά, πώς να λειτουργώ μέσα στο εργαστήριο, αλλά κυρίως μου έμαθε να αγαπάω αυτό που κάνω, να το κάνω σωστά και προσεκτικά.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ιολογίας – Μικροβιολογίας, αλλά κυρίως τον Δημήτρη Τσακογιάννη, τη Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου και τον Τηλέμαχο Δημητρίου, οι οποίοι με βοήθησαν τόσο στα πειράματα όσο και με την καθημερινή παρουσία τους στο εργαστήριο. Με στήριξαν και ήταν πάντα πρόθυμοι να συζητήσουμε και να φέρουμε εις πέρας οποιοδήποτε θέμα με απασχολούσε ερευνητικό ή προσωπικό.

Επίσης, ευχαριστώ τον σύντροφο της ζωής μου Γιώργο Γκόρα ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να αρχίσω, να συνεχίσω και να ολοκληρώσω την παρούσα διδακτορική διατριβή και μου παρείχε πάντα την ανιδιοτελή και ανυπολόγιστη υποστήριξή του.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τη μητέρα μου, της οποίας η αγάπη και η πίστη προς εμένα αποτέλεσαν το έρεισμα να καταφέρω να πραγματώσω το οτιδήποτε στη ζωή μου.

Πρόλογος

Οι νοροϊοί αποτελούν σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα, τα οποία εμπλέκονται στην πρόκληση επιδημικών εκδηλώσεων σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε επίπεδο πληθυσμών. Τα κέντρα ελέγχου και πρόληψης υπεύθυνα για τα σοβαρά κρούσματα γαστρεντερίτιδας που εμφανίζουν την αναμενόμενη κλινική εικόνα, υποβάλλουν ετήσιες εκθέσεις, σύμφωνα με τις οποίες οι ιοί αυτοί είναι υπεύθυνοι τουλάχιστον για το 96% όλων των περιπτώσεων μη βακτηριακής οξείας επιδημικής γαστρεντερίτιδας. Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής καταγράφονται ετησίως 23 εκατομμύρια μολύνσεις και εκτιμάται ότι παγκοσμίως τα μισά από όλα τα κρούσματα γαστρεντερίτιδας οφείλονται σε Νοροϊούς, γεγονός που καθιστά τον ιό αυτό, ως την περισσότερο κοινή αιτία εμφάνισης σποραδικής διάρροιας σε επίπεδο πληθυσμού.

Σήμερα η ιογενής γαστρεντερίτιδα είναι λίγο πολύ καλά τεκμηριωμένη στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, σε αντίθεση με την Ελλάδα, όπου τα επιδημιολογικά στοιχεία που αφορούν την ιογενή γαστρεντερίτιδα Νοροϊικής προέλευσης εξακολουθούν να είναι ελλιπή.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη σε μοριακό επίπεδο των κυκλοφορούντων Νοροϊικών στελεχών, η οποία θα μπορούσε να συμβάλει παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη, την παθογένεια και την εξάπλωση των ιών αυτών σε ένα δεδομένο πληθυσμό.

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 Ιστορική αναδρομή	12
1.2. Ταξινόμηση	14
1.3 Βιολογία των Νοροϊών	17
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά	17
1.3.2 Γονιδιακή οργάνωση	19
1.3.3 Δομή ιοσωματίου	20
1.3.4 Μετάφραση, επεξεργασία και λειτουργία των ιικών πρωτεϊνών	23
1.3.5 Αντιγραφή του ιικού RNA	24
1.4 Παθογένεια	25
1.4.1 Πρόσδεση στον υποδοχέα	25
1.4.2 Ο πολυμορφικός υποδοχέας των Νοροϊών	26
1.5 Ετερογένεια και εξέλιξη	28
1.5.1 Η εξέλιξη του καψιδίου	28
1.5.2 Αντιγονικές παραλλαγές και ανοσοποίηση	32
1.6 Επιδημιολογία	36
1.6.1 Πρόληψη και έλεγχος	38
1.6.2 Εμβόλια	39
1.7 Διαγνωστικές μέθοδοι	41
1.7.1 Ανίχνευση νουκλεϊνικού οξέος	41
1.7.2 Διαγνωστικές δοκιμές πρώτης γενιάς	42
1.7.3 Ηλεκτρονική μικροσκοπία	42
1.7.4 Ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία	43
1.7.5 Ανοσολογικές αντιδράσεις	43
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
2.1 Πειραματικά στελέχη	44
2.1.1 Περιβαλλοντικά δείγματα	44
2.1.2 Κλινικά δείγματα	45
2.2 Επεξεργασία δειγμάτων	46
2.2.1 Επεξεργασία περιβαλλοντικών δειγμάτων	46
2.2.2 Μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων	46

2.2.3 Μέθοδος προσρόφησης – έκλυσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα	47
2.2.4 Επεξεργασία κλινικών δειγμάτων	47
2.3 Εκχύλιση του ιικού RNA	48
2.4 Αντίστροφη Μεταγραφάση (Reverse Transcription – RT)	48
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	49
2.5.1 Εκκινητικά μόρια	49
2.5.2 Συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης	54
2.6 Κλωνοποίηση	59
2.6.1 Καθαρισμός των προϊόντων	59
2.6.2 Προσθήκη συμπληρωματικών άκρων	59
2.6.3 Μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων	60
2.6.4 Εύρεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των κλωνοποιημένων προϊόντων	64
2.6.5 Επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	65
2.6.6 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	65
2.6.7 Αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας	66
2.6.8 Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών	66
2.6.9 Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων	67
2.6.10 Αναζήτηση ανασυνδιασμών	68
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
3.1 Αποτελέσματα PCR, Autonested και Seminested	69
3.2 Φυλογενετική ανάλυση στελεχών	77
3.3 Ανασυνδυασμένα στελέχη	77
3.3.1 Κλινικό δείγμα Α6	77
3.3.2 Ανασυνδυασμένα στελέχη Νοροϊών GI.9/GII.6	83
3.3.3 Άλλοι ανασυνδυασμοί	92
3.3.4 Εύρεση νέου κυκλοφορούντος στελέχους	98
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ	108
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	110

Κατάλογος εικόνων

Αρίθμηση εικόνας	Θέμα	Σελίδα
1	Norwalk-type virus (calicivirus), 0.1 μm	13
2	Γενετική ταξινόμηση των Νοροϊών	16
3	Η δομή των μορίων Noroviral like particles (NVLP).	18

4	Η γονιδιακή δομή και οι περιοχές του καψιδίου των Νοροϊών.	20
5	Δομικές υπομονάδες του NV-VLP	22
6	Οι περιοχές και οι υποπεριοχές του καψιδικού μονομερούς NV.	22
7	Η δομή της Ρ περιοχής ενός καψιδίου GII.4 σε σύνδεση με τον υποδοχέα	25
8	Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των HBGAs, με ενζυμικές διαφοροποιήσεις από τα FUT1, FUT2 και FUT3 γονίδια.	28
9	Αλλαγές του αμινοξέος που προέκυψαν μέσα στις GII.4 υποομάδες.	29
10	Φυλογενετικό δέντρο της Ρ2 υποπεριοχής	30
11	Ποικιλομορφία των ιών GII.4 που χαρτογραφούνται επάνω σε διμερή	31
12	Πιθανοί επίτοποι στην επιφάνεια των GII.4 ιών	35
13	VLPs	40
14	Δομή των Νοροϊών στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο	42
15	Διάκριση μεταξύ μπλε και λευκών αποικιών	63
16	Ο φορέας κλωνοποίησης pGEM®-T Easy Vector System	63
17	Ενδεικτική εικόνα πέψης με EcoRI	64
18	Ενδεικτικό χρωματογράφημα	65
19	Στέλεχος Α6	78
20	Φυλογενετικό δέντρο Α6-ORF1	79
21	Φυλογενετικό δέντρο Α6-ORF2	80
22	Ανάλυση Simplot του στελέχους Α6	81
23	Ανάλυση BootScan του στελέχους Α6	82
24	Το σημείο πάνω στο γονιδίωμα που ενισχύθηκε στα περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα με τους εκκινητές NLVH297-NLVH896 και NVLR52-NLVR871	83
25	Φυλογενετικό δέντρο ORF1	88
26	Φυλογενετικό δέντρο ORF2	90
27	Ανάλυση SimPlot	91
28	Το σημείο πάνω στο γονιδίωμα που ενισχύθηκε στα περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα	93
29	Φυλογενετικό δέντρο ORF1	95
30	Φυλογενετικό δέντρο ORF2	96
31	Ανάλυση SimPlot	98
32	Το σημείο πάνω στο γονιδίωμα που ενισχύθηκε στο στέλεχος AK1	99
33	Φυλογενετικό δέντρο του AK1 στελέχους	100

Κατάλογος πινάκων

Αρίθμηση πινάκα	Θέμα	Σελίδα
1	Γενότυποι Νοροϊών	16
2	Ενδεικτική λίστα από VLPs ιικά μόρια και συνθετικά HBGAs	27
3	Οι ομάδες CamberwellandGrimsby εμφανίζουν παρόμοια αντιγονικότητα	32
4	Περιβαλλοντικά δείγματα	44
5	Κλινικά δείγματα	45
6	Εκκινητικά μόρια από την υπάρχουσα βιβλιογραφία	49
7	Εκκινητικά μόρια τα οποία σχεδιάστηκαν με βάση τις αλληλουχίες που προέκυψαν από τα θετικά δείγματα στην παρούσα διατριβή	51
8	Συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης.	54
9	Αποτελέσματα περιβαλλοντικών δειγμάτων	69
10	Αποτελέσματα κλινικών δειγμάτων	74
11	Αναλυτικός πίνακας όλων των περιβαλλοντικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό του ανασυνδυασμένου στελέχους Α6	84
12	Αναλυτικός πίνακας όλων των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό του ανασυνδυασμένου στελέχους Α6	86
13	Αναλυτικός πίνακας των κλινικών δειγμάτων	93

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

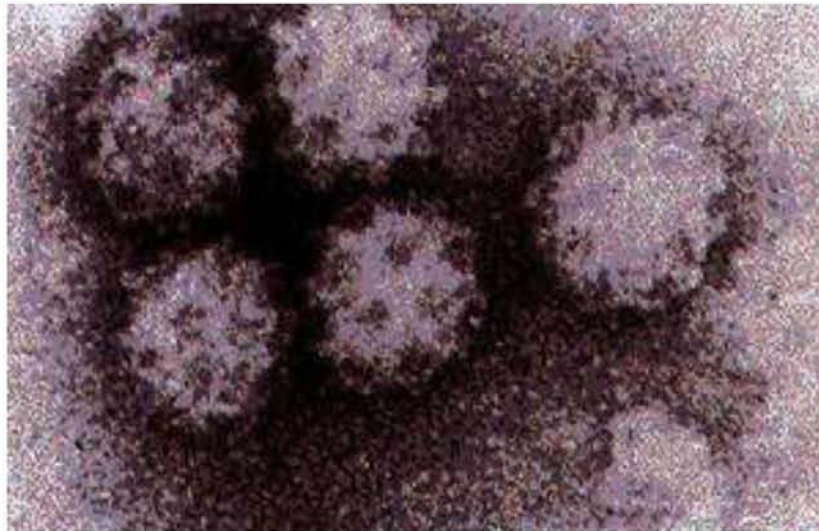
Εδώ και δεκαετίες οι Νοροϊοί αποτελούν σημαντικά παθογόνα που προσβάλλουν τον άνθρωπο, γνωστά για την πρόκληση επιδημικών εκδηλώσεων σοβαρής οξείας γαστρεντερίτιδας σε επίπεδο πληθυσμών (1-3). Η μόλυνση από Νοροϊό καθώς και τα συμπτώματα που αυτή προκαλεί, είναι γνωστά στην ιατρική βιβλιογραφία εδώ και 80 περίπου χρόνια. Συγκεκριμένα αναφέρονται σαν τη νόσο του χειμερινού εμετού, τη γρίπη στομάχων και τη γαστρική γρίπη, με την αναφορά στη γρίπη να απεικονίζει την έλλειψη γνώσης για τον συγκεκριμένο ιό επισημαίνοντας ταυτόχρονα το γεγονός, ότι οι Νοροϊοί και οι ιοί της γρίπης μοιράζονται παρόμοια εποχικότητα (4, 5).

Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου, ενισχύθηκε η υπόθεση ύπαρξης μη βακτηριακής και μη παρασιτικής αιτίας εμφάνισης γαστρεντερίτιδας η οποία δεν σχετίζεται με τον ιό της γρίπης. Σε πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες, διαπιστώθηκε ότι το 75% περίπου των περιπτώσεων εμφάνισης γαστρεντερίτιδας σε περίοδο 30 ετών, δεν είχε επαρκή αιτιολόγηση και παρουσίαζε οξεία και μεταδοτική μορφή, μη βακτηριακής προέλευσης (6). Παράλληλες κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε εθελοντές, στις Ηνωμένες Πολιτείες (7) και στην Ιαπωνία (8), οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ιικής φύσεως διηθητοί μολυσματικοί παράγοντες είχαν την ικανότητα να προκαλούν εντερική ασθένεια. Συγκεκριμένα, στις αναφερθείσες μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κοπράνων τα οποία είχαν προηγουμένως φιλτραριστεί για την απομάκρυνση των βακτηρίων και κατόπιν χορηγήθηκαν σε ενήλικες εθελοντές, οι οποίοι τελικά παρουσίασαν την νόσο.

Οι Νοροϊοί, οφείλουν το όνομά τους στον ιό που ανακαλύφθηκε πρώτος, τον Norwalk. Η πρώτη καταγεγραμμένη περίπτωση σημειώθηκε το 1968 κατά τη διάρκεια επιδημίας σε δημοτικό σχολείο στο Norwalk του Οχάιο (9), όπου το 60% περίπου του προσωπικού και των μαθητών νόσησε, ενώ λίγο αργότερα ακολούθησε και το 32% περίπου των συγγενών τους. Η ασθένεια χαρακτηριζόταν από ναυτία και έμετο σε ποσοστό άνω του 90% των ασθενών και από διάρροια στο 38%, ενώ η διάρκειά αυτής ήταν συνήθως από 12 έως

24 ώρες (10). Για την εξακρίβωση του αιτιολογικού παράγοντα του κρούσματος ακολούθησε η χορήγηση εκχυλισμάτων κοπράνων, ελεύθερων βακτηρίων, από τους προσβεβλημένους ασθενείς σε εθελοντές. Η φυσικοχημική επεξεργασία των παρασκευασμάτων αποκάλυψε ότι, πρόκειται για έναν μικρό σε μέγεθος (<36nm) αιτιολογικό παράγοντα ιικής φύσης. Κατόπιν, ακολούθησαν προσπάθειες αναπαραγωγής του παράγοντα αυτού σε κυτταροκαλλιέργειες και σε πειραματόζωα χωρίς επιτυχία (11).

Ο ιός παρατηρήθηκε για πρώτη φορά μέσω ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας (IEM) το 1972, (εικ.1).



Εικ.1 Norwalk-type virus (calicivirus), 0.1 μm

Τα σωματίδια του ήταν μικρά, μεγέθους από 27nm έως 32nm, σφαιρικά, με ένδειξη επιφανειακής δομής. Η μικροσκόπηση πραγματοποιήθηκε σε διηθήματα κοπράνων από τους εθελοντές των κρουσμάτων του Norwalk και από τους εθελοντές που ακολούθως μολύνθηκαν. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εύρεση του ιού βασίστηκε στην κατακρήμνιση των ιικών σωματιδίων, μετά από επεξεργασία με ορό ασθενών, οι οποίοι βρισκόταν σε φάση ανάρρωσης (12).

Με την πάροδο του χρόνου ανακαλύφθηκαν και άλλοι ιοί, οι οποίοι έχουν την ικανότητα πρόκλησης κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας και εμφανίζουν παραπλήσια μορφολογική δομή με τον ιό του Norwalk, όπως ο Hawaii και ο

Snow Mountain (13,14), οι οποίοι όμως έχουν διαχωριστεί από τους Νοροϊούς και φέρουν το όνομα SLVs (Sapporo-likeviruses) (15).

Από τα τέλη της δεκαετίας του '80, ξεκίνησε η προσπάθεια για την μοριακή ανάλυση των Νοροϊών. Έτσι επιτεύχθηκε η πραγματοποίηση του αρχικού χαρακτηρισμού του RNA γενώματος του ιού και εν συνεχεία, ο χαρακτηρισμός του ως μέλος των Caliciviridae. Τα επόμενα χρόνια, ακολούθησε η περαιτέρω ανάλυση του γενώματος του Norwalk ιού (16), καθώς και η ανάλυση των γενωμάτων και άλλων Νοροϊών που εμπλέκονται στην μολυσματική γαστρεντερίτιδα. Το 1993 ανακοινώθηκε η πλήρης αλληλουχία του Southampton ιού, ο οποίος απομονώθηκε από ένα παιδί 2 ετών, σε ένα οικογενειακό κρούσμα γαστρεντερίτιδας στο Southampton του Ηνωμένου Βασιλείου το 1991 (17). Ακολούθησε η κλωνοποίηση του γενώματος ιών που ευθύνονται για προσβολή σε ζωικούς οργανισμούς εμπορικής εκμετάλλευσης, όπως ο SW43 των χοίρων και ο Jena των βοοειδών και οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν επίσης ως Νοροϊοί (18, 19).

Σήμερα, για την ανίχνευση των νοροϊών χρησιμοποιούνται οι αντιδράσεις RT-PCR (20). Εντούτοις η ανίχνευση παραμένει δύσκολη, κυρίως λόγω της ιδιαίτερα μεταβλητής φύσης του ιού αλλά και λόγω των αλλαγών που προκαλούνται κατά την εξαγωγή του ιού από το προς εξέταση δείγμα.

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

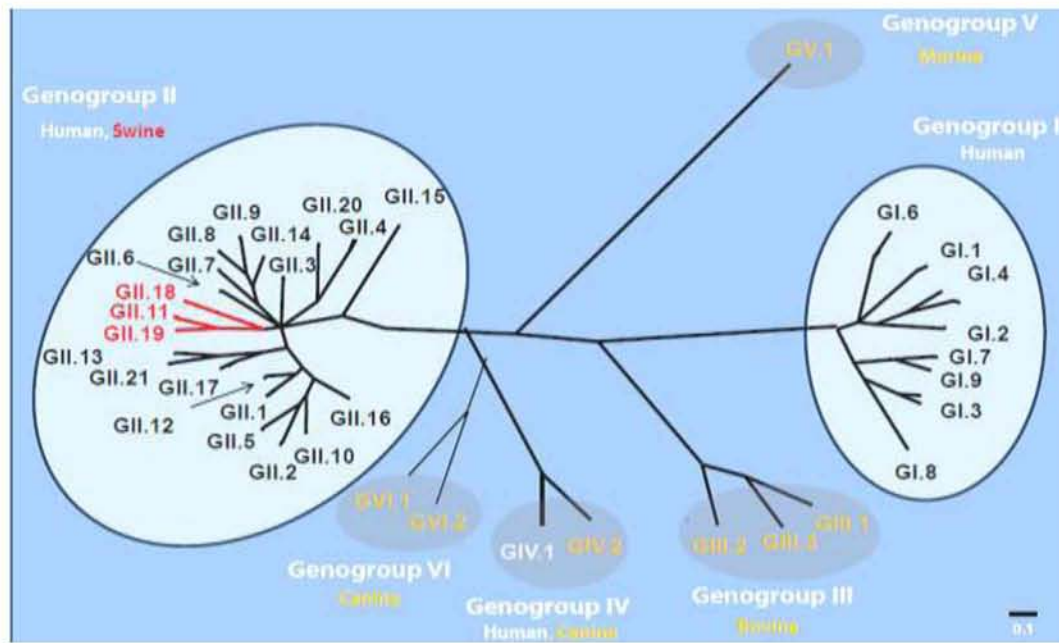
Το σύστημα ταξινόμησης που εφαρμόζεται για έναν οργανισμό συνήθως αντανακλά το επίπεδο της γνώσης το οποίο είναι διαθέσιμο για την μελέτη του δεδομένου οργανισμού την χρονική περίοδο ανάπτυξης του συγκεκριμένου ταξινομικού σχήματος. Έτσι, η ταξινόμηση των Νοροϊών ακολουθεί την παραπάνω διαπίστωση, καθώς ακολουθήθηκαν διάφορα ταξινομικά σχήματα μέχρι την ανάπτυξη του συστήματος κατάταξης που είναι σήμερα αποδεκτό για τους Νοροϊούς (21).

Για περίπου 20 χρόνια, από την δεκαετία του 1970 έως την δεκαετία του 1990, το πρότυπο στέλεχος των Νοροϊών Norwalk καθώς και άλλοι μικροί κυκλικοί ιοί (SRSVs) κατατάχθηκαν σε ένα πλήθος ιικών ομάδων. Ωστόσο, η ιική οικογένεια Caliciviridae που δημιουργήθηκε το 1979 επικράτησε και

περιλάμβανε τους ιούς που έφεραν θετικής πολικότητας RNA με χαρακτηριστική μορφολογική απεικόνιση 32 κυπελλοειδών κοιλοτήτων στην επιφάνεια του ιοσωματίου, εικοσαεδρικής συμμετρίας (22).

Μέχρι σήμερα, η τεχνολογία της RT-PCR έχει επιτρέψει τον μοριακό χαρακτηρισμό πολλών στελεχών Νοροϊών από δείγματα γαστρεντερικής και εντερικής εκκένωσης και την κλωνοποίησή τους, με αποτέλεσμα οι συγκρίσεις της ακολουθίας που προέκυψαν, μετά την εφαρμογή αυτών των τεχνικών, να δείξουν ότι οι Νοροϊοί μπορούν να ταξινομηθούν σε τουλάχιστον έξι γενετικές ομάδες, κυρίως με βάση την ομοιότητα στις ιδιαίτερα συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος, όπως της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RdRp) και της περιοχής της VP1 καψιδικής πρωτεΐνης (23, 24). Δύο από αυτές τις γενετικές ομάδες, αποκαλούμενες genogroups I και II (GI και GII), περιέχουν την πλειοψηφία των Νοροϊών που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Επίσης, από τη φυλογενετική ανάλυση τους, προκύπτει ότι και άλλοι Calici ιοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση μολύνσεων σε βοοειδή, χοίρους και ποντίκια, εμπίπτουν επίσης στο γένος των Νοροϊών, (25-29). Οι παθογόνοι Calici ιοί που προσβάλλουν κυρίως τα βοοειδή, συγκεντρώνονται σε μία προτεινόμενη GIII ομάδα, αν και τα μέλη της εμφανίζουν πιο πολλές ομοιότητες με την ομάδα GI (25-27). Η φυλογενετική ανάλυση τοποθετεί τουλάχιστον δύο στελέχη Νοροϊών που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, σε μια προτεινόμενη GIV ομάδα: στελέχη Alphantron (Genbank accession number AF195847) και Ft. Lauderdale (Genbank accession number AF414426) (30).

Πρόσφατα, ερευνητικές ομάδες αναφέρθηκαν σε Νοροϊούς οι οποίοι προσβάλλουν σαρκοφάγα κατοικίδια. Οι CanineNoV (CaNoVs) ανήκουν στη νέα προτεινόμενη γενετική ομάδα GVI. Οι ιοί αυτοί βρέθηκαν σε δείγματα κοπράνων από σκυλιά με συμπτώματα διάρροιας σε Πορτογαλία και Ιταλία (31).



Εικ.2 :Γενετική ταξινόμηση των Νοροϊών, CDC,2013.

Οι Νοροϊοί των γενετικών ομάδων GI και GII μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε γενότυπους (clusters), (πίνακας 1).

Πίνακας 1. Γενότυποι Νοροϊών

Virus Name	Accession Number	G	gc	Outbreak Site	Year	Carbohydrate-binding ^b								
						Le ^c	H1	Le ^a	Le ^b	H2	Le ^x	Le ^y	H3	A
Norwalk	M87661	I	1	Norwalk, OH, USA	1968	o	+	o	+	+	o	+	+	+
Hawaii	U07611	II	1	Hawaii, USA	1971	nd	o	o	o	nd	nd	nd	o	o
Snow Mountain	AY134748	II	2	Snow Mountain, CO, USA	1976	nd	o	o	o	nd	nd	nd	o	o
Mexico	U22498	II	3	Mexico City, Mexico	1988	nd	+	nd	+	nd	nd	nd	nd	+
Grimsby	AJ004864	II	4	Grimsby, UK	1995	o	+	o	+	+	o	+	nd	+
VA387	AY038600	II	4	Virginia, USA	1998	nd	+	o	+	nd	o	+	nd	+
MOH	AF397156	II	5	Three cities in Hungary	1999	nd	+	o	+	nd	o	n	nd	+
VA207	AY038599	II	na	Virginia, USA	1997	nd	o	+	o	nd	+	n	nd	o

^aAbbreviations: G, genogroup; gc, genetic cluster; Le, Lewis; na, not assigned [4] or nominally assigned gc 8 [19]; nd, not done; o, no binding; +, binding; +sr, bind by saliva and red blood cell binding assays; +s, binding inferred by saliva binding assays.

^bCarbohydrates listed below.

Le^c: H type 1 precursor, Galβ1,3GlcNAcβ-

H1: H type 1, Le^d, Fucα1,2Galβ1,3GlcNAcβ-

Le^a: Galβ1,3(Fucα1,4)GlcNAcβ-

Le^b: Fucα1,2Galβ1,3(Fucα1,4)GlcNAcβ-

H2: H type 2, Fucα1,2Galβ1,4GlcNAcβ-

Le^x: Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ-

Le^y: Fucα1,2Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ-

H3: H type 3, Fucα1,2Galβ1,3GalNAcα-

A: GalNAcα1,3(Fucα1,2)Galβ-

B: Galα1,3(Fucα1,2)Galβ-

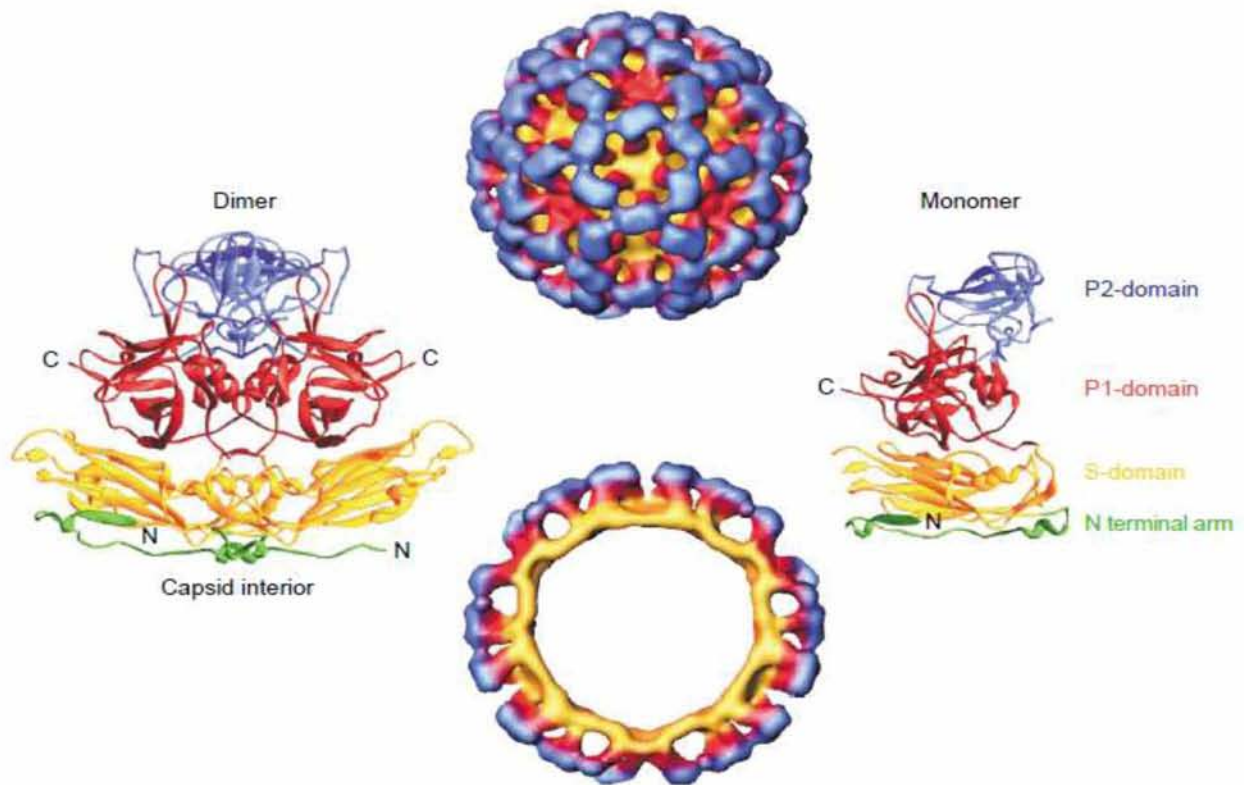
Έτσι, για την ταξινόμηση των Νοροϊών, χρησιμοποιούνται συστήματα γενοτυπικής ανάλυσης των στελεχών, που εντοπίζονται σε κάθε περίοδο του έτους, τα οποία βασίζονται στη γενετική συγγένεια που εμφανίζει η κύρια καψιδική πρωτεΐνη (στην πλήρη ή μερική αλληλουχία της) και η οποία αντιστοιχεί στην αντιγονική μοναδικότητα που εμφανίζει το κάθε στέλεχος. Σύμφωνα με ένα από τα πιο πρόσφατα γενοτυπικά συστήματα, οι Νοροϊοί διαιρούνται σε έξι γενετικές ομάδες που ονομάζονται GI έως GVI. Οι ομάδες GI, GII και GIII υποδιαιρούνται περαιτέρω σε 8, 19 και 2 γενότυπους αντίστοιχα, ενώ οι ομάδες GIV, GV και GVI περιλαμβάνουν από έναν μόνο γενότυπο, (31, 32), (εικ.2).

Τα στελέχη του ιού μπορούν να εμφανίζονται ταυτόχρονα, καθώς διαφορετικά στελέχη μπορούν να εμφανίζονται σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και σε διαφορετικούς χρόνους, όμως η ομάδα GII.4 των Νοροϊών είναι η κυρίαρχη, με στελέχη που ανιχνεύονται στον πληθυσμό από τη δεκαετία του '80 μέχρι σήμερα (30, 32, 33).

1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η επιτυχής κλωνοποίηση του γονιδιώματος του ιού, από δείγματα κοπράνων (34), επέτρεψε να χαρακτηριστεί ο ιός ως Calici, δηλαδή ότι κατέχει ένα γραμμικό, θετικής πολικότητας, μονόκλωνο γένωμα RNA (ssRNA), 7,7 κιλοβάσεων περίπου, το οποίο προστατεύεται από το περιβάλλον από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, αλλά δεν περιβάλλεται από φάκελο. Το καψίδιο αυτό, αποτελείται από μια σημαντική πρωτεΐνη, γνωστή ως πρωτεΐνη 1 (VP1) και μερικά αντίγραφα μιας δεύτερης μικρής δομικής πρωτεΐνης που είναι γνωστή ως VP2, (εικ. 3), (34-36).



Εικ.3. Η δομή των μορίων Noroviral like particles (NVLP). Μικροσκοπική αναδημιουργία με χρήση κρύο – ηλεκτρονικής μικροσκοπίας 22Å και κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, σε 3,4Å. Τα NV VLPs σχηματίζουν 90 διμερή του πρωτεϊνικού καψιδίου (αριστερά, επάνω διάγραμμα) σε T=3 εικοσαεδρική συμμετρία. Κάθε μονομερής καψιδική πρωτεΐνη (δεξιά, επάνω διάγραμμα) διαιρείται σε μία άμινο-τελική περιοχή βραχιόνων (πράσινο), που βρίσκεται πρόσωπο με πρόσωπο με το εσωτερικό του VLP, μια περιοχή αναδιπλώσεων (S-περιοχή, κίτρινο) η οποία σχηματίζει την συνεχή επιφάνεια του VLP και μια προεξέχουσα περιοχή (P-περιοχή) η οποία προέρχεται από την επιφάνεια της S-περιοχής. Η P-περιοχή διαιρείται περαιτέρω σε υποπεριοχές, τις P1 και P2 (κόκκινο και μπλε, αντίστοιχα) με την P2-υποπεριοχή να βρίσκεται στην πιο ακραία επιφάνεια του VLP (35-37).

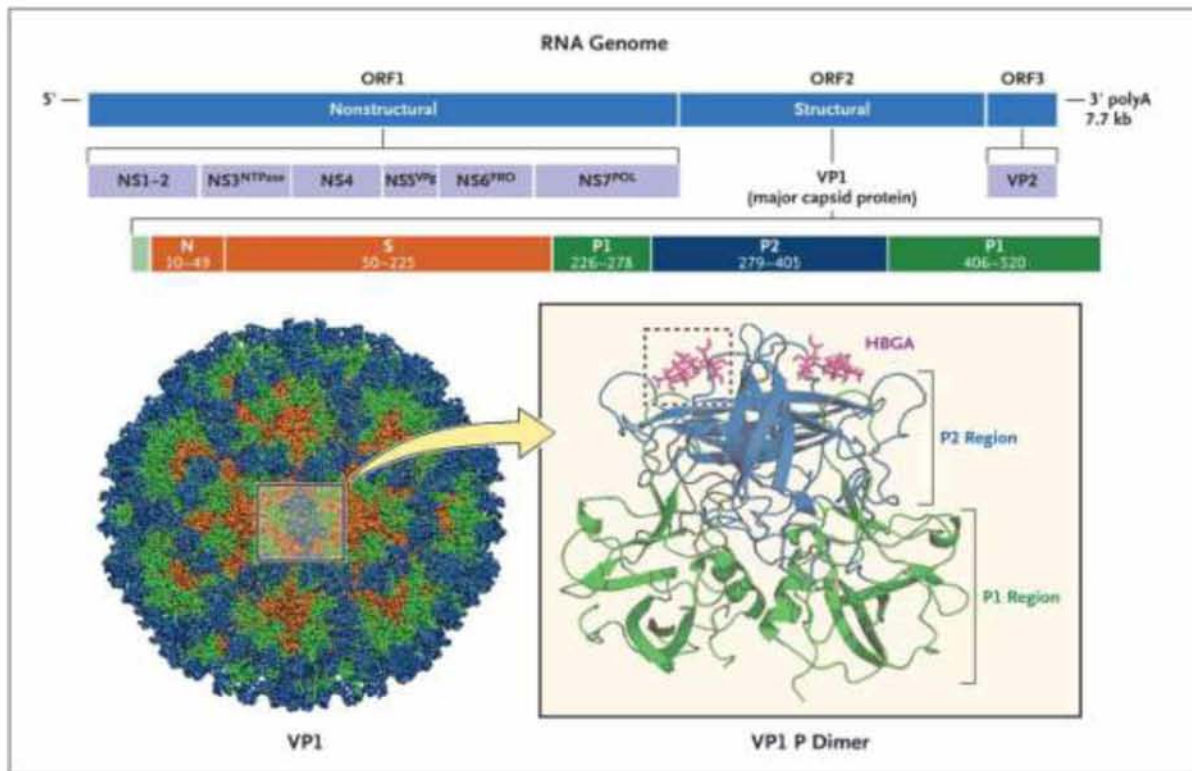
Οι Νοροϊοί ταξινομούνται ως βιολογικοί παράγοντες κατηγορίας Β λόγω της υψηλής μολυσματικής τους ικανότητας, μικρότερη από 10 ισωμάτια ανά άτομο (ID₅₀) και λόγω της σταθερότητάς που παρουσιάζουν στο περιβάλλον, όπως της ανθεκτικότητας τους σε χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες (60°C), στην απολύμανση με χλώριο, με οινόπνευμα και στα μέτρα απολύμανσης των χεριών (38).

Παρά το σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο και την ιδιαίτερη νοσηρότητα που προκαλείται από την προσβολή του ανθρώπου, μέχρι σήμερα κανένα φάρμακο ή εμβόλιο δεν είναι διαθέσιμο, για την θεραπεία ή την πρόληψη του ανθρώπου από τον ιό. Επιπλέον, πολλές πτυχές της βιολογίας του ιού δεν

έχουν γίνει πλήρως κατανοητές. Το γεγονός αυτό, αποδίδεται κυρίως στην απουσία ενός συστήματος κυτταροκαλλιέργειας και στην εύρεση ενός κατάλληλου μικρού ζωικού προτύπου για περαιτέρω μελέτες (39, 40). Μόνη εξαίρεση αποτελεί ο Νοροϊός των ποντικών (*murine norovirus*), ο οποίος είναι το μόνο μέλος του γένους των Νοροϊών το οποίο αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε πρωτογενή καλλιέργεια μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων σχηματίζοντας πλάκες σε κύτταρα RAW264.7, μια συνεχή κυτταρική σειρά με μορφολογία μακροφάγων ποντικίου (41).

1.3.2 Γονιδιακή οργάνωση

Η λεπτομερής κατανόηση της γονιδιακής οργάνωσης του ιού άρχισε να διευκρινίζεται περίπου το 1990, όταν οι Jiang και Estes κλωνοποίησαν (42) και αλληλούχισαν το γένωμα του ιού. Πρόκειται για ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA, περίπου 7.700 βάσεων το οποίο περιλαμβάνει τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), που κωδικοποιούν για τα δομικά και τα μη δομικά γονίδια, (εικ.4). Το ιικό RNA, συνδέεται ομοιοπολικά με μια προερχόμενη από τον ιό πρωτεΐνη γνωστή ως VPg, η οποία προσδένεται στο 5' άκρο και εικάζεται ότι παίζει κάποιο ρόλο στην μεταφορά του γονιδιώματος στις περιοχές της αρνητικής σύνθεσης των κλώνων, ενώ το 3' άκρο του γονιδιώματος φέρει μια πολυA ουρά (43). Το ORF1 είναι περίπου 5 KB και αποτελεί τα πρώτα δύο τρίτα του γονιδιώματος, (εικ. 4). Το τελευταίο ένα τρίτο του γονιδιώματος αποτελείται από τις δύο δομικές πρωτεΐνες, την ORF2, η οποία είναι περίπου 1,8 KB και κωδικοποιεί την 57 kDa δομική καψιδική πρωτεΐνη VP1 και την ORF3 που είναι 0,6 KB και κωδικοποιεί μια μικρότερη βασική πρωτεΐνη των 22 kDa, στην οποία αποδίδεται η συσκευασία του γονιδιώματος σε ιοσωμάτια, (εικ. 4).



Εικ.4. Η γονιδιακή δομή και οι περιοχές του καψιδίου των Νοροϊών.

Το γονιδίωμα των Νοροϊών αποτελείται από τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης τα: ORF1, κωδικοποιεί για τις μη δομικές πρωτεΐνες, ORF2 και ORF3 που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένης της VP1, η οποία είναι η σημαντικότερη καψιδική πρωτεΐνη και της VP2, που είναι η δευτερεύουσα δομική πρωτεΐνη. Το μη δομικό πολυπρωτεϊνικό μέρος υποβάλλεται σε επεξεργασία από την ιική πρωτεάση Pro (3C- like protease) σε έξι ώριμες πρωτεΐνες: τη N-terminal πρωτεΐνη, τη NTPase, την p20 της οποίας η λειτουργία παραμένει άγνωστη, την VPg, η οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του γονιδιώματος και την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (POL). Η VP1 πρωτεΐνη, διαιρείται περαιτέρω σε δύο κύριες περιοχές, την περιοχή κελύφους (S) και την περιοχή του προεξέχοντος βραχίονα (P). Η περιοχή P διαιρείται περαιτέρω σε P1 και P2.

1.3.3 Δομή ιοσωματίου

Ένας σημαντικός περιορισμός για την περαιτέρω έρευνα πάνω στους Νοροϊούς αποτελεί η έλλειψη ενός λειτουργικού συστήματος κυτταροκαλλιέργειας ή ενός μικρού ζωικού προτύπου. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένα συστήματα έκφρασης, τα οποία έχουν ως σκοπό την άφθονη παραγωγή της καψιδικής πρωτεΐνης, η οποία μπορεί και μετατρέπεται σε "ϊικά σωματίδια" (virus-like particles, VLPs). Τα μόρια VLPs είναι μορφολογικά και αντιγονικά όμοια με τον εγγενή ιό (44, 45), περιέχουν δηλαδή τις σημαντικότερες αντιγονικές ιδιότητες των στελεχών του ιού που αντιπροσωπεύουν και όταν παράγονται σε επαρκείς ποσότητες,

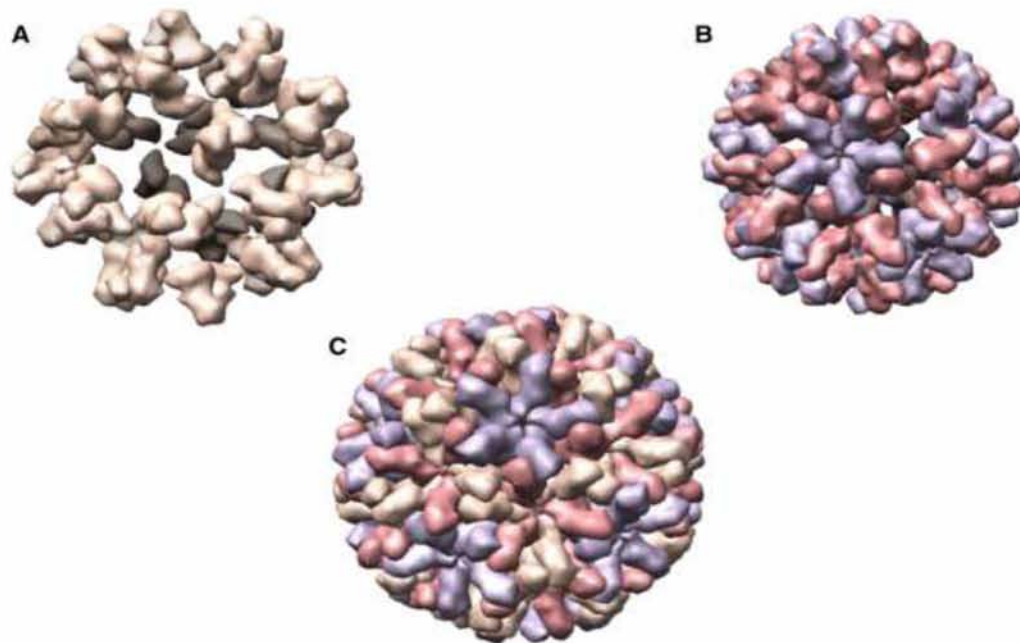
αποτελούνσημαντικά αντιδραστήρια για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ιού και των μορίων στόχων.

Δύο συστήματα έκφρασης έχουν ξεχωρίσει μέχρι στιγμής, το Baculovirus replicon και το Venezuelan equine encephalitis (VEE) replicon, (46). Το σύστημα replicon Baculovirus χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ενός VLP του ιού του Νόργουσκ (NV) (GI.1). Ο ιός που προέκυψε χαρακτηρίστηκε με την βοήθεια της Cryo-EM (κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας), της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και της υπολογιστικής απεικόνισης και αποκάλυψε τη δομή του καψιδίου των Νοροϊών (47, 48), (εικ 5). Η κρυσταλλική δομή του ιού, έδειξε ότι το ιικό καψίδιο συγκροτείται χρησιμοποιώντας 180 αντίγραφα της καψιδικής πρωτεΐνης, τα οποία οργανώνονται σε 90 διμερή με μια εικοσαεδρική συμμετρία $T=3$, (48). Επιπλέον, ευδιάκριτα διμερή ενώνονται και διαμορφώνουν μια υψηλότερη δομή προσδίδοντας στο μόριο το σχήμα κυπέλλου (47), (εικ.5).

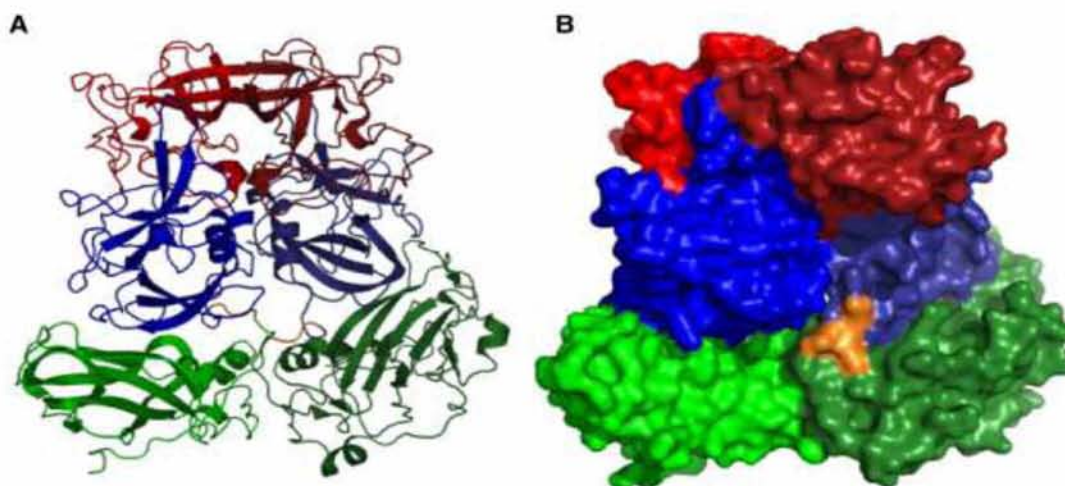
Έτσι, τα C:C διμερή επιτελούν σημαντικό ρόλο για τη διαμόρφωση του εσωτερικού κοχυλιού, του καψιδίου (εικ.5A), ενώ τα A:B διμερή επεκτείνονται πέρα από την επιφάνεια (εικ.5B, 6A και 6B). Το πλήρες καψίδιο (εικ. 5C) εκμεταλλεύεται την στρατηγική αυτή και διαμορφώνει ένα σφιχτό ιικό καψίδιο με τις απαραίτητες προεξοχές στην επιφάνεια, οι οποίες μπορούν και αλληλεπιδρούν με τον κυτταρικό υποδοχέα, κάνοντας έτσι εφικτή την ιική πρόσδεση και είσοδο, (εικ. 5C).

Το μονομερές διαιρείται περαιτέρω σε δύο περιοχές γνωστές ως περιοχή κοχυλιών (S), η οποία διαμορφώνει τον εσωτερικό πυρήνα και την προεξέχουσα περιοχή (P), που συνδέεται με μια εύκαμπτη άρθρωση (εικ. 4A και B). Η περιοχή P, διαμορφώνει τις χαρακτηριστικές προεξοχές που εκτείνονται μακριά από τη δομή και διαιρείται με την σειρά της σε δύο υποπεριοχές, (εικ. 6A και 6B). Οι υποπεριοχές αυτές περιλαμβάνουν, την P1 (αμινοξέα 226-278 και 406-520), που ενεργεί ως περιοριστική περιοχή μεταξύ του S και της δεύτερης P κατηγορίας και την P2, η οποία είναι η περισσότερο εκτεθειμένη περιοχή της καψιδικής πρωτεΐνης (αμινοξέα 279-405), (47), (εικ.6A και 6B).

Η ακολουθία της P2 είναι η πιο μεταβλητή περιοχή στο γονιδίωμα των Νοροϊών, περιέχει την περιοχή δέσμευσης υδατανθράκων (S) και ένα μοτίβο παρόμοιο με μια RNA – δεσμεύουσα περιοχή (47, 49-51).



Εικ. 5. Δομικές υπομονάδες του NV-VLP. Για τον σχηματισμό του VLP απαιτείται η αλληλεπίδραση δύο διαφορετικών διμερών. (A): Η C:C αλληλεπίδραση των διμερών διαμορφώνει τον σχηματισμό «σφιχτό κοχύλι», (B): A:B διμερή, (C): Τα A:B διμερή εισέρχονται στον σχηματισμό C:C σχηματίζοντας ένα σφιχτό καψίδιο με προεξοχές.



Εικ. 6. Οι περιοχές και οι υποπεριοχές του καψιδικού μονομερούς NoV. 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. Το μονομερές διαιρείται σε δύο περιοχές, την περιοχή σχηματισμού κοχύλι (πράσινη) και τις προεξέχουσες περιοχές (P). Η περιοχή P διαιρείται περαιτέρω σε P1 (μπλε) και P2 (κόκκινο). Η P1 είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση του διμερούς, ενώ η P2 είναι η περισσότερο εκτεθειμένη υποπεριοχή του ιού. Η εύκαμπτη περιοχή (πορτοκαλί) που βρίσκεται μεταξύ της S και της P περιοχής επιτρέπει την ευελιξία για τη διαμόρφωση του σχηματισμού του καψιδίου. (A) απεικόνιση του A:B διμερούς και (B) απεικόνιση της επιφάνειας του A:B διμερούς.

1.3.4 Μετάφραση, επεξεργασία και λειτουργία των ιικών πρωτεϊνών

Η ORF1 πρωτεΐνη, μεταφράζεται σε μία μεγάλη πολυπρωτεΐνη, η οποία αυτοδιασπάται σε έξι μη δομικές πρωτεΐνες από την ιική 3C – πρωτεάση κυστεΐνης, (εικ.1). Τα επεξεργασμένα πρωτεϊνικά προϊόντα από το N – άκρο προς C – άκρο περιλαμβάνουν τα εξής: μία N – τελική πρωτεΐνη (p48) μεταξύ 37–48 kDa, μια 2C –νουκλεοτιδική τριφωσφατάση (NTPase) περίπου 40 kDa, μια 3A πρωτεΐνη περίπου 20 kDa (p20), την VPg πρωτεΐνη (16 kDa) η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στο 5´άκρο του γονιδιώματος, την 3C πρωτεάση (Pro) 19 kDa και την 3D – RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (Pol) μεγέθους 57 kDa (52).

Η λειτουργία της N–τελικής πρωτεΐνης (p48) παραμένει ακόμη άγνωστη, ωστόσο, 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, (53,54). Η νουκλεοτιδική τριφωσφατάση (NTPase) δεσμεύει και υδρολύει NTPs, ενώ η VPg πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την μεταγραφή και είναι πιθανό να εμπλέκεται στην έναρξη της μετάφρασης, όπως έδειξαν πρόσφατες μελέτες (55-59).

Η πρωτεάση (Pro), μοιράζεται ομοιότητες με την κυτταρική χυμοθρυψίνη-like πρωτεάση σερίνης (59) και περιέχει την ίδια αλληλουχία αμινοξέων που έχει βρεθεί και στην 3C πρωτεάση των *ricorna* ιών. Επίσης, επεξεργάζεται την πολυπρωτεΐνη ORF1 των Νοροϊών στις μεμονωμένες μη δομικές πρωτεΐνες, (60-63). 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 (61 – 63). Η His 157, είναι απαραίτητη στο υπόστρωμα πρόσδεσης (64). Η πρωτεάση (Pro), εκτός από τον βασικό της ρόλο στην επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης, αναστέλλει επίσης την κυτταρική μετάφραση διασπώντας ορισμένους τομείς των πολυ-Αδεσμευτικών πρωτεϊνών, οι οποίες προσδένουν τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης και του RNA (64).

Η Pol 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 (65). Οι λειτουργίες της ιικής Pol στην αντιγραφή του ιικού γενώματος, για την

σύνθεση του RNA, πραγματοποιούνται με την χρησιμοποίηση ενός VPg – εκκινητικού μηχανισμού και της πολυαδενυλιωμένης ουράς στο 3' άκρο ως εκμαγείο (65).

1.3.5 Αντιγραφή του ιικού RNA

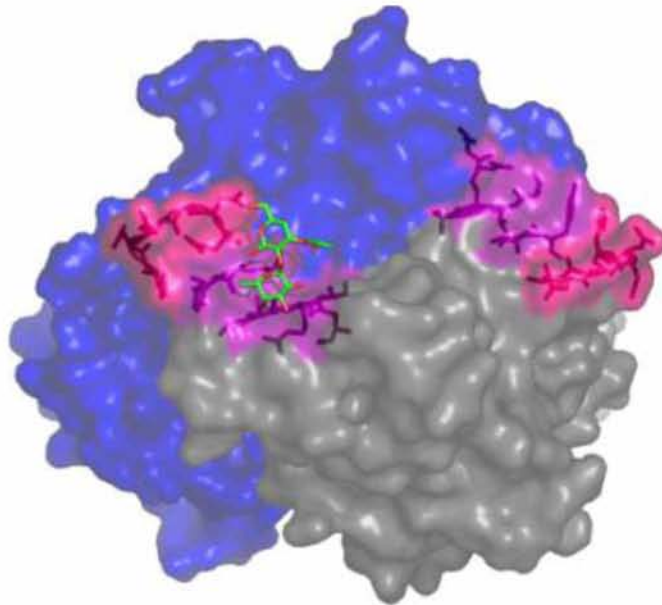
Αν και οι Νοροϊοί περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1972 (66), ο μηχανισμός αντιγραφής του ιού παραμένει, εν μέρει, άγνωστος. Πιστεύεται ότι το γενωμικό RNA λειτουργεί ως εκμαγείο για την σύνθεση του αρνητικού κλώνου, ο οποίος τελικά χρησιμοποιείται για την αντιγραφή ολόκληρου του θετικού RNA γενώματος, το οποίο χρησιμοποιείται με την σειρά του για την παραγωγή νέων ιικών σωματιδίων και για την παραγωγή υπογενωμικών RNA, καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα, ότι κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του γενωμικού θετικού κλώνου και του υπογενωμικού RNA, η πολυμεράση ουριδυλιώνει την VPg πρωτεΐνη, παρουσία του πολυαδενυλιωμένου γενωμικού RNA και έτσι η VPg διεγείρει την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Έτσι η πολυμεράση δεν απαιτεί εκκινητικά μόρια για την αντιγραφή του αρνητικού κλώνου RNA. Ακολούθως, η αντιγραφή του γενωμικού RNA εντοπίζεται στην περιοχή συγκρότησης, οδηγούμενη πιθανόν από τοπικά σήματα στην ORF1 γενωμική περιοχή (67), όπου και πακετάρεται σε ιοσωμάτια.

Τα επόμενα στάδια της συναρμολόγησης του ιικού σωματιδίου, της ωρίμανσης και της περαιτέρω απελευθέρωσης του από το κύτταρο ξενιστή δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά. Έχει αποδειχθεί ότι τα VPg – συνδεόμενα γενωμικά και υπογενωμικά RNA μόρια δεν συσκευάζονται μαζί στο ίδιο ιοσωμάτιο, αφού σε πειραματικές προσεγγίσεις βρέθηκε, ότι υπάρχει το κάθε είδος μορίου σε σωματίδια διαφορετικών πυκνοτήτων (68).

1.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

1.4.1 Πρόσδεση στον υποδοχέα

Οι αρχικές αλληλεπιδράσεις των Νοροϊών με τα κύτταρα ξενιστές, δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως. Ωστόσο, απαραίτητη προϋπόθεση για την είσοδο του ιού στα κύτταρα, αποτελεί η αναγνώριση του υποδοχέα στην επιφάνεια τους. Συγκεκριμένα, η σύνδεση των Νοροϊών με τα κύτταρα ξενιστές περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασή τους με ειδικούς υδατανθρακικούς (Histoblood Group Antigens) υποδοχείς (69). Η ικανότητα των νοροϊών να προσδένονται στους HBGAs υποδοχείς, πιθανολογείται ότι καθορίζεται από ειδικά αμινοξέα, τα οποία εντοπίζονται στην P2 υποπεριοχή του καψιδίου, όπως περιγράφηκε και για την P δομική περιοχή του στελέχους VA387 με το σύμπλοκο A (συνθετικό) και το B τρισακχαρίδιο (51), (εικ.7).



Εικ.7. Η δομή της P περιοχής ενός καψιδίου GI.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.
B-τριμερές: πράσινο, αλυσίδα A: μπλε, Αλυσίδα B: γκρίζο, (51).

1.4.2 Ο πολυμορφικός υποδοχέας των Νοροϊών

Εχει πειραματικά αποδειχτεί ότι τα ιικά μόρια VLPs μπορούν και ενώνονται με τους υδατάνθρακες των ομάδων αίματος HBGAs οι οποίοι αποτελούν σημαντικά μόρια για την ιική περάτωση της μόλυνσεως in vivo (70-76). Οι υποδοχείς αυτοί, ανήκουν στην οικογένεια ενός συμπλέγματος πολυσακχαριδίων, βρίσκονται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων και εκφράζονται στο εντερικό και αναπνευστικό επιθήλιο. Επίσης, έχουν βρεθεί και σε άλλες βιολογικές εκκρίσεις, όπως τη σίελο, (76). Η έκφραση των HBGAs, ρυθμίζεται από ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων, τα οποία και καθορίζουν ποιο από τα τρία βιοχημικά μονοπάτια θα ακολουθεί. Αυτή η ποικιλία επιλογής, οδηγεί στο πολυμορφικό σύστημα ABO, στο Lewis και στην ποικιλία φαινοτύπων, (εικ. 8). Η σύνθεση των HBGAs ξεκινάει με έναν πρόδρομο δισακχαρίτη (Galb1-3GlcNAc, μονοπάτι 1) όπου στην συνέχεια προστίθενται, διαδοχικά, μονοσακχαρίτες από διαφορετικές γλυκοσυλτρανσφεράσες (glycosyltransferases). Το προϊόν του γονιδίου FUT3, γνωστό και ως ένζυμο Lewis, κωδικοποιεί μια fucosyltransferase, η οποία προσθέτει κατάλοιπα φουκόζης στους 1,3 ή 1,4 συνδέσμους του πρόδρομου μορίου οδηγώντας έτσι, στην σύνθεση του τρισακχαριδίου (Lea) του Lewis A φαινοτύπου. Για να πραγματοποιηθεί το μονοπάτι και να ολοκληρωθεί ο φαινότυπος, απαραίτητη είναι η συμμετοχή του FUT2 γονιδίου, που κωδικοποιεί με την σειρά του μια fucosyltransferase, η οποία προσθέτει μονοσακχαρίτες στη σύνδεση 1,2, δημιουργώντας τελικά το αντιγόνο H τύπου 1. Η παρουσία ή απουσία των FUT2 ή FUT3 αλληλόμορφων γονιδίων σε έναν οργανισμό, μπορεί να καθορίσει το εάν θα είναι επιρρεπής στην προσβολή από Νοροϊό (77), (πίνακας 2).

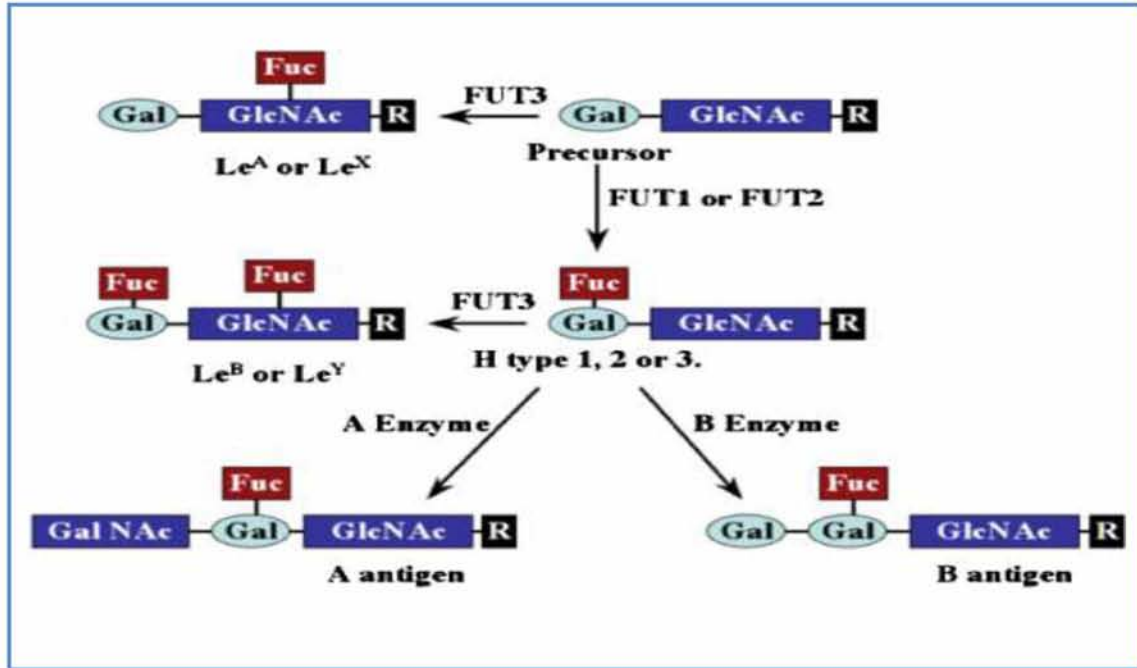
Πίνακας 2. Ενδεικτική λίστα από VLPs ιικά μόρια και συνθετικά HBGAs.

VLP	GG	Year	Le ^A	HI	Le ^B	A	B	H3	Le ^X	Le ^Y
Norwalk	I.1	1968		X	X	X		X		
West Chester	I.1	2001						X		
SoV	I.2	1999	X					X		
DSV	I.3	1999	X			X				
Chiba	I.4	2000	X							
HV	II.1	1971				X				
Weisbaden	II.1	2001								
SMV	II.2	1976						X		
Buds	II.2	2002								
Ina	II.2	2002								
TV	II.3	1999				X		X		
GII.4.1987	II.4	1987						X		X
GII.4.1987.D393G	II.4	2007*				X	X	X		
GII.4.1997	II.4	1997				X	X	X		X
GII.4.2002a	II.4	2002		X		X			X	
GII.4.2002	II.4	2004						X		X
GII.4.2004	II.4	2004								
GII.4.2005	II.4	2005								
GII.4.2006	II.4	2006				X	X	X		
M7	II.4	1999								
MNV	V	2004								

VLP, virus-like particle; GG, genogroup and genocluster.

*A mutant generated in 2007.

Από μελέτες προσβολής του ιού σε πληθυσμούς, καθώς και από πειράματα πρόκλησης προσβολής του ιού σε εθελοντές, προέκυψαν σημαντικές ενδείξεις ότι η έκφραση των υδατόανθρακικών HBGAs υποδοχέων αποτελεί έναν φυσικό δέκτη ή τουλάχιστον έναν απαραίτητο συνπαράγοντα για την δέσμευση του ιού (75, 78-80). Μελέτες στους Νοροϊούς, έδειξαν ότι κάποιοι ανθρώπινοι οργανισμοί δεν μπορούν να προσβληθούν από τον ιό και ενισχύθηκε η υπόθεση ότι, η «ανοσία» ως προς τη μόλυνση δεν οφειλόταν σε πιθανά αντισώματα τα οποία προϋπήρχαν στον οργανισμό τους αλλά σε συγκεκριμένες ομάδες αίματος (81-83). Συγκεκριμένα, σε μία από αυτές τις μελέτες παρατηρήθηκε ότι όταν από κάποιο οργανισμό λείπει ο ειδικός φαινότυπος για την έκκριση των HBGAs υποδοχέων, εμφανίζεται ανθεκτικότητα στη μόλυνση από Νοροϊό (75). Πιο πρόσφατες μελέτες, έδειξαν ότι οργανισμοί με ομάδα αίματος 0 είναι πιο επιρρεπείς στη μόλυνση, σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες (79). Σε αντίθεση των παραπάνω, σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε ότι τα άτομα που δεν είχαν τον συγκεκριμένο φαινότυπο έκκρισης, εμφάνιζαν σημαντικά χαμηλότερο τίτλο αντισωμάτων στα στελέχη του ιού (GII.4), σε σχέση με τα άτομα που είχαν τον φαινότυπο έκκρισης (84) και ότι τα άτομα τα οποία είχαν ομάδα αίματος B, εμφάνιζαν τις λιγότερες επιπτώσεις από την μόλυνση του ιού (GI) (80).



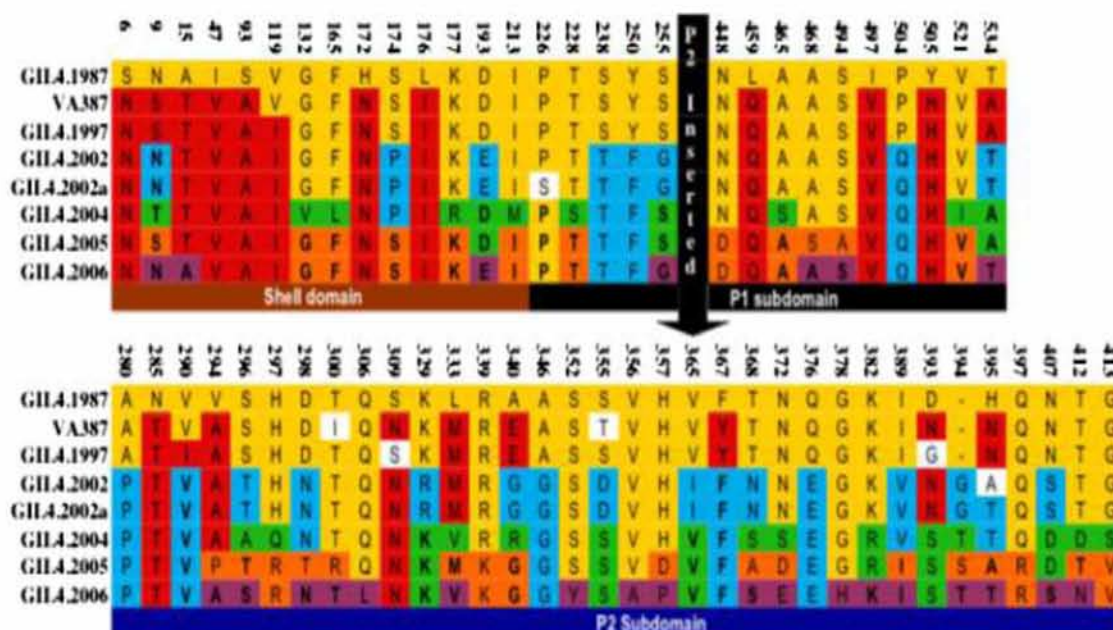
Εικ.8. Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των HBGAs, με ενζυμικές διαφοροποιήσεις από τα FUT1, FUT2 και FUT3 γονίδια. (Α) Ο τύπος 1, 2 ή 3 μπορεί να τροποποιηθεί για να παράγει μια ποικιλία διαφορετικών αντιγόνων από διαφορετικά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων των FUT1, FUT2 ή FUT3 και τα A και B ένζυμα. Οι τύποι 1 και 3 έχουν τροποποιηθεί από το FUT2, το οποίο προσθέτει φουκόζη από έναν 1,2 σύνδεσμο στο πρόδρομο μόριο για να παραχθεί το H αντιγόνο, τύπου 1. Το H αντιγόνο μπορεί στην συνέχεια να τροποποιηθεί από το A ή το B ένζυμο για να παράξει τα A ή B αντιγόνα. Στον τύπο 2, το πρόδρομο μόριο τροποποιείται από FUT1 στα ερυθροκύτταρα, ενώ από το FUT2 στο βλεννογόνο. GAL: γαλακτόζη, GlcNAc: N-ακετυλογλυκοζαμίνη, Fuc: φουκόζη, GalNAc: N-ακετυλογαλακτοζαμίνη.

1.5 ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ

1.5.1 Η εξέλιξη του καψιδίου

Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για να καθοριστεί η ευαισθησία του ανθρώπινου πληθυσμού στους Νοροϊούς, συγκρίνοντας στελέχη από διαφορετικές γενετικές ομάδες ή/και διαφορετικές υποομάδες. Έχει προταθεί, ότι τα στελέχη τα οποία υπάγονται σε έναν γενότυπο είναι παρόμοια και ότι οι διαφορές που τυχόν υπάρχουν μεταξύ τους, δεν επαρκούν ώστε να προκαλέσουν μια μοναδική άνοση απάντηση. Εντούτοις, η επικράτηση της GII.4 ομάδας ως κύρια αιτία της μόλυνσης, κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 25 ετών, καθώς και η δυνατότητα αυτής να προκαλέσει

πανδημικά κρούσματα σε πληθυσμούς, έχει συγκεντρώσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τον καθορισμό των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων της. Η ανάλυση της ακολουθίας και η μοριακή φυλογενετική ανάλυση των στελεχών της GII.4 ομάδας, έχουν δείξει ότι μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω σε υποομάδες, όπου η κάθε μία σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο πανδημικό κρούσμα (85), (εικ. 9 και 10).



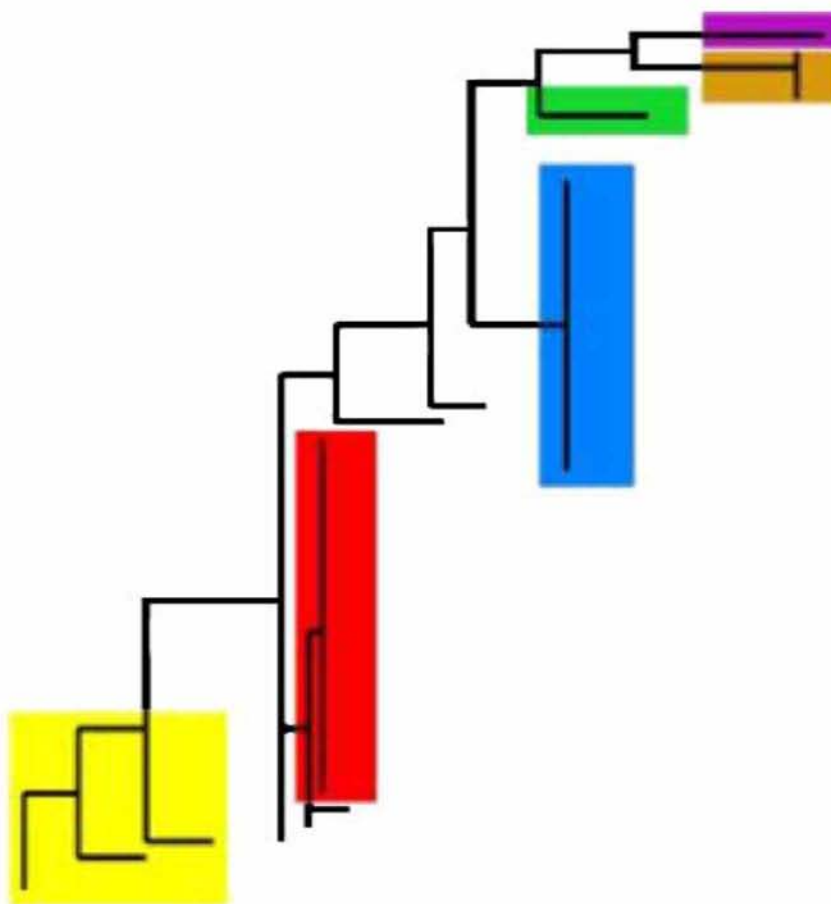
Εικ. 9. Κάθε χρώμα αντιπροσωπεύει τις αλλαγές του αμινοξέος που προέκυψαν μέσα στις GII.4 υποομάδες.

Η ακολουθία του VA387 λήφθηκε ως αναφορά. GII.4.1987. Camberwell κίτρινο GII.4.1997, Grimsby κόκκινο, GII.2002 και GII.2002a Farmington Hills μπλε, GII.2004 Hunter πράσινο, GII.2005 Sakai πορτοκάλι και GII.2006 Minerva μωβ. Τα GII.2002 και GII.2002a είναι αντιπροσωπευτικές ακολουθίες από την υποομάδα Farmington Hills και διαφέρουν μόνο κατά δύο αμινοξέα, ένα από τα οποία εμπίπτει στη P2 περιοχή.

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 (85) και την υποομάδα Minerva η οποία έχει πρόσφατα οριστεί περιλαμβάνοντας ιούς που ανιχνεύτηκαν από το 2006 και μετά. Επειδή 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.

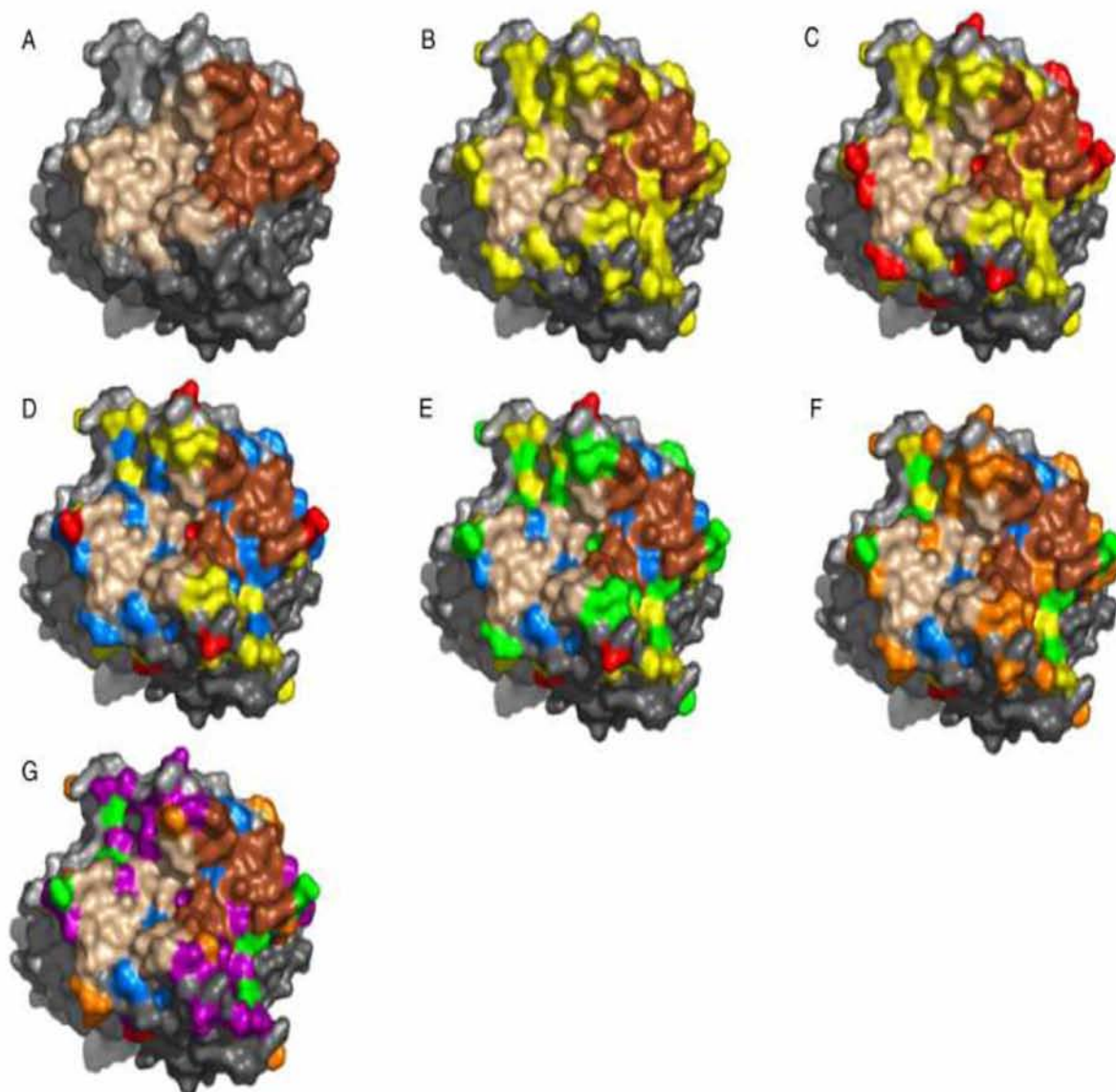
Αναλύσεις των φυλογενετικών δέντρων της GII.4 των Νοροϊών έδειξαν ότι οι ιοί αυτοί εξελίχθηκαν όντως μέσω της εξέλιξης και πως μερικές υποομάδες τους διατηρήθηκαν για αρκετά έτη (Camberwell και Grimsby) (85, 86-88), (εικ.10).



Εικ.10. Φυλογενετικό δέντρο της P2 υποπεριοχής που προέκυψε από πολλαπλή ευθυγράμμιση χρησιμοποιώντας το Μπεϋζιανό (Bayesian) πειραματικό συμπέρασμα. Το δέντρο δείχνει ότι και οι έξι υποομάδες είναι ευδιάκριτες και προέκυψαν από την υποομάδα Camberwell. Camberwell κίτρινο, Grimsby κόκκινο, Farmington Hills μπλε, Hunter πράσινο, Sakai πορτοκαλί και Minerva μωβ.

Σε χαρτογράφηση που πραγματοποιήθηκε στη δομή του στελέχους VA387 της GII.4 των Νοροϊών, για την μελέτη της ποικιλομορφίας μεταξύ των υποομάδων αποδείχτηκε, ότι ένα μεγάλο μέρος της ποικιλομορφίας μεταξύ αυτών βρίσκεται μέσα ή κοντά στις περιοχές δέσμευσης, (εικ.11). 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, (πίνακας 3). Τέλος, σε πιο πρόσφατη μελέτη (85), παρατηρήθηκε ότι η GII.4 ομάδα μπορεί και εξελίσσεται κατά την διάρκεια της ανοσολογικής απάντησης.



Εικ.11. Ποικιλομορφία των ιών GII.4 που χαρτογραφούνται επάνω σε διμερή. Οι δομές τοποθετούνται από αριστερά προς δεξιά, από την κορυφή προς το κατώτατο σημείο: (A) διμερές με δύο πανομοιότυπες κοιλότητες καφέ και εκρού, (B) Camberwell (GII.4.1987) κίτρινο, (C) Grimsby (GII.4.1997) κόκκινο, (D) Farmington Hills (GII.4.2002) μπλε, (E) Hunter (GII.4.2004) πράσινο, (F) Sakai (GII.4.2005) πορτοκάλι, (G) αλλαγές που εμφανίστηκαν στην υποομάδα Minerva (GII.4.2006) μωβ.

Πίνακας 3. Οι ομάδες Camberwell και Grimsby εμφανίζουν παρόμοια αντιγονικότητα, κίτρινο. Farmington Hills μπλε, Hunter πράσινο, Sakai πορτοκάλι. Οι δύο διαφορετικές αποχρώσεις του μπλε δείχνουν δύο διαφορετικούς αντιγονικούς τύπους στη υποομάδα Farmington Hills.

VLP	GII.4 antisera					
	GII.4.1987	GII.4.1997	GII.4.2002a	GII.4.2002	GII.4.2004	GII.4.2005
GII.4.1987	100	60	10	16	12	22
GII.4.1997	100	100	17	46	25	19
GII.4.2002a	2	1	100	4	3	4
GII.4.2002	21	7	19	100	21	28
GII.4.2004	17	8	10	18	100	27
GII.4.2005	24	9	6	17	32	100

1.5.2 Αντιγονικές παραλλαγές και ανοσοποίηση

Η κατανόηση της εξέλιξης της GII.4 γενετικής ομάδας των Νοροϊών είναι καθοριστικής σημασίας, προκειμένου να διευκρινιστεί ο τρόπος με τον οποίο οι ιοί αυτοί μπορούν και αποφεύγουν την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή. Το πρότυπο της εξέλιξης προτείνει, ότι ένας πληθυσμός προερχόμενος από τον ιό φθάνει σε μια περίοδο φαινοτυπικής στασιμότητας, κατά την διάρκεια της οποίας, μπορούν να συσσωρευτούν ουδέτερες μεταλλάξεις, οι οποίες δεν ασκούν καμία επιρροή στην λειτουργία του ιού (85, 86-88). Ο προερχόμενος ιικός πληθυσμός περνά ένα διάστημα κατέχοντας ουδέτερες μεταλλάξεις, ώσπου τελικά να εμφανιστεί μια σπάνια μετάλλαξη και να επιτρέψει στον ιό να αρχίσει και πάλι να πολλαπλασιάζεται. Το σύνολο της διαδικασίας αυτής προκαλεί ένα τελικό εκλεκτικό «ξεκαθάρισμα» των ουδέτερων μεταλλάξεων που είχαν συσσωρευτεί πριν από την καθοριστική μετάλλαξη και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, χωρίς να ασκηθεί κάποια επίδραση στην λειτουργική ικανότητα του ιού (85, 86-88) ή στην αλλαγή του φαινοτύπου του.

Σήμερα, ο συσχετισμός μεταξύ της γενετικής και φαινοτυπικής διαφοροποίησης παραμένει μια σημαντική εκκρεμής ερώτηση, όσον αφορά τους ιούς της Γρίπης, της Ηπατίτιδας C, της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας και τους Νοροϊούς. Η ερμηνεία των θεμελιωδών νόμων που διέπουν την αντιγονική διαφοροποίηση είναι σημαντική, για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι ιοί καταφέρνουν να παρακάμπτουν την ανθρώπινη άνοση απάντηση. Η επίτευξη του παραπάνω στόχου θα δημιουργήσει την βάση για

την πιθανή πρόβλεψη των μελλοντικών στελεχών, με απώτερο σκοπό τη σχεδίαση αποτελεσματικών εμβολίων.

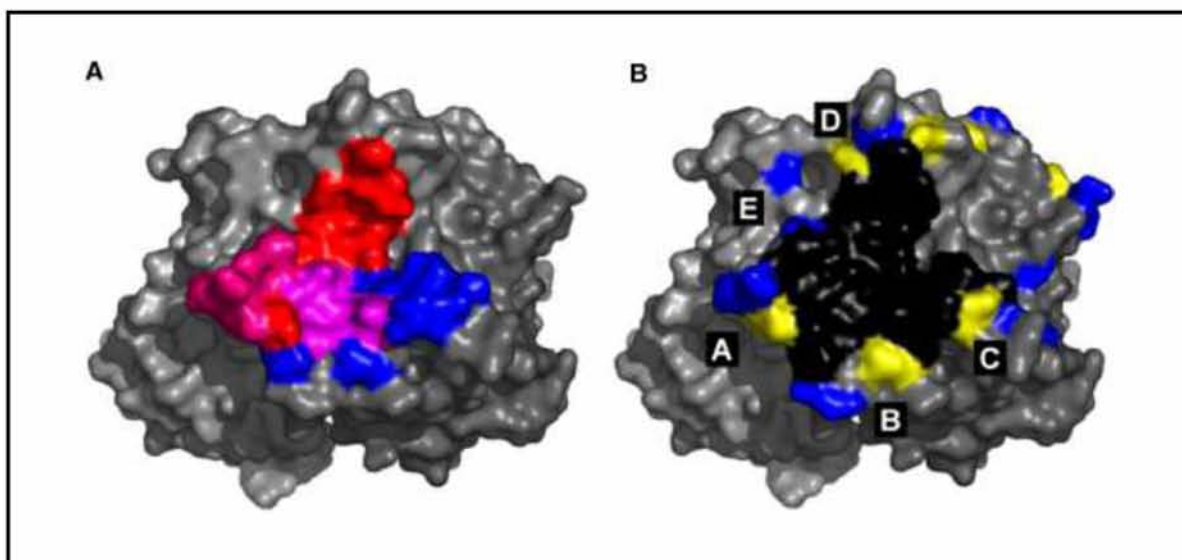
Κατά τη διάρκεια της εμφάνισης των ομάδων Camberwell και Grimsby, εμφανίστηκαν δύο ευδιάκριτες περιόδους φαινοτυπικής στασιμότητας. Η ομάδα Camberwell επικράτησε από το 1987 ως το 1995, εμφανίζοντας ελάχιστη μεταβλητότητα. Εντούτοις σήμερα, πολύ λίγες ακολουθίες είναι διαθέσιμες από αυτήν την υποομάδα, με αποτέλεσμα, η εξελικτική της εικόνα να είναι ελλιπής. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η Camberwell αποτελεί την πρώτη ομάδα των ιών GII.4. Η μετάλλαξη που εμφανίστηκε στην ομάδα Grimsby οδήγησε σε αλλαγές στο καψίδιο, επιτρέποντάς της την πρόκληση προσβολής σε μια αυξανόμενη σειρά ξενιστών. Κατά παράδοξο τρόπο, οι ομάδες Camberwell και Grimsby συνδυάζονται μεταξύ τους, αντιπροσωπεύοντας έτσι μια ενιαία εποχή αντιγονικής στασιμότητας, κυρίως λόγω της απουσίας εμφάνισης ανιχνεύσιμης αλλαγής σε επίπεδο ανοσολογικής απάντησης έναντι των ιών GII.4 από το 1987 ως το 2000, παρά του ότι 19 σχετικές αλλαγές αμινοξέων εμφανίστηκαν στο καψίδιο κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Η ομάδα Grimsby, πιθανώς, εξελίχθηκε, με αποτέλεσμα την μόλυνση μιας πρόσθετης ομάδας του πληθυσμού, παρατείνοντας έτσι και την περίοδο της αντιγονικής στασιμότητας και μη επιτρέποντας τους ιούς GII.4 να διατηρήσουν τις αντιγονικές τους ιδιότητες. Οι ιοί από την Grimsby ομάδα προκάλεσαν μια σημαντική πανδημία, γεγονός που έδειξε ότι ένα μεγάλο ποσοστό του ευπαθούς πληθυσμού πιθανόν μολύνθηκε και συνεπώς ανέπτυξε ανοσία. Δεδομένου ότι η ανοσία αυξήθηκε, η φύση του ιού επέβαλλε και την αύξηση αλλαγών του, οδηγώντας έτσι σε ένα νέο φαινότυπο, ο οποίος εντοπίστηκε στην υποομάδα Farmington Hills.

Μια χαρακτηριστική διαφορά που σημειώθηκε κατά τη διάρκεια της εμφάνισης της ομάδας Farmington Hills, ήταν ένα μονό ένθετο αμινοξέων αμέσως μετά από τη θέση 393 στη P2 περιοχή. Η αλλαγή αυτή διατηρήθηκε σε όλες τις πρόσφατες ομάδες, ενώ σημειώθηκαν και δύο διαφοροποιήσεις στις καψιδικές ακολουθίες, παράγοντας VLPs με μεγάλες διαφορές στις ικανότητες δέσμευσης HBGAs καθώς επίσης και στον αντιγονικό φαινότυπο. Οι διαφορές μεταξύ αυτών των ακολουθιών των GII.4-2002 και GII.4-2002a, καθορίζονται από τις αντικαταστάσεις της P1 υποπεριοχής όπου μια προλίνη αντικαθίσταται από μια σερίνη στη θέση 226 και της P2 υποπεριοχής όπου

μια αλανίνη αντικαθίσταται από μια θρεονίνη στη θέση 395. Αν και η αλλαγή στην περιοχή P2 είναι περισσότερο εκτεθειμένη στην επιφάνεια, είναι απίθανο να διευκολυνθεί αυτή η αλλαγή σε GII.4-2002a (πίνακας 3), γιατί η αντικατάσταση αυτή βρίσκεται και σε άλλες υποομάδες της GII.4, (εικ. 9). Κατά συνέπεια, η αλλαγή της P1 περιοχής (P226S) καθορίζει έναν σημαντικό αντιγονικό κυρίαρχο επίτοπο (85), ο οποίος είναι η αρχική υπομονάδα ενός άλλου αντιγονικού επιτόπου. Ο αρχικός αυτός αντιγονικός επίτοπος, αναγνωρίζεται ευκολότερα από το ανοσοποιητικό σύστημα των ξενιστών και επομένως έχει μέγιστη επιρροή στην εξειδίκευση των αντισωμάτων.

Αυτή η μορφή άνοσης διαφυγής είναι διαφορετική από την προηγούμενη, λόγω του ότι μόνο δύο αντικαταστάσεις οδήγησαν σε δύο φαινοτυπικές αλλαγές (νέα αντιγονικότητα και αλλαγμένη σύνδεση HBGs) ενώ καμία από τις πρόσθετες μεταλλάξεις δεν εξαλείφθηκε. Κατά συνέπεια, συμπεραίνεται ότι η αντιγονική εξέλιξη εμφανίστηκε μέσα στην υποομάδα Farmington Hills, διευκολύνοντας την γρήγορη εμφάνιση μιας νέας παραλλαγής, ικανής να προσδεθεί με μια σειρά διαφορετικών HBGs. Αν και είναι δυνατό κατά τη διάρκεια της στατικής περιόδου δύο πληθυσμοί να σύγκλιναν στην ίδια σπάνια μετάλλαξη που έδωσε τους νέους φαινότυπους, θα ήταν όμως ιδιαίτερα απίθανο τα 18 από τα 20 πρόσθετα αμινοξέα που συνδέονται με την ομάδα Farmington Hills και είχαν συσσωρευτεί τυχαία, να είναι πανομοιότυπα και στους δύο πληθυσμούς. Η πιθανότερη υπόθεση είναι ότι η ομάδα Farmington Hills προέκυψε ως μια μετάλλαξη και στην συνέχεια η αντιγονική εξέλιξη επέτρεψε την αποφυγή της ανοσίας.

Το 2003 μια μελέτη (89), σε ασθενή που είχε προσβληθεί από Νοροϊούς της ομάδας GII, έδειξε ότι η αντίδραση αντισωμάτων με τα ιικά σωματίδια μπορεί σταδιακά να οδηγήσει τον ιό σε δημιουργία μεταλλάξεων, κυρίως στο καψίδιο, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του προσβεβλημένου οργανισμού να αναπτύξει ανοσία καθώς επίσης και την μετατροπή της οξείας μόλυνσης σε χρόνια λοίμωξη (89). Στην περίπτωση αυτή, ενώ το άτομο ήταν σοβαρά ανοσοκατασταλμένο (CD4/CD8 0.37), είχε διατηρήσει άθικτη ορολογική άνοση απάντηση με κανονικές συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών (Ig), IgG, IgA, και IgM.



Εικ.12. Πιθανοί επίτοποι στην επιφάνεια των GII.4 ιών

(Α) Προβλεπόμενες δεσμευτικές θέσεις χαρτογραφημένες πάνω στο διμερές. Θέση 1, μοβ, θέση 2 ροζ, υπολείμματα αλυσίδας Α κόκκινο, υπολείμματα Β αλυσίδας, μπλε.

(Β) Χαρτογράφηση τοποθεσιών της θετικής επιλογής και μεταβολής επάνω στην προεξέχουσα δομή δίπλα στο θύλακα σύνδεσης στην πιο εκτεθειμένη άκρη του καψιδίου-υποδοχέα. Θέσεις που λειτουργούν υπό θετική επιλογή κίτρινο, μεταβλητά τμήματα μπλε, θέση δέσμευσης του υποδοχέα μαύρο. Οι θεωρούμενοι επίτοποι σημειώνονται ως Α, Β, C, D, E.

Όπως και με τον ιό της Γρίπης, η σχέση μεταξύ της εξέλιξης των Νοροϊών και των μοριακών μηχανισμών της αντιγονικής ποικιλομορφίας, οι οποίοι επιτρέπουν τη διαφυγή από την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, είναι σύνθετοι. Ενώ οι μεταλλάξεις δίνουν αφορμή για εμφάνιση νέων στελεχών, υπάρχουν επίσης στοιχεία ότι η αντιγονική εξέλιξη εμφανίζεται και σε μερικές ομάδες, οι οποίες επιτρέπουν τη διαφυγή από την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή διευκολύνοντας έτσι την επέκτασή τους σε προηγούμενα ανθεκτικούς πληθυσμούς. Επιπλέον, έχει εντοπιστεί ότι τουλάχιστον πέντε περιοχές της GII.4 στη καψιδική επιφάνεια της περιοχής P2, λειτουργούν κάτω από θετική επιλογή και αυτές οι περιοχές μπορεί να αντιπροσωπεύσουν τους θεωρητικούς αντιγονικούς επίτοπους (εικ.12), οι οποίοι ποικίλλουν τόσο, ώστε να επιτρέψουν τη διαφυγή από την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή.

Κατά συνέπεια, η εξέλιξη σε επίπεδο πληθυσμών συνδέεται με την αντιγονική εξέλιξη του κάθε ατόμου ξεχωριστά μέσα στον πληθυσμό. Περαιτέρω μελέτες με κρυσταλλικές δομές των mAbs που δεσμεύονται στους διάφορους επίτοπους της GII.4 του P διμερούς, είναι απαραίτητες, για να διευκρινίσουν τη σύνθετη σχέση μεταξύ της γενετικής ποικιλομορφίας και του αντιγονικού φαινοτύπου.

1.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Στοιχεία επιδημιολογίας μπορούν να προκύψουν από σχετικές εκθέσεις που υποβάλλονται ετησίως από κέντρα ελέγχου και πρόληψης τα οποία είναι υπεύθυνα για την καταγραφή περιπτώσεων και αντίστοιχων κλινικών εικόνων. Στις ετήσιες αυτές εκθέσεις, οι Νοροϊοί καταγράφονται ετησίως ως υπεύθυνοι για πάνω από το 96% των περιπτώσεων μη βακτηριακής οξείας επιδημικής γαστρεντερίτιδας, με τουλάχιστον 23 εκατομμύρια μολύνσεις ετησίως μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, 70.000 εισαγωγές σε νοσοκομεία και σχεδόν 800 θανάτους, (90). Σε παγκόσμια κλίμακα τα μισά τουλάχιστον από όλα τα κρούσματα γαστρεντερίτιδας αποδίδονται σε Νοροϊούς, καθιστώντας έτσι την ομάδα αυτή των ιών ως την περισσότερο κοινή αιτία εμφάνισης σποραδικής διάρροιας σε επίπεδο πληθυσμού (2, 90).

Η περίοδος επώασης, για την εμφάνιση των πρώτων χαρακτηριστικών συμπτωμάτων, μετά από την προσβολή του ανθρώπου από τον ιό, είναι γενικά 24 – 48 ώρες, με τα κλινικά συμπτώματα να διαρκούν από 12 έως 72 ώρες. Η παρουσίαση των συμπτωμάτων μπορεί να παραταθεί σε μερικές περιπτώσεις, ιδιαίτερα μεταξύ των ηλικιωμένων ή ανοσοκατασταλμένων. Τα συμπτώματα της μόλυνσης περιλαμβάνουν τα εξής: εμετό (69%), διάρροια (66%), ναυτία (79%), χαμηλό πυρετό (37%) και κοιλιακούς σπασμούς (30%) (91).

Τα προερχόμενα από τον ιό σωματίδια, έχουν ανιχνευθεί μέχρι και 3 εβδομάδες μετά την παύση των συμπτωμάτων. Επίσης, επειδή η μόλυνση από Νοροϊό χρειάζεται πολύ χαμηλή μολυσματική δόση και είναι εξαιρετικά σταθερή στο περιβάλλον, η διάδοση των Νοροϊών πραγματοποιείται πολύ εύκολα από άνθρωπο σε άνθρωπο.

Αν και όλοι οι πληθυσμοί είναι ευαίσθητοι στη μόλυνση, οι ηλικιωμένοι εμφανίζονται ως οι πιο ευαίσθητοι στην προσβολή από τον ιό (92, 93). Εκτός από την αυξημένη ευαισθησία των ηλικιωμένων, μεγάλο κίνδυνο διατρέχουν οι πολύ νέοι αλλά και οι ανοσοκατασταλμένοι (94-96). Δυστυχώς, η πραγματική νοσηρότητα καθώς και τα ποσοστά θνησιμότητας που προκύπτουν από τις μολύνσεις του ιού στους πληθυσμούς υψηλού κινδύνου παραμένουν ακαθόριστα, καθώς επίσης και ο αντίκτυπος της μόλυνσης του ιού σε νήπια και σε παιδιά στον αναπτυσσόμενο κόσμο.

Οι μολύνσεις από τον ιό, συνδέονται συχνότερα με την κατανάλωση μολυσμένων τροφών και νερών. Η διάδοση του γίνεται κυρίως μέσω της ανθρώπινης επαφής, της έκθεσης σε μολυσμένα αερολύματα και μέσω τις περιπτωματικής οδού (97).

Τις περισσότερες φορές, τα κρούσματα εμφανίζονται μέσα σε ιδρύματα, όπως τα σχολεία, οι ιδιωτικές κλινικές, τα γηροκομεία, τα νοσοκομεία ή σε τοποθεσίες όπου η στενή ανθρώπινη επαφή είναι αναπόφευκτη, όπως σε κρουαζιερόπλοια, σε στρατιωτικά σκάφη ή και στρατιωτικές μονάδες.

Οι γενετικές ομάδες GI και GII και οι άνω των 25 διαφορετικών γενετικών γενότυπων που αυτές περιλαμβάνουν, αποτελούν την πλειοψηφία των ανθρώπινων παθογόνων. Εντούτοις, τα κρούσματα της GII.4 ομάδας, εμφανίζονται συχνότερα από οποιοδήποτε άλλη (92, 98,99). Για τον λόγο αυτό, η πλειοψηφία των κρουσμάτων που προέρχονται από τον ιό οφείλονται στον γενότυπο GII.4. Η πανδημία που αυτός προκαλεί, αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 90 (100). Κατά τη διάρκεια του 1995-1996, το στέλεχος US95/96 αποτέλεσε τον αιτιολογικό παράγοντα για το 55% των κρουσμάτων στις Ηνωμένες Πολιτείες και για το 85% των κρουσμάτων στις Κάτω Χώρες (101). 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 (102) συνδέθηκε τελικά με το 80% των οξέων κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας.

Ταυτόχρονα, στην Ευρώπη, μια νέα ποικιλομορφία των GII.4 και GII.4b, προκάλεσαν κρούσματα κατά τη διάρκεια του χειμώνα, της άνοιξης, και του καλοκαιριού (103, 104). Οι επιπτώσεις των κρουσμάτων του ιού κατά τη διάρκεια του χειμώνα του 2002-2003 έχουν τοποθετηθεί ως οι υψηλότερες σε κρούσματα γαστρεντερίτιδας, όπως έχει γνωστοποιηθεί και καταγραφεί στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Ευρώπη (92, 105, 106). Το 2004, η ποικιλομορφία του στελέχους GII.4 ανιχνεύθηκε στην Αυστραλία, την Ευρώπη, και την Ασία (104, 107, 108). Το στέλεχος αυτό, αντικαταστάθηκε στις αρχές του 2006 από δύο νέες κυκλοφορούσες ποικιλομορφίες του GII.4 στις Ηνωμένες Πολιτείες, στην Ευρώπη, και στην Ασία (109). Μια από αυτές ήταν η Sakai, η οποία αντιπροσωπεύει ένα καινούργιο στέλεχος της GII.4 και έχει συνδεθεί με τα κρούσματα που εμφανίζονται στις εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης στη Νοτιοανατολική Ασία, (95). Τα στελέχη που

εμφανίζουν ομοιότητες με το στέλεχος Sakai προσδιορίζονται επίσης στις Ηνωμένες Πολιτείες και τις Κάτω Χώρες. Το δεύτερο στέλεχος, το οποίο προσδιορίστηκε και πάλι στις Ηνωμένες Πολιτείες ήταν το στέλεχος Minerva. Το στέλεχος αυτό, αποδείχτηκε ότι ήταν ταυτόσημο με τα στελέχη τα οποία είχαν απομονωθεί στις Κάτω Χώρες (110).

Κατά τη διάρκεια του 2006, στο εθνικό εργαστήριο Caliciών των Η.Π.Α. εξετάστηκαν με την χρήση της μεθόδου RT-PCR, 761 δείγματα κοπράνων τα οποία προέρχονταν από 126 κρούσματα στις Ηνωμένες Πολιτείες. Ο ιός επιβεβαιώθηκε σε 114 (90%) από αυτά τα κρούσματα και 87 (76%) συνδέθηκαν με τις δύο νέες GII.4 ποικιλομορφίες του ιού (Minerva και Sakai) (111).

Από το 2006 μέχρι σήμερα, η εμφάνιση νέων στελεχών Νοροϊών ανά συχνά χρονικά διαστήματα είναι συχνή. Σε πολλές χώρες όπως είναι η Αίγυπτος, η Ινδία και η Αφρική, η εμφάνιση καινούργιων στελεχών τα οποία ανήκουν στην γενετική ομάδα GII.4 αλλά απέχουν φυλογενετικά με τα υπόλοιπα στελέχη του γενοτύπου λαμβάνει χώρα περίπου ανά δύο έτη (112-114).

1.6.1 Πρόληψη και έλεγχος

Η ανεπαρκής γνώση και κατανόηση του μηχανισμού δράσης των Νοροϊών έχει αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων αντιμετώπισης τους. Μέχρι σήμερα, για την πρόληψη της εξάπλωσης της μόλυνσης συνίσταται η απομόνωση των κρουσμάτων από τον πληθυσμό, ενώ η διαχείριση αυτών αντιμετωπίζεται ανά σύμπτωμα, όπως παρεντερική ή δια στόματος χορήγηση υγρών και θεραπεία αποκατάστασης ηλεκτρολυτών (115).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι Νοροϊοί, εμφανίζουν μικρή χρονική περίοδο επώασης, η οποία είναι ιδιαίτερα μολυσματική. Παρουσιάζουν χαρακτηριστική σταθερότητα στο περιβάλλον, στο χλώριο, στο οινόπνευμα και στα μέτρα αποστείρωσης (38). Η διακοπή της μετάδοσης της μόλυνσης αποτελεί την αρχική στρατηγική για την πρόληψη, ειδικά σε νοσοκομεία και σε κέντρα

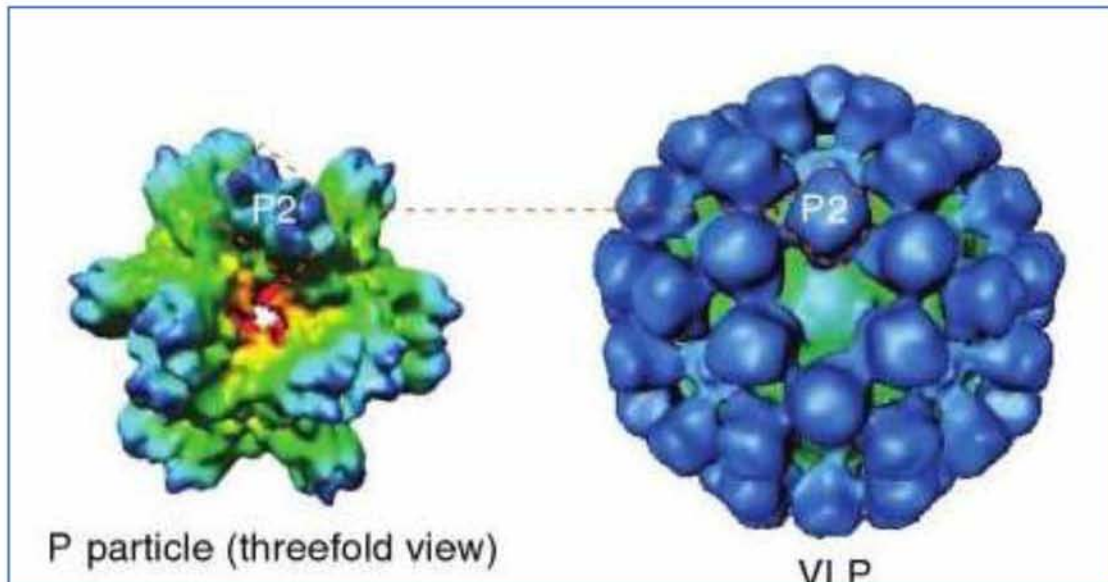
περίθαλψης ευπαθών ομάδων, όπως παιδιά, ηλικιωμένοι και ανοσοκατασταλαμένοι (103).

Εξίσου σημαντική είναι η μετάδοση του ιού από δευτεροβάθμιους παράγοντες, όπως η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων και νερών. Στην περίπτωση αυτή, ως αποτελεσματικότερος τρόπος μείωσης της μετάδοσης του ιού είναι η τήρηση κάποιων απλών κανόνων υγιεινής όπως, χρήση σαπουνιού και ζεστού νερού για 20 δευτερόλεπτα. Ως αποτελεσματικά απολυμαντικά θεωρούνται όσα περιέχουν υποχλωριώδη, υπεροξειδίο του υδρογόνου και φαινολικά παράγωγα (116), η πόση εμφιαλωμένου νερού και ποτών χωρίς πάγο κατά την διάρκεια ταξιδιών σε περιοχές όπου η υγιεινή του νερού είναι αμφισβητούμενη, η βρώση τροφίμων που είναι λεπτομερώς μαγειρευμένα και τέλος, η αποφυγή στενής επαφής με άτομα τα οποία εμφανίζουν στοιχεία της κλινικής εικόνας της μόλυνσης (116).

1.6.2 Εμβόλια

Κύριο εμπόδιο για την επιτυχή δημιουργία αποτελεσματικού εμβολίου έναντι των Νοροϊών, αποτελεί η έλλειψη δυνατότητας κυτταροκαλλιέργειας τους, η οποία εμποδίζει την ανάλυση του ρόλου των οροεξουδετερωτικών αντισωμάτων και το γεγονός ότι οι ίδιοι οι ιοί δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή για την παρασκευή ζωντανού ή αδρανοποιημένου εμβολίου.

Τον Σεπτέμβριο του 2009 σε συνέδριο που πραγματοποιήθηκε στην Ισπανία, 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 VLPs, που αποτελούν πηγή παραγωγής του καψιδιακού αντιγόνου και σε ένα μονοφωσφορικό λιπίδιο A (Monophosphoryl Lipid A) το οποίο ενισχύει την ρινική λήψη (εικ13).



Source: Nanomedicine©2012 Future Medicine Ltd

Εικ.13. Τα εμβόλια VLPs σχεδιάζονται για να μιμηθούν την εξωτερική δομή της πρωτεΐνης έτσι ώστε να προκαλέσουν μια αποτελεσματική άνοση απάντηση. Επειδή τα VLPs δεν ενσωματώνουν το ιικό RNA, είναι ανέκτα να αναπαραχθούν στο σώμα και έτσι δεν μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση.

Το VLP (δεξιά) αποτελείται από 180 VP1 με τα διμερή P στις εξώτατες επιφάνειες του, ενώ το σωματίδιο P (αριστερά) αποτελείται από 12 P διμερή με παρόμοιο προσανατολισμό με εκείνα του VLP. Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει την περιοχή P2 ενός διμερούς P, που εκπροσωπεί τις αντιγονικές δομές επιφάνειας και των δύο σωματιδίων.

Σε πρόσφατες κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στις Η.Π.Α., ο εμβολιασμός με εμβόλια VLP-NoV έδειξε ότι τα VLPs μπορούν να επάγουν αντισώματα τα οποία μπλοκάρουν τον ιό κατά την πρόσδεση του με τους υδατανθρακικούς υποδοχείς των ερυθροκυττάρων, με αποτέλεσμα την κατάλληλη ανοσοποίηση και χωρίς εμφάνιση σοβαρών επιπλοκών.

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, 2013).

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 είναι στις ομάδες υψηλού κινδύνου, καθώς και τις αναπτυσσόμενες χώρες όπου οι συνθήκες υγιεινής είναι κατά κανόνα κακές (117).

1.7 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την διάγνωση των Νοροϊών, κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριών δεκαετιών περίπου, έχουν αναπτυχθεί κάποιες σημαντικές δοκιμές οι οποίες, παρέχουν την δυνατότητα του προσδιορισμού του ιού ακόμα και αν η συγκέντρωση του στο προς εξέταση δείγμα είναι σχετικά μικρή, (118).

1.7.1 Ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος

Η κλωνοποίηση του ιού του Νόργουσκ και η μετέπειτα αλληλούχισή του, έχει οδηγήσει, με επιτυχία, στην ανάπτυξη δοκιμασιών ανίχνευσης του ιού (119). Η γνώση του γονιδιώματος του ιού, επέτρεψε τον σχεδιασμό δοκιμών 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.

Η RT-PCR αποτελεί την πιο ευαίσθητη διαγνωστική δοκιμή για την ανίχνευση του ιού (119). Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει τα ιικά μόρια σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (100 particles/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 -80°C (119). Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι οι συγκεκριμένες δοκιμές απαιτούν μεγάλη προσοχή έτσι ώστε να αποτραπούν τυχόν επιμολύνσεις των αρνητικών δειγμάτων λόγω της πολύ μεγάλης ευαισθησίας της μεθόδου (119) και βέβαια απαιτείται ακριβός εξοπλισμός και υψηλό κόστος αναλωσίμων (120).

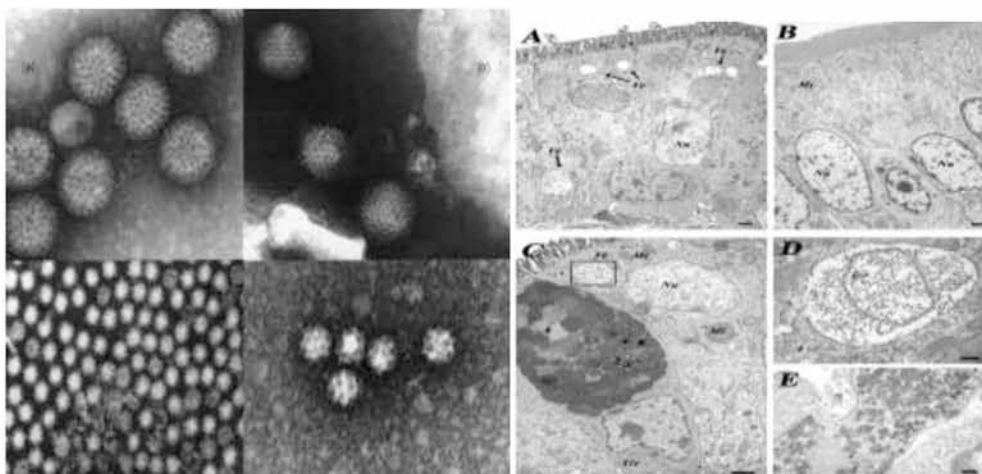
Κατά συνέπεια, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως στις περιπτώσεις πραγματοποίησης επιδημιολογικών ερευνών. Έτσι, σε επιδημιολογικό επίπεδο, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός στελεχών, τα οποία είναι υπεύθυνα για διάφορα κρούσματα γαστρεντερίτιδας και ταυτόχρονα να αποκαλύψει τυχόν μεταλλάξεις των κυκλοφορούντων Νοροϊικών στελεχών.

1.7.2 Διαγνωστικές δοκιμές πρώτης γενιάς

Οι διαγνωστικές δοκιμές πρώτης γενιάς που αναπτύχθηκαν 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 Νοροϊών, όπως ο ραδιοανοσοπροσδιορισμός (RIA) και οι ανοσολογικές αντιδράσεις. Τέλος, η τεχνική Western Blot αποτελεί μια ακόμη προσέγγιση για την αξιολόγηση της αντίδρασης των αντισωμάτων σε μολυσμένα άτομα (119).

1.7.3 Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Η τεχνική αυτή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιού, καθώς βασίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του. Το όνομα Calici ιός προέρχεται από την μορφή που εμφανίζουν τα ιικά μόρια κατά την παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, (118). Ωστόσο, παρουσιάζονται ενίοτε εμπόδια όπως είναι η δυσκολία διαχωρισμού του ιού από άλλα σφαιρικά σωματίδια στα δείγματα που καθιστούν την μέθοδο μη αποδοτική και ακατάλληλη να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική εξέταση ρουτίνας.



Εικ.14. Δομή των Νοροϊών στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο, ([www.pubmed.gov/PMID: 13679618](http://www.pubmed.gov/PMID/13679618)).

1.7.4 Ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία

Η πρώτη μέθοδος που εφαρμόστηκε για να προσδιορίσει τους ιούς Calici ήταν η ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία (118), με χρήση ειδικού αντιορού για την αναγνώριση των Νοροϊών, έτσι ώστε να καταστεί εφικτή η ενίσχυση του ιού. Εντούτοις, η τεχνική αυτή είναι χρήσιμη μόνο για τα δείγματα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της μόλυνσης (πρώτες 24 – 48 ώρες) (118, 121).

1.7.5 Ανοσολογικές αντιδράσεις

Οι καψιδικές πρωτεΐνες των Νοροϊών εκφράσθηκαν με επιτυχία στο σύστημα έκφρασης των βακουλοϊών (baculoviruses) γεγονός που επέτρεψε στη συνέχεια την ανίχνευση των ιών αυτών με άνοσο-ενζυμικές μεθόδους (ELISA). Η μέθοδος capture ELISA, πραγματοποιείται κάνοντας χρήση ενός ζεύγους υπεράνοσων αντιορών και μπορεί να ανιχνεύσει τον ιό σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Η έκφραση των ιικών αντιγόνων επέτρεψε επίσης να χρησιμοποιηθούν για να προσδιοριστεί ο τίτλος των αντισωμάτων (IgG) στο ορό των ασθενών. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου, είναι ο περιορισμός των αντιγονικών τύπων που βρίσκονται μέχρι σήμερα στην διάθεση των διαγνωστικών εργαστηρίων μέσω των εταιρειών παραγωγής των αντίστοιχων διαγνωστικών kits (121).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

2.1.1 Περιβαλλοντικά δείγματα

Τα περιβαλλοντικά δείγματα, λήφθηκαν από βιολογικούς καθαρισμούς του ελλαδικού χώρου. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 53 δείγματα από τους βιολογικούς καθαρισμούς της Λάρισας, των Ιωαννίνων και των Τρικάλων, η κωδικοποίηση των οποίων παρουσιάζεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Περιβαλλοντικά δείγματα.

Κωδικοποίηση δείγματος	Προέλευση δείγματος
LR2F	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LR5	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LR6F	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LR6P	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LR7P	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LR8	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LR9	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LR10	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LR11	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LR12	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LR14	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LR16	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LRB1	Βιολ. Καθ. Λάρισας
LRB2F	Βιολ. Καθ. Λάρισας
GNIF	Βιολ. Καθ. Ιωαννίνων
GN2	Βιολ. Καθ. Ιωαννίνων
TRIF	Βιολ. Καθ. Τρικάλων
TRIP	Βιολ. Καθ. Τρικάλων
TR2	Βιολ. Καθ. Τρικάλων
TR3P	Βιολ. Καθ. Τρικάλων
TR3F	Βιολ. Καθ. Τρικάλων
TR4	Βιολ. Καθ. Τρικάλων
TR5	Βιολ. Καθ. Τρικάλων
EIS1	Βιολ. Καθ. Λάρισας /είσοδος
EIS2	Βιολ. Καθ. Λάρισας /είσοδος
EIS3	Βιολ. Καθ. Λάρισας /είσοδος
EIS4	Βιολ. Καθ. Λάρισας /είσοδος
EIS5	Βιολ. Καθ. Λάρισας /είσοδος
EIS6	Βιολ. Καθ. Λάρισας /είσοδος
AB7	Βιολ. Καθ. Λάρισας /Α΄βαθμια
AB8	Βιολ. Καθ. Λάρισας/Α΄βαθμια
AB9	Βιολ. Καθ. Λάρισας /Α΄βαθμια
AB10	Βιολ. Καθ. Λάρισας /Α΄βαθμια
EX11	Βιολ. Καθ. Λάρισας /έξοδος

EX12	Βιολ. Καθ. Λάρισας /είσοδος
AB13	Βιολ. Καθ. Λάρισας /Α΄βαθμια
EX14	Βιολ. Καθ. Λάρισας /έξοδος
AB15	Βιολ.Καθ.Λάρισα /Α΄βαθμια
AB18	Βιολ.Καθ.Λάρισα /Α΄βαθμια
AB19	Βιολ.Καθ.Λάρισα /Α΄βαθμια
R1_LUG	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
R2_LUG	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
R3_LUG	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
GNL012	Λύματα/Γάννουλη
KR012A	Λύματα /Καρδίτσας
KR012B	Λύματα /Καρδίτσας
KR012C	Λύματα /Καρδίτσας
LR012A	Λύματα /Λάρισας
TRN012A	Λύματα /Τύρναβος
MRK012	Λύματα /Οικισμός Μαύρικα Καρδίτσα
TRN012B	Λύματα /ΤΥΡΝΑΒΟΣ
TR012A	Λύματα /ΤΡΙΚΑΛΑ
KR012D	Λύματα ΚΑΡΔΙΤΣΑ

2.1.2 Κλινικά δείγματα

Τα κλινικά δείγματα, λήφθηκαν από τα πανεπιστημιακά νοσοκομεία της Λάρισας και των Ιωαννίνων. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 29 δείγματα κοπράνων, η κωδικοποίηση των οποίων παρουσιάζεται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Κλινικά δείγματα.

Κωδικοποίηση δείγματος	Προέλευση δείγματος
A1	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A2	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A3	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A4	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A5	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A6	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A10	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A12	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
A15	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
KP1	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
KP2	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
KP3	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
KP4	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
N1	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
N2	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
N3	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
AG4	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
LR13	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
LR15	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
AK1	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων

AK2	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
AK3	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
AK4	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
AK5	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
AK6	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
AK7	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
AK8	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
AK9	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
AK10	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων

2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

2.2.1 Επεξεργασία περιβαλλοντικών δειγμάτων

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

2.2.2 Μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων

Αρχικά φυγοκεντρώνονται 500 ml δείγματος στα 1000 rpm για 2 min. Το ίζημα φυλάσσεται στους 4⁰C, ενώ ρυθμίζεται το pH του υπερκείμενου στο 7 – 7,5. Σε 500 ml υπερκείμενου (7 – 7,5 pH) προστίθενται 39,5 ml 22% (W/V) dextran, 287 ml 29% (W/V) PEG6000 και 35 ml NaCl 5 N (Sigma, USA). Το μείγμα αναδεύεται για 1 h στους 4⁰C και στην συνέχεια εισάγεται σε φιάλη διαχωρισμού, όπου και παραμένει στους 4⁰C για 48 h. Η κάτω φάση, όπου και συγκεντρώνονται τα ιικά σωματίδια, συλλέγεται, προστίθεται χλωροφόρμιο 20% v/v και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση 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 (122). Ακολουθεί περαιτέρω συγκέντρωση του δείγματος με τη μέθοδο καθίζησης με PEG: Σε δείγμα όγκου 500 ml προστίθεται 10% W/VPEG6000 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 ρυθμιστικού διαλύματος PBS (pH 7.4, 1x: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ και 2 mM KH₂PO₄).

2.2.3 Μέθοδος προσρόφησης – έκλουσης 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. Στην συνέχεια, τα ιικά σωματίδια φορτίζονται θετικά παρουσία Mg^{2+} , με την προσθήκη $MgCl^{2+}$ (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 με pH 9, εμπλουτισμένου με 3% BSA. Η έκλουση πραγματοποιείται με αργή ανάδευση για 10 min. Αφού απομακρυνθεί το διάλυμα, η διαδικασία της έκλουσης 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/VPEG6000 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 ρυθμιστικού διαλύματος PBS (pH 7.4, 1x: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ και 2 mM KH₂PO₄).

2.2.4 Επεξεργασία κλινικών δειγμάτων

Τα κλινικά δείγματα (κόπρανα), αραιώθηκαν σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (pH 7.4, 1x: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ και 2 mM KH₂PO₄), ομογενοποιήθηκαν με vortex και αποθηκεύθηκαν στους -20⁰C μέχρι την χρήση τους.

2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ RNA

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

Για την επιβεβαίωση μη ύπαρξης αναστολέων για τις περαιτέρω PCR εφαρμόστηκε μία επιπλέον αντίδραση PCR. Στην αντίδραση αυτή, χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών που στοχεύει το 16S rRNA γονίδιο των βακτηρίων, τα οποία συνυπάρχουν μέσα στο εκχυλισμένο δείγμα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι P11P και P13P (πίνακας 6) οι οποίοι αντιστοιχούν σε αλληλουχίες κοινές για όλα τα βακτήρια.

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 γενώματος 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 νουκλεασών (5μl/tube). Σε eppendorf των 500 μl προστίθεται 7μl/tube του μίγματος και 5 μl του εκχυλισμένου ιικού RNA, ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorfs στους 65⁰C για 5min. Μετά την επώαση, τα eppendorfs 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 μεταγραφάση (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 συνθήκες: 25⁰C για 10 min, 37⁰C για 50 min και 70⁰C για 15 min.

2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase chain reaction – 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. Αρχικά τα εκκινητικά μόρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (πίνακας 6) και στην συνέχεια σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές από τις αλληλουχίες που προέκυψαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων της παρούσας διατριβής, (πίνακας 7).

Πίνακας 6. Εκκινητικά μόρια από την υπάρχουσα βιβλιογραφία

PRIMER	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 5'-3'	Tm	ΘΕΣΗ GI	ΘΕΣΗ GII
mon381	CCAGAATGTACAATGGTTATGC	49.1	5647 – 5668	5362 – 5383
mon383	CAAGAGACTGTGAAGACATCATC	48	4163 – 4185	5661– 5683
SRI-2	AAATGATGATGGCGTCTA	42.8	5356 – 5373	5380 – 5397
SRI-1	CCAACCCARCCATTRTACAT	–	5652 – 5671	5467– 5486
SRI-3 (seminested)	AAAAYRTCACCGGGKGTAT	54	5578 – 5596	5653 – 5681

SR11-2	TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA	58	4856 – 4878	4583 – 4605
SR11-1	CGCCATCTTCATTACAAA	53	5351– 5369	5078 – 5096
SR11-3 (seminested)	TTWCCAAACCAACCWGCTG	55	3179 – 3197	4767– 4785
P290	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	65	4568 – 4589	4295 – 4317
P289	TGACAATGTAATCATCACCATA	55	4865 – 4884	4592 – 4613
Calman-1	GCACACTGTGTTACACTTCC	58	4840 – 4858	4194 – 4212
Calman-2	ACATTGGCTCTTGTCTGG	54	3668 – 3683	4998 – 5016
Calman-29	TATGGTGATGATGAAATAGTGTC	58	4865 – 4887	4592 – 4611
Calman-32	ATTTCCGGGCAGAAGATTG	52	5335 – 5352	6863 – 6880
P78	GGGCCCCCTGGTATAGGTAA	54.3	1682– 1701	2511– 2530
P80	TGGTGATGACTATAGCATCAGACA CAA	57.9	1943 – 1970	1748 – 1775
GV6	TTTATCAATTNAAGCCTG	–	6886 – 6903	5527– 5544
GV5	TNTAATGGCTGGAGCTTT	–	1603 – 1620	6700 – 6717
GV7	NATCATCTCNTTNTCATG	–	7091– 7108	6868 – 6885
G1F1	CTGCCCGAATTYGTAATGAT	56.0	5342 – 5362	7475 – 7492
G1R1	CCAACCCARCCATTRTACATTT	58.0	5650 – 5671	5366 – 5386
G2F1	GTGGGAGGGCGATCGCAATCT	65.0	5320 – 5340	5047– 5067
G2R1	TGCATAACCATTRTACATTCT	53.0	2931– 2951	1404 – 1423
G1SKF	CTGCCCGAATTYGTAATGA	55.0	5342 – 5361	7474 – 7492

G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	55.0	5653 – 5671	5368 – 5386
JJVMF	CCATGTTCCGTTGGATGC	60.0	–	5283–5300
G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	63.0	5321– 5337	5046 – 5064
QNIF2	ATGTTCAGRTGGATGAGR TCWGA	65.0	–	5012–5037
G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT	64.0	5652 – 5671	5367– 5389
MR3 nested 1 st	CCGTCAGAGTGGGTATGAA	57.0	4485 – 4503	4212 – 4230
MR4 nested 1 st	AGTGGGTTTGAGGCCGTA	56.0	4937 – 4953	4664 – 4680
YURI22F nested2 nd	ATGAATGAGGATGGACCCAT	56.0	4991– 5010	4232 – 4251
YURI22R nested 2 nd	CATCATCCCCGTAGAAAGAT	56.0	4858 – 4977	4585 – 4604

Πίνακας 7. Εκκινητικά μόρια τα οποία σχεδιάστηκαν με βάση τις αλληλουχίες που προέκυψαν από τα θετικά δείγματα στην παρούσα διατριβή

PRIMER	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 5'-3'	Tm	ΘΕΣΗ
NVLR52	GTCCAAGCCCACTCCTGTT	59.0	4523 – 4541
NLVR871	AGACGGTAAACTCGCCCTGT	60.0	5258 – 5279
NLVR58	GCCCACTCCTGTTTTTCATT	56.0	4529 – 4548
NLVR756	TGCCATAACCTCATTGTTGG	56.0	5143 – 5162
NLVR166	ACCCGACCTGACAAAATG A	55.0	4637 – 4652
NLVORF1041	GGCAAAAACACTGGCTCAAG	58.0	5493 – 5512

NLVORF1260	GGATGGGGAGTGTGAAAGG	59.0	5714 – 5733
NLVR166	ACCCGACCTGACAAAATG A	55.0	4637 – 4652
NLVORF1955	CAGGAATGGGTTCAGCACTT	58.0	6429 – 6448
NLVORF2902	CTTTGGGGACGGTTGAGAC	59.0	7403 – 7385
NLVORF2029	TCCTGACACTGGGAGAAACA	58.0	6537 – 6555
NLVORF2902	CTTTGGGGACGGTTGAGAC	59.0	7403 – 7385
NLVORF941	GTTCCACCACATTTCCCTGT	58.0	5412 – 5431
NLVORF1928	ACCCATAACCACCAGCAGAT	58.0	6402 – 6384
NLVORF769	TTCACCAAGGAACTCACCTG	58.0	5240 – 5259
NLVORF1753	GGGCTGTCCATCATCAAAT	56.0	6227 – 6208
NLVORF1290	GATTCCCCGCTCCAATAGAC	60.0	5761– 5779
NLVORF1974	AAGTGCTGAACCCATTCTG	58.0	6448 – 6429
NLVORF2029	TCCTGACACTGGGAGAAACA	58.0	6537 – 6555
NLVORF2703	CGTTGAATGGGTTGATTGTG	56.0	7221– 7203
NLVORF1252	ACTCCCCATCCTGACTCTTG	60.0	5724 – 5743
NLVORF1974	AAGTGCTGAACCCATTCTG	58.0	6448 – 6429
NLVH144	TGACCAAGATACAGGAAGATTGC	61.0	1845 – 1867
NLVH901	TCAAGTGCCATAACCTCATTGT	58.0	5147– 5168
NLVH297	AAGCCCACTCCTGTTTTTCA	56.0	4527– 4546

NLVH896	TGCCATAACCTCATTGTTGG	56.0	5143 – 5162
NLVC463	CTTCTGCCCTCCCTGATA	59.0	5577 – 5559
NLVC1430	GGTGCTGCTTCCTGGTAAAA	58.0	6508 – 6489
NLVC560	GGGCTAACTCTGGTGAGGAT	60.0	5638 – 5657
NLVC1522	TGAGGAACCCTTCTCTGTGC	60.0	6600 – 6581
NLVC775	CAACCCCAAATGGTAGGTG	58.0	5853 – 5872
NLVC1489	AGATGTTACGCCAGTATCG	58.0	6567 – 6548
NLVC615	CGCCCCAGATTTTGAGTTC	57.0	5693 – 5711
NLVC1376	ATGTAGCCAGACCCGTAGCC	63.0	6454 – 6473

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, Stratagene, USA), (0,5μl)

Primers (1μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50 pmol), (2μl) και

ddH₂O (nuclease free), (μέχρι τελικό όγκο 50μl)

σε ορισμένες αντιδράσεις προστέθηκε επιπλέον MgCl₂ (50mM) ως συνπαράγοντας, έτσι ώστε να ενισχυθεί η ποσότητα του προϊόντος της PCR.

Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του μορίου στόχου, στους 95°C για 2min και ακολουθεί η εφαρμογή των διαφορετικών, για κάθε ζεύγος εκκινητών, συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις

περιλαμβάνει επώαση για 5min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων προϊόντων PCR.

Για την περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας της αντίδρασης, εφαρμόστηκαν δύο επιπλέον αντιδράσεις, η Autonested και η Seminested PCR. Και στις δύο περιπτώσεις, εφαρμόζεται μια απλή PCR για 25 κύκλους και στην συνέχεια το προϊόν αυτής υποβάλλεται, κατόπιν αραίωσης, σε μια δεύτερη PCR. Στην πρώτη περίπτωση με τους ίδιους αρχικούς εκκινητές, ενώ στην δεύτερη περίπτωση με ένα ζεύγος εκκινητών όπου ο ένας είναι ο πρώτος εκκινητής της PCR και ο δεύτερος είναι εσωτερικός.

2.5.2 Συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται, οι συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, στην παρούσα διατριβή, (πίνακας 8).

Πίνακας 8. Συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης.

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες PCR	Κύκλοι	Συνθήκες Autonested dPCR και Seminested dPCR	Κύκλοι
JV12Y - JV13I	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 37°C για 1min Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
SRII-1 SRII-2 SRII-3	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Seminested PCR Ομοίως με PCR (SRII-2 – SRII-3)	40
P78 – P80	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40

G1SKR – G1SKF	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
G1SKR – JJSKF	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 60°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
G2SKR – G2SKF	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
G2SKF– P290	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 60°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
QNIF2 – G2SKR	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 60°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
CALMAN 1 – 2	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
CALMAN 29 – 32	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
MR3 – MR4 YURI22F – YURI22R	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Seminested PCR Ομοίως με PCR (YURI22F– YURI22R)	40
P289 – P290	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40

MON 381 – 383	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
SRI-2 SRI-1 SRI-3 (seminested)	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Seminested PCR Ομοίως με PCR (SRI-2 SRI-3)	40
NLVORF 2029 – 2902	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVORF 941 - 1928	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVORF 2029 - 2703	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVR 58 – 756	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVC 463 – 1430	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVH 297 – 896	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVR 166 – NLVORF 1262	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVR 166 – NLVORF 1041	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40

NLVR 52 – 871	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVORF 1955 – 2902	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVORF 769 – 1753	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVORF 1290 – 1974	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVORF 1252 - 1974	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVC 560 – 1522	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVC 775 – 1489	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVC 615 – 1376	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40
NLVH 144 – 901	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Ομοίως με PCR	40

NLVR 166 – NLVORF 1262 & NLVR 166 –1041	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVR 166 – NLVORF 1041)	40
NLVR 52 – NLVORF 871 & NLVR 58 – 756	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVR 58 – 756)	40
NLVORF 1955 –2902 & NLVORF 2029 – 2902	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVORF 2029 – 2902)	40
NLVC 463 – 1430 & NLVC 615 – 1376	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVC 615 – 1376)	40
NLVC 560 – 1522 & NLVC 615 – 1376	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVC 615 – 1376)	40
NLVH 144 – 901 & NLVH 297 – 896	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVH 297 – 896)	40

2.6 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

2.6.1 Καθαρισμός των προϊόντων

Τα θετικά προϊόντα της κάθε autonested ή seminested PCR, ηλεκτροφορούνται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε πήκτωμα αγαρόζης από 1 έως 2%. Ο προσδιορισμός του μήκους των επιθυμητών προϊόντων πραγματοποιείται με χρήση μάρτυρα μοριακού βάρους, 100 bp DNA Ladder, ο οποίος εμφανίζει το μοριακό βάρος της κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100 bp. Οι αντίστοιχες ζώνες στα προϊόντα των autonested ή seminested 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 (Qiagen, Germany), εφαρμόζοντας το εσώκλειστο, συνιστώμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

2.6.2 Προσθήκη συμπληρωματικών άκρων

Μετά τον καθαρισμό των δειγμάτων από το πήκτωμα αγαρόζης, εφαρμόζεται η αντίδραση προσθήκης κατάλληλων συμπληρωματικών άκρων. Στην παρούσα διατριβή εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα ανά περίπτωση.

Στην περίπτωση πολύ μικρής συγκέντρωσης του προϊόντος εφαρμόστηκε η GoTaq PCR, σκοπός της οποίας είναι η εκθετική ενίσχυση των συγκεκριμένων περιοχών, χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2 min, ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης στους 95°C για 1 min, υβριδοποίησης για 30 sec, η θερμοκρασία της οποίας εξαρτάται κάθε φορά από το ζεύγος των εκκινητών και επιμήκυνσης στους 72°C για 1 min, για 20 κύκλους. Το τελικό στάδιο της αντίδρασης περιλαμβάνει την επώαση των δειγμάτων για 5 min στους 72°C.

Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση αυτών σε 2% συγκέντρωση αγαρόζης και ο δεύτερος καθαρισμός τους από το πήκτωμα, με χρήση του προαναφερθέντος ΚΙΤ.

Στην περίπτωση όπου η συγκέντρωση του δείγματος ήταν επαρκής για να κλωνοποιηθεί, εφαρμόστηκε η προσθήκη Α-άκρων σύμφωνα με το εσωκλειστο, συνιστώμενο πρωτόκολλο της TOPO[®]TACloningKit (Invitrogen, USA).

2.6.3 Μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων PCR

Η διαδικασία έλαβε χώρα καθώς υπήρχε η υποψία για ταυτόχρονη ύπαρξη άνω του ενός στελέχους Νοροϊών σε αυτά. Έτσι, κάθε κλώνος μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων που προέκυψε, περιείχε κλωνοποιημένο το γενωμικό τμήμα από μόνο ένα διακριτό στέλεχος. Για την πραγματοποίηση της μοριακής κλωνοποίησης των προϊόντων καθώς και την οπτική επιβεβαίωση της διαδικασίας, ακολουθήθηκαν τέσσερα διαδοχικά βήματα.

A. Αντίδραση λιγάσης ή τοποϊσομεράσης

Σκοπός της αντίδρασης αυτής είναι να επιτραπεί η ενσωμάτωση του ενισχυμένου, πλέον, γενωμικού τμήματος σε πλασμίδιο (φορέα κλωνοποίησης). Οι φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι ο pGEM[®]-TEasy Vector System (Promega, USA) και ο pCR 2.1-TOPO[®]VECTOR (Invitrogen, USA).

B. Παραγωγή δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο (χλωριούχο 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 περιοχή 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 μετριέται η απορρόφηση τους σε OD_{600} , 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 , απορρίπτεται το υπερκείμενο, διαλυτοποιείται το ίζημα σε παγωμένου CaCl_2 συγκέντρωσης 0,1 M (Sigma, USA) και η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά.

Γ. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

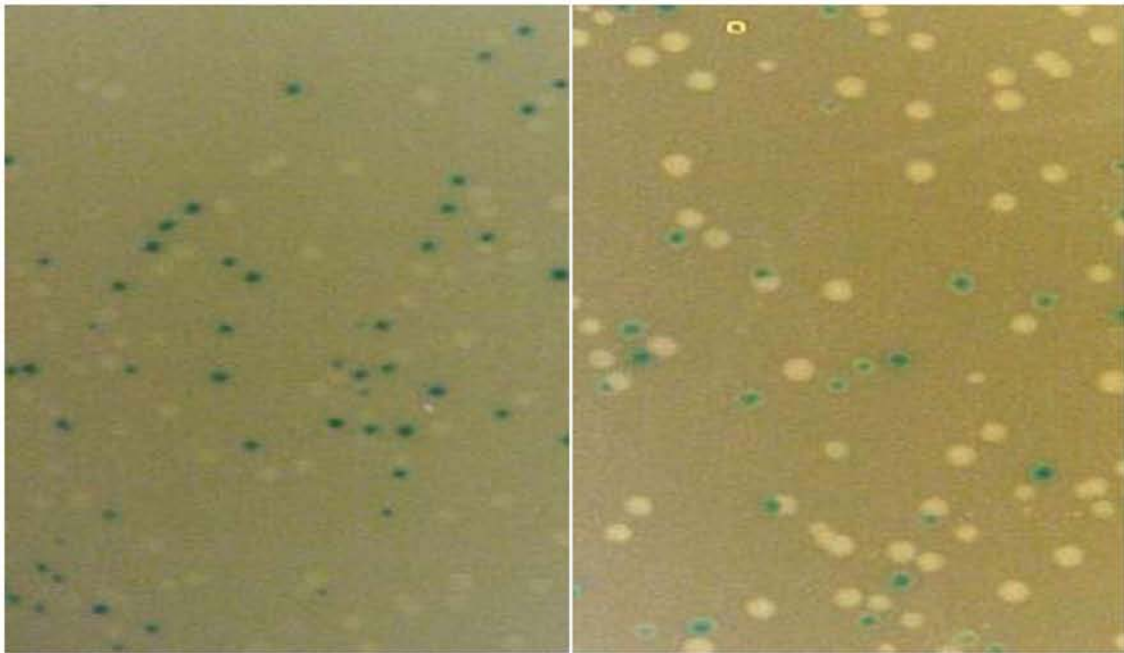
Η διαδικασία ενσωμάτωσης του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης στα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα, ξεκινά με τη μεταφορά αυτών σε αποστειρωμένα tubes. Ακολουθεί η προσθήκη του μισού ποσού της αντίδρασης της λιγάζης, του κάθε δείγματος, σε αντίστοιχο tube και μετά από ήπια ανάδευση, τοποθετούνται στον πάγο για 30 min. Στην συνέχεια, επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 42°C για 90 sec και ακολούθως μεταφέρονται και πάλι στον πάγο για 2 min (heat shock). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας heat shock, μεταφέρεται ποσότητα των μετασχηματισμένων 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 37⁰C.

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 μετασχηματιστεί 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.

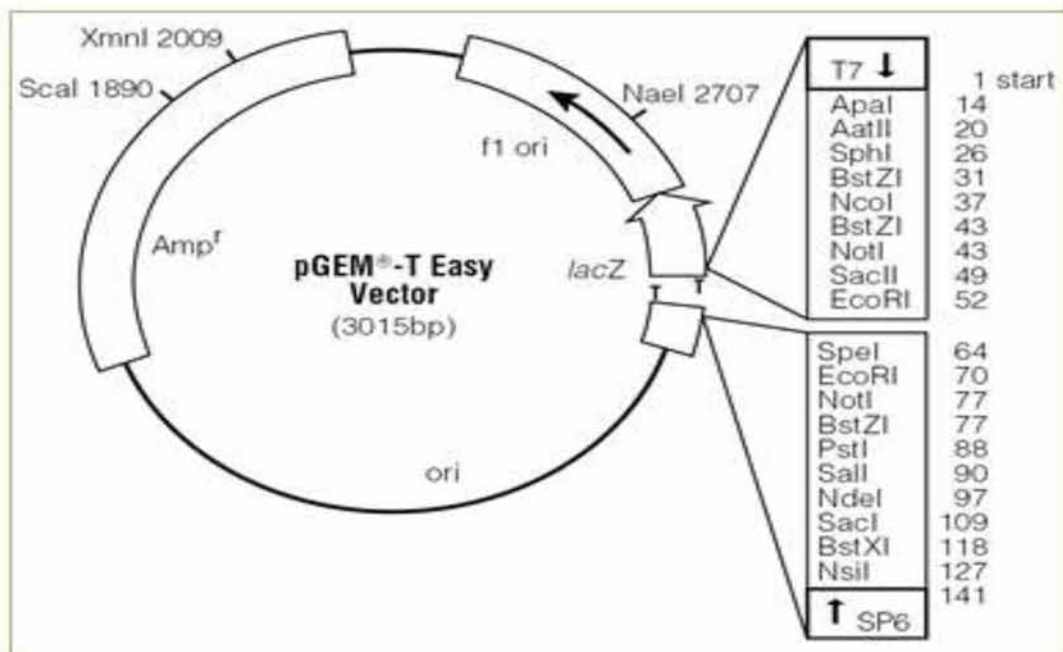
Έτσι, όταν στον φορέα κλωνοποίησης δεν έχει εισαχθεί στην περιοχή πολυσυνδέτη το επιθυμητό ένθεμα, παράγεται το τμήμα α της β-γαλακτοσιδάσης, σχηματίζοντας το ενεργό ένζυμο και η X-gal διασπάται παράγοντας μπλε αποικίες. Στην περίπτωση που έχει γίνει ένθεση του προϊόντος PCR στην περιοχή πολυσυνδέτη,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

Η πειραματική διαδικασία συνεχίζει 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 37⁰C 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, (εικ.15).



Εικ.15. Διάκριση μεταξύ μπλε και λευκών αποικιών για τον εντοπισμό ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης (www.bio.davidson.edu)

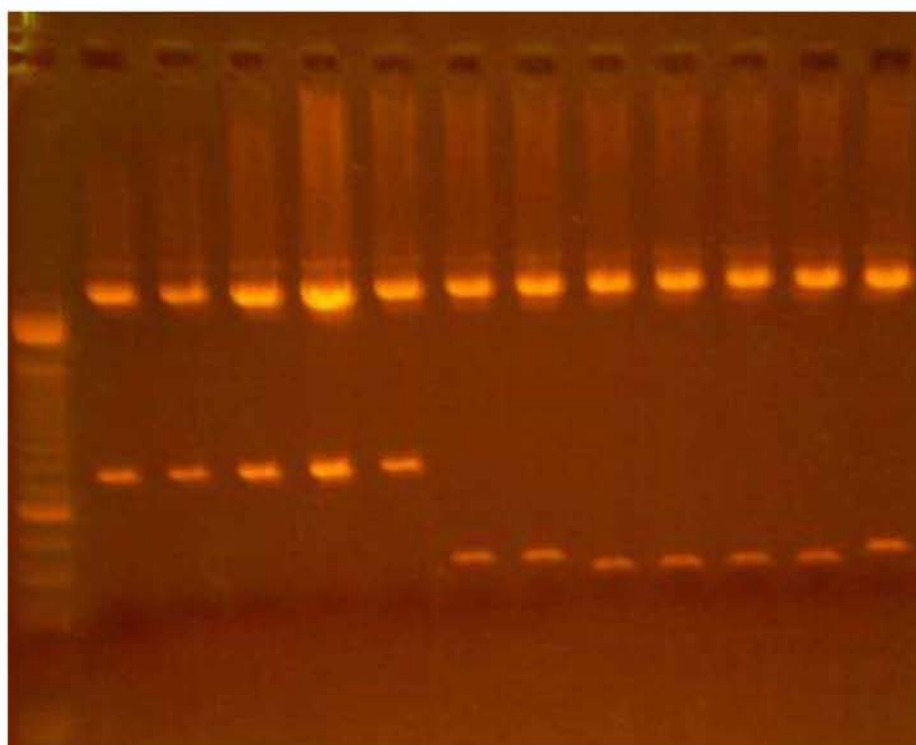
Δ. Πέψη με EcoRI



Εικόνα 16: Ο φορέας κλωνοποίησης pGEM®-T Easy Vector System. Φαίνονται το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης καθώς και οι θέσεις κοπής με το ένζυμο περιορισμού EcoRI.

Η πραγματοποίηση αυτής της αντίδρασης είναι σημαντική για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στον πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης. 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.

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 ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, (εικ.17).



Εικ.17 Ενδεικτική εικόνα πέψης με EcoRI

2.6.4 Εύρεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των κλωνοποιημένων προϊόντων (αλληλούχιση)

Η αλληλούχιση των κλωνοποιημένων προϊόντων της autonested GoTaq PCR πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία MacroGen Inc. (Seoul,

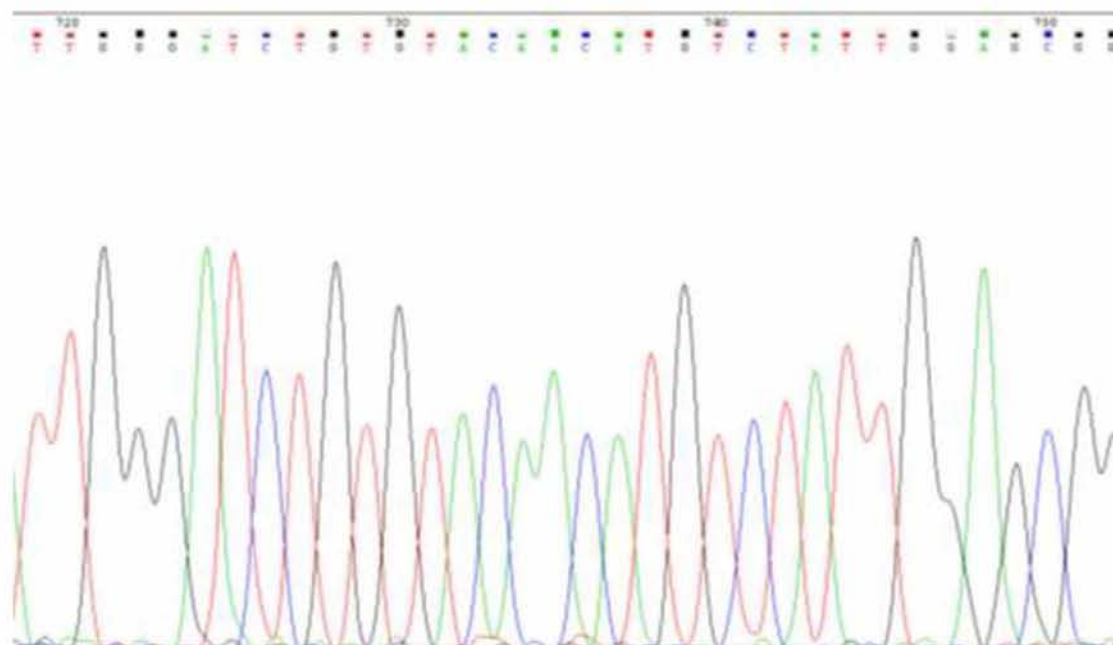
Korea), με εκκινητές τους προαγωγείς T7 και SP6 του φορέα κλωνοποίησης, οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης.

2.6.5 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, οι οποίες βρίσκονται καταχωρημένες στην παγκόσμια γονιδιακή τράπεζα δεδομένων (GenBank).

Η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών αυτών πραγματοποιήθηκε με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής που διατίθενται δωρεάν στο διαδίκτυο.

2.6.6 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών



Εικ. 18. Οι «κορυφές» του χρωματογραφήματος αντιστοιχούν στις διαφορετικές βάσεις της αλληλουχίας του DNA.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, παραλαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος (εικ.18) 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).

2.6.7 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 στοίχισεις 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.

2.6.8 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.

2.6.9 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 Neighbor Joining ανήκει στις μεθόδους που υπολογίζουν ανά ζεύγη αποστάσεις, βάση των οποίων κατασκευάζεται το φυλογενετικό δέντρο. Πιο συγκεκριμένα, εισάγει διαδοχικά κλαδιά σε ένα ζεύγος κοντινότερων γειτόνων, οι οποίοι ουσιαστικά είναι οι πιο απομονωμένοι. 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 observeddistance (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.

2.6.10 Αναζήτηση ανασυνδιασμών

Η αναζήτηση τυχόν ανασυνδιασμών διαφορετικών στελεχών Νοροϊών πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), MEGA4 και SimPlot. Αρχικά χωρίζονται τα γονίδια των στελεχών που αλληλουχήθηκαν με βάση τα πρότυπα στελέχη. Στην συνέχεια κατασκευάζονται φυλογενετικά δέντρα για το καθ' ένα ξεχωριστά με τα στελέχη που με βάση το BLAST, εμφάνιζαν μεγαλύτερη ομοιότητα. Τέλος, στην περίπτωση που τα φυλογενετικά δέντρα έδειχναν διαφορετική κατανομή των γονιδίων στους κλάδους με τα διαθέσιμα στελέχη, ολόκληρες οι αλληλουχίες των στελεχών καθώς και ολόκληρες οι αλληλουχίες των διαθέσιμων στελεχών εισάγονταν στο πρόγραμμα SimPlot για την επιβεβαίωση ύπαρξης του ανασυνδιασμού καθώς και της ακριβούς θέσης αυτού.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR, AUTONESTEDKAI SEMINESTED

Αρχικά, όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μία PCR και μία AutoNested PCR με δύο διαφορετικά εκκινητικά ζεύγη MON381-MON383 και P78-P80 που με βάση την βιβλιογραφία είναι ειδικά στην ανίχνευση των δύο κύριων παθογόνων γενετικών ομάδων GII και GI αντίστοιχα.

Από τα 53 περιβαλλοντικά δείγματα 19 ήταν θετικά για την γενετική ομάδα II και 8 από αυτά ήταν επίσης θετικά και την γενετική ομάδα I. Από τα 29 κλινικά δείγματα τα οποία εξετάστηκαν, 20 ήταν θετικά για την γενετική ομάδα II και 3 δείγματα ήταν επίσης θετικά και για την γενετική ομάδα I.

Στην συνέχεια, όλα τα θετικά δείγματα, ανεξαρτήτου γενετικής ομάδας, ελέγχθησαν με όλα τα υπόλοιπα εκκινητικά μόρια, έτσι ώστε να επιτευχθεί η όσο το δυνατό μεγαλύτερη κάλυψη του γενώματος των στελεχών τα οποία ανιχνεύθηκαν, τα αποτελέσματα των οποίων παρατίθενται στους πίνακες 9 και 10.

Πίνακας 9. Στην πρώτη στήλη παρατίθενται όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή, στην δεύτερη στήλη, τα εκκινητικά ζεύγη με τα οποία ενισχύθηκαν τα θετικά δείγματα, στην τρίτη στήλη οι περιοχές του γενώματος των στελεχών που αλληλουχίστηκαν και στην τέταρτη στήλη η γενετική ομάδα και ο γενότυπος που άνηκαν τα στελέχη που ενισχύθηκαν.

Περιβαλλοντικά Δείγματα	Ζεύγη εκκινητών ενίσχυσης	Συνολική περιοχή ενίσχυσης γενώματος	Γενετική ομάδα – Γενότυπος
LR2F	–	–	–
LR5	–	–	–

LR6F	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, NLVORF1290 – NLVORF1974, MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 5761 – 6448 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.9/ GII.6 GII.6 GII.6
LR6P	–	–	–
LR7P	–	–	–
LR8	–	–	–
LR9	–	–	–
LR10	–	–	–
LR11	–	–	–
LR12	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, NLVORF2029 - NLVORF2902, MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 6565 – 7420 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.9/ GII.6 GII.6 GII.6
LR14	–	–	–
LR16	–	–	–
LRB1	–	–	–
LRB2F	–	–	–
GNIF	NLVH297 – NLVH896, QNIF2 – G2SKR, NLVORF2029 – NLVORF2703 MON381 – MON383, P78 – P80	4527 – 5126 4971 – 5348 6546 – 7221 5361 – 5674 1682 – 1970	GII.9/ GII.6 GII.9/ GII.6 GII.6 GII.6 GI

GN2	SRII1-SRII2-SRII3 NLVH297 – NLVH896, MON381 – 383	4579 – 4781 4527 – 5126 5361 – 5674	GII.4 GII.9/ GII.6 GII.6
TRIF	–	–	–
TRIP	–	–	–
TR2	–	–	–
TR3P	–	–	–
TR3F	NLVH297 – NLVH896, QNIF2 – G2SKR, MON381 – MON383	4527 – 5126 4971 – 5348 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.9/ GII.6 GII.6
TR4	–	–	–
TR5	–	–	–
EIS1	SRII1-SRII2-SRII3 NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383	4579 – 4781 4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674	GII.4 GII.9/ GII.6 GII.9/ GII.6 GII.6
EIS2	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.9/ GII.6 GII.6
EIS3	–	–	–
EIS4	–	–	–
EIS5	SRII1-SRII2-SRII3 NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383 P78 – P80	4579 – 4781 4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674 1682 – 1970	GII.4 GII.9/ GII.6 GII.6 GI

EIS6	SRII1-SRII2-SRII3 NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383 P78 – P80	4579 – 4781 4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674 1682 – 1970	GII.4 GII.9/ GII.6 GII.6 GI
AB7	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, NLVORF2029 – NLVORF2703, MON381 – MON383, P78 – P80	4527 – 5126, 4557 – 5275 6546 – 7221 5361 – 5674 1682 – 1970	GII.9/ GII.6 GII.6 GI
AB8	–	–	–
AB9	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383, P78 – P80	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674 1682 – 1970	GII.9/ GII.6 GII.6 GI
AB10	–	–	–
EX11	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383, NLVORF1955 – NLVORF2902 P78 – P80	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674 6429 – 7385 1682 – 1970	GII.9/ GII.6 GII.6 GII.6 GI
EX12	–	–	–
AB13	–	–	–
EX14	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, NLVORF1955 – NLVORF2902 MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 6429 – 7385 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.6

AB15	-	-	-
AB18	-	-	-
AB19	SRII1-SRII2-SRII3 NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383	4579 – 4781 4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674	GII.4 GII.9/ GII.6 GII.6
R1_LUG	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.6
R2_LUG	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.6
R3_LUG	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.6
GNL012	-	-	-
KR012A	-	-	-
KR012B	-	-	-
KR012C	-	-	-
LR012A	-	-	-

TRN012A	SRII1-SRII2-SRII3	4579 – 4781	GII.4
	MON381 – MON383	5361 – 5674	GII.4
	P78 – P80	1682 – 1970	GI
MRK012	–	–	–
TRN012B	–	–	–
TR012A	–	–	–
KR012D	MON381 – MON383	5361 – 5674	GII.6
	P78 – P80	1682 – 1970	GI

Πίνακας 10 Στην πρώτη στήλη παρατίθενται όλα τα κλινικά δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή, στην δεύτερη στήλη, τα εκκινητικά ζεύγη με τα οποία ενισχύθηκαν τα θετικά δείγματα, στην τρίτη στήλη οι περιοχές του γενώματος των στελεχών που αλληλουχίστηκαν και στην τέταρτη στήλη η γενετική ομάδα και ο γενότυπος που άνηκαν τα στελέχη που ενισχύθηκαν.

Κωδικοποίηση δείγματος	Ζεύγη εκκινητών ενίσχυσης	Συνολική περιοχή ενίσχυσης γενώματος	Γενετική ομάδα – Γενότυπος
A1	–	–	–
A2	NLVH297 – NLVH896,	4527 – 5126,	GII.9/ GII.6
	NLVR52 – NLVR871,	4557 – 5275	
	MON381 – MON383	5361 – 5674	GII.6
A3	–	–	–
A4	–	–	–
A5	–	–	–
A6	NLVR 58 – NLVR 756 NLVH297 – NLVH896 NLVR52 – NLVORF871 G2SKF – G2SKR MON381 – 383 NLVORF941 – NLVORF1928 NLVC463 – NLVC1430 NLVORF1955 – NLVORF2902	4529 – 5162 4527– 5162 4523– 5279 5046 – 5389 5361 – 5674 5412– 6402 5577 – 6508 6429 – 7385	GII.9/ GII.6

A10	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.6
A12	NLVORF2029 – NLVORF2703 MON381– MON383	6546 – 7221 5361 – 5674	GII.6 GII.4
A15	MON381– MON383	5361 – 5674	GII.4
KP1	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.6
KP2	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.6
KP3	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383, P78-P80	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674 1682 – 1970	GII.9/ GII.6 GII.6 GI
KP4	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.6
N1	–	–	–
N2	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674	GII.9/ GII.6 GII.6

N3	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871, MON381 – MON383, P78-P80	4527 – 5126, 4557 – 5275 5361 – 5674 1682 – 1970	GII.9/ GII.6 GII.6 GI
LR13	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871 QNF2 – G2SKR MON381-383	4527 – 5126 4557 – 5275 5012 – 5389 5361 – 5674	GII.9/ GII.4 GII.4
LR15	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871 QNF2 – G2SKR MON381-383	4527 – 5126 4557 – 5275 5012 – 5389 5361 – 5674	GII.9/ GII.4 GII.4
AG4	NLVR52 – NLVR871 MON381-383, P78-P80	4557 – 5275 5361 – 5674 1682 – 1970	GII.9/GI.7 GII.9 GI
AK1	P290 – G2SKR MON381-383	4295 – 5370 5361 – 5674	GII.4 GII.4
AK2	MON381-383	5361 – 5674	GII.4
AK3	–	–	–
AK4	MON381-383	5361 – 5674	GII.6
AK5	MON381-383	5361 – 5674	GII.6
AK6	MON381-383	5361 – 5674	GII.4
AK7	–	–	–
AK8	–	–	–

AK9	MON381-383	5361 – 5674	GII.4
AK10	–	–	–

3.2 Φυλογενετική ανάλυση στελεχών

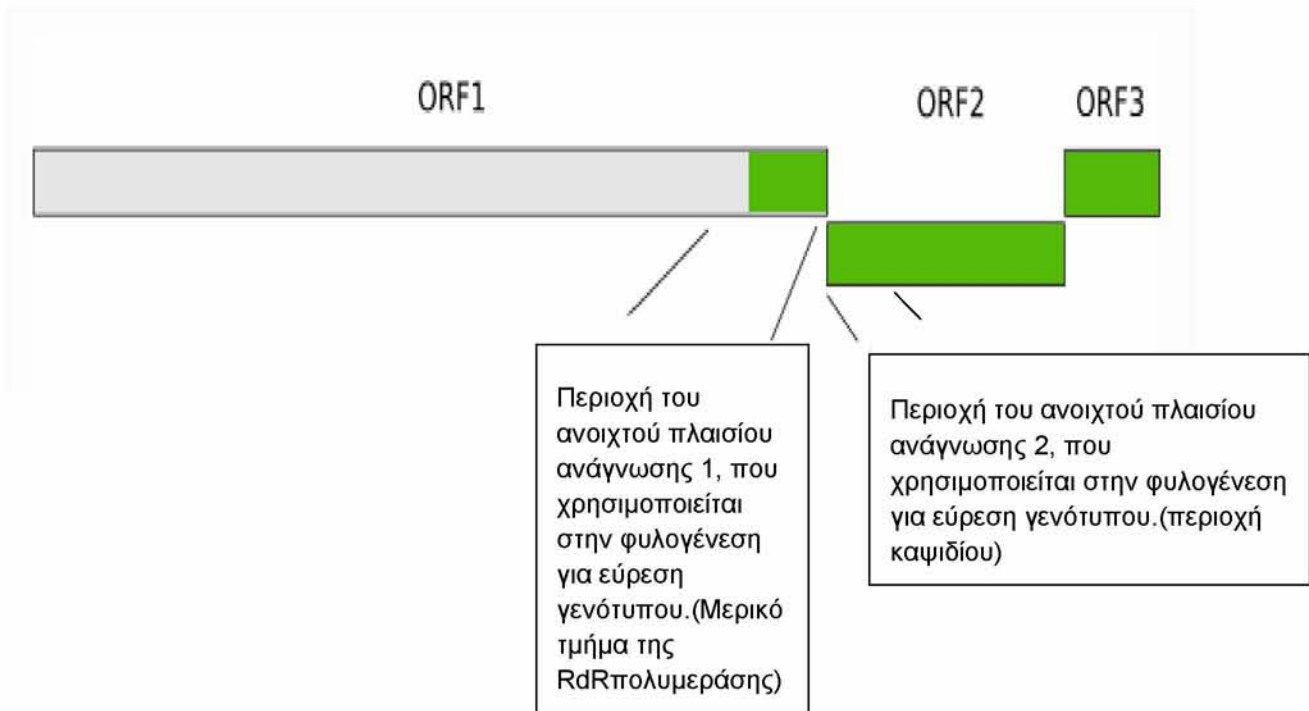
Μετά την κλωνοποίηση και αλληλούχηση των θετικών δειγμάτων ακολούθησε η κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων που είχε ως σκοπό την ταξινόμηση του κάθε στελέχους, που εντοπίστηκε, σε επίπεδο γενετικής ομάδας και γενοτύπου. Έτσι, κάθε στέλεχος συγκρίθηκε με τα στελέχη όπου, με βάση το πρόγραμμα βιοπληροφορικής BLAST, εμφάνιζε μεγαλύτερη ομοιότητα καθώς και πρότυπα στελέχη που άνηκαν στις γενετικές ομάδες GI και GII, τα οποία αποτελούν σημαντικά παθογόνα για τον άνθρωπο.

3.3 Ανασυνδυασμένα στελέχη νοροϊών

3.3.1 Κλινικό δείγμα A6

Το πρώτο στέλεχος νοροϊών το οποίο χαρακτηρίστηκε κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής απομονώθηκε από το κλινικό δείγμα A6. Το δείγμα συλλέχθηκε από ένα παιδί δύο ετών, θηλυκού γένους, το οποίο εισήχθη στο πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ιωαννίνων φέροντας όλα τα τυπικά κλινικά συμπτώματα προσβολής του ιού.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ELISA, η οποία έδωσε θετικά αποτελέσματα. Στην συνέχεια το γένωμα του στελέχους ενισχύθηκε με μία σειρά αλληλεπικαλυπτόμενων εκκινητών με αποτέλεσμα να αλληλουχηθεί ένα σημαντικό τμήμα του, από την θέση 4527 – 7385, (πίνακας 10, εικ. 19).

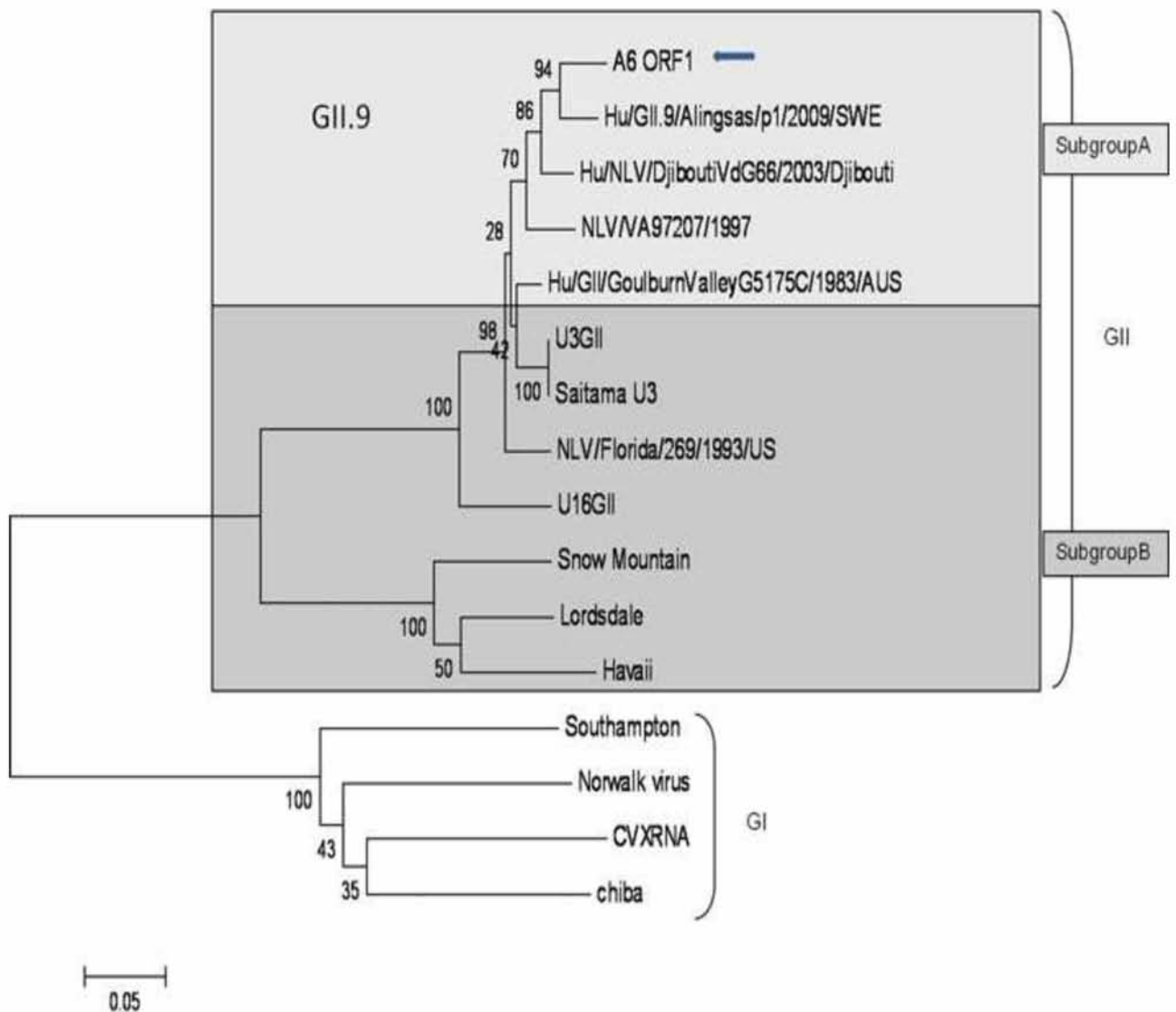


Εικ. 19 Στέλεχος A6. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται το τμήμα του γενώματος που ενισχύθηκε στην παρούσα εργασία.

Η αναζήτηση της κοντινότερης ή όμοιας αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στην διεθνή τράπεζα δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο. Στην συνέχεια, ολόκληρη η υπό μελέτη αλληλουχία του στελέχους, υποβλήθηκε σε ομοπαράθεση με τις διαθέσιμες αλληλουχίες που παρουσίασαν υψηλή ομολογία, με βάση τα αποτελέσματα του BLAST, καθώς και με τα πρότυπα στελέχη των Νοροϊών με την χρήση του προγράμματος clustalW, το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>). Η ομοπαράθεση των στελεχών είχε ως σκοπό να διαχωριστούν σωστά τα δύο γονίδια (ORF1 και ORF2). Αφού τα δύο γονίδια διαχωρίστηκαν, ακολούθησε η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων για το καθ' ένα γονίδιο ξεχωριστά, με τα στελέχη που με βάση το BLAST εμφάνιζαν μεγαλύτερη ομοιότητα καθώς και με τα πρότυπα στελέχη.

ORF1

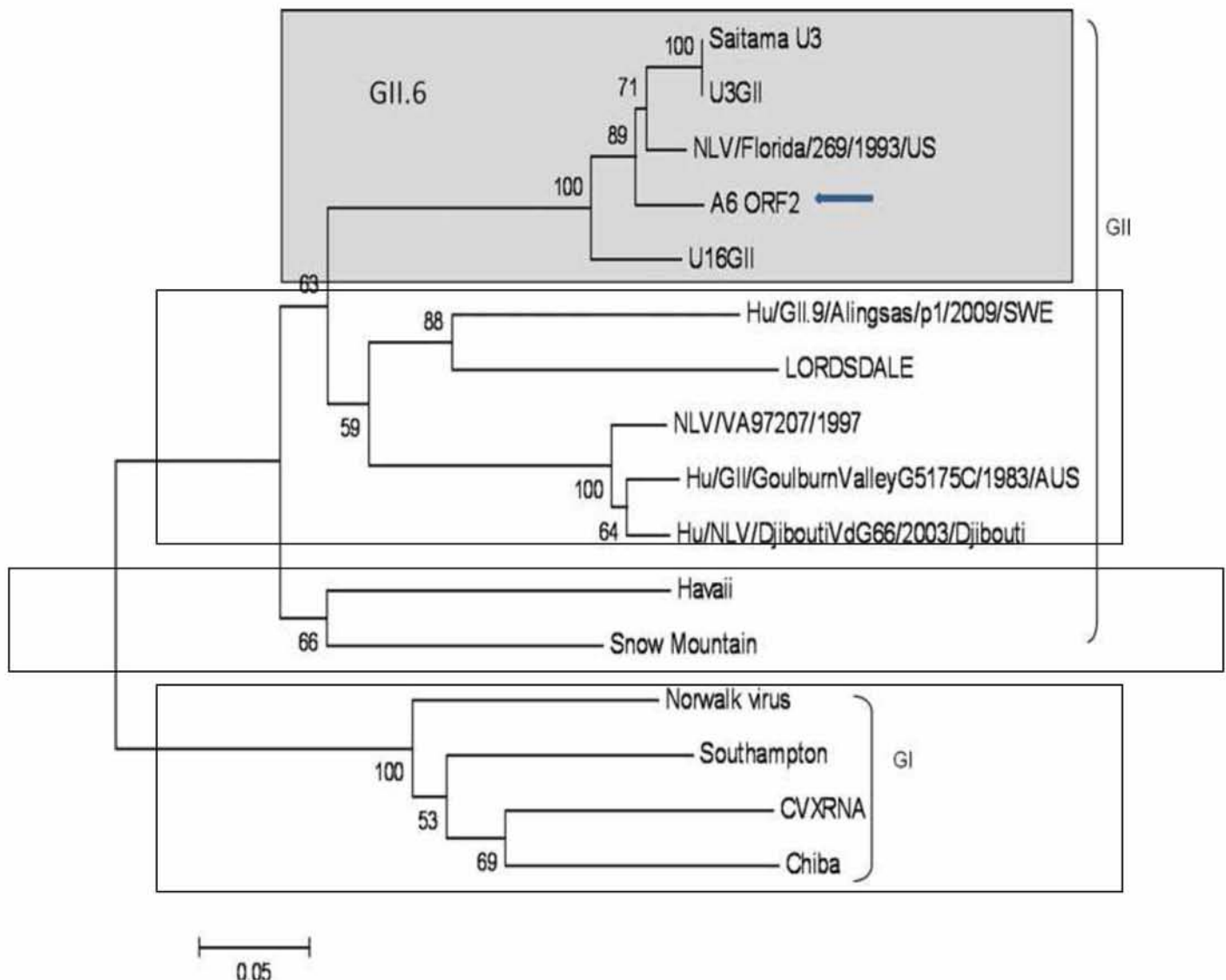
Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με χρήση της μερικής αλληλουχίας του ORF1, κατέταξε το γονίδιο του στελέχους A6 με τα στελέχη που ανήκουν στην γενετική ομάδα δύο και στον γενότυπο εννιά. Επίσης, το στέλεχος A6, σχημάτισε φυλογενετικό κλάδο με το στέλεχος Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE, το οποίο απομονώθηκε στην Σουηδία το 2009, από κλινικό δείγμα, (εικ. 20).



Εικ. 20. Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο με βάση τη μερική αλληλουχία, (4527–5062bp) του A6 ORF1 γονιδίου {accession number: HM172493}, τις κοντινότερες συγγενικά αλληλουχίες με βάση το πρόγραμμα BLAST και τα πρότυπα στελέχη των γενετικών ομάδων I και II. Στην υποομάδα A (subgroupA) ομαδοποιούνται τα στελέχη που ανήκουν στην γενετική ομάδα II και γενότυπο 9. Στην υποομάδα B (subgroupB) ομαδοποιούνται στελέχη που ανήκουν στην γενετική ομάδα II και γενότυπο 6. Τέλος, ομαδοποιούνται τα πρότυπα στελέχη της γενετικής ομάδας I.

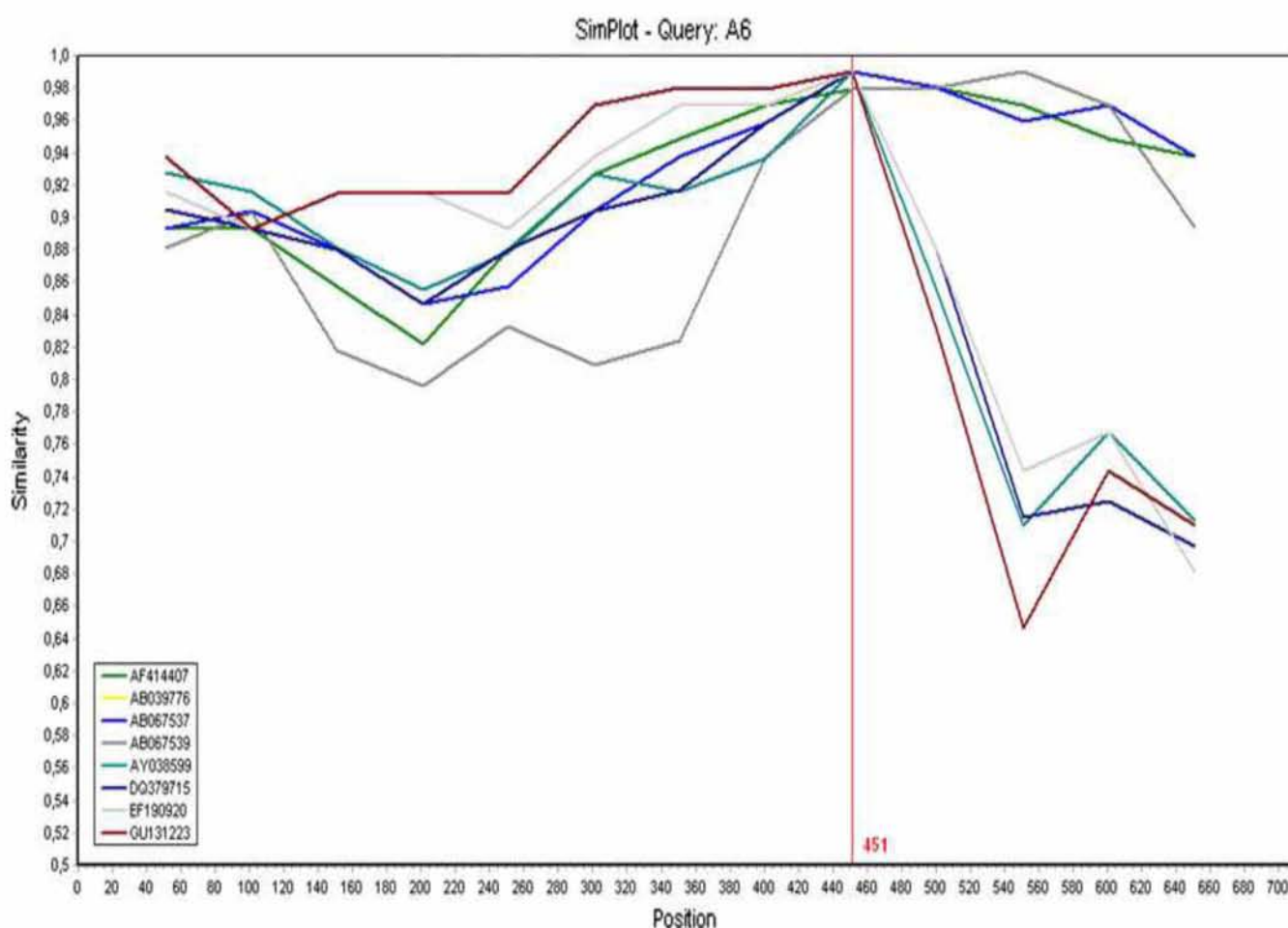
ORF2

Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με χρήση της αλληλουχίας του ORF2, κατέταξε το γονίδιο του στελέχους A6 με τα στελέχη που ανήκουν στην γενετική ομάδα δύο και στον γενότυπο έξι. Σχημάτισε μονοφυλογενετική σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη της ομάδας, αλλά έδειξε σαφή διαχωρισμό από τον γενότυπο εννιά και μεγάλη φυλογενετική απόσταση από το στέλεχος Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE, με το οποίο σχημάτισε κλάδο στο φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε για το γονίδιο ORF1, (εικ. 21).



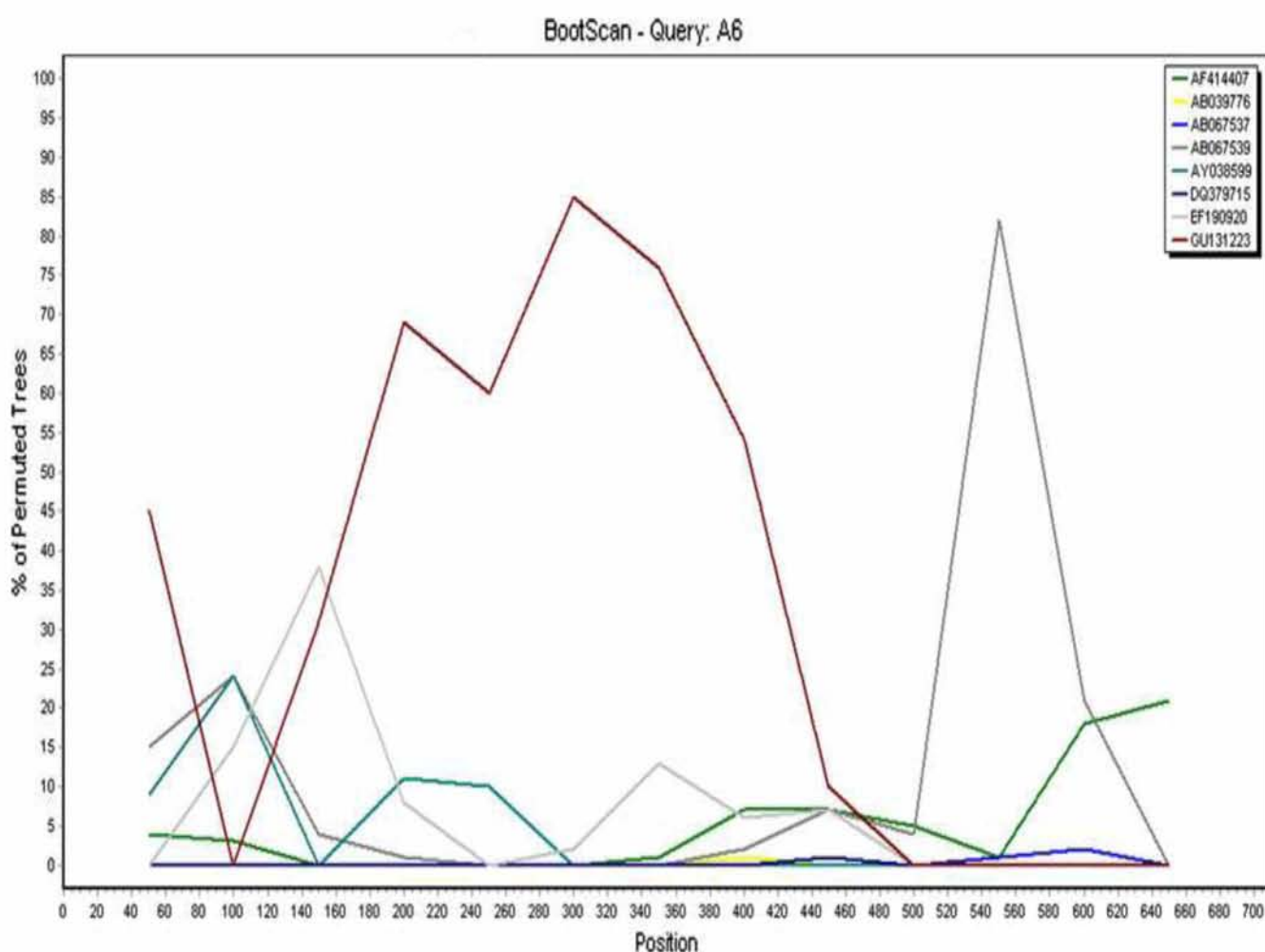
Εικ. 21. Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο με βάση ολόκληρη την αλληλουχία (5043–6689bp) του A6 ORF2 γονιδίου (accession number: HM172494). Στο γκρι πλαίσιο ομαδοποιούνται όλα τα στελέχη της γενετικής ομάδας II, γενότυπου 6. Οι τρεις υπόλοιποι κλάδοι που σχηματίζονται (από πάνω προς τα κάτω) περιέχουν τα στελέχη της γενετικής ομάδας II, γενότυπου 9, δύο πρότυπα στελέχη της γενετικής ομάδας II και τα πρότυπα στελέχη της γενετικής ομάδας I.

Μετά την σαφή ένδειξη των φυλογενετικών δέντρων για την ύπαρξη ανασυνδιασμού μεταξύ δύο διαφορετικών γενοτύπων, στα δύο γονίδια του στελέχους A6, εφαρμόστηκε το πρόγραμμα SimPlot για την επιβεβαίωση ύπαρξης του ανασυνδιασμού καθώς και τον καθορισμό της ακριβούς θέσης αυτού, (εικ. 22). Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης φάνηκε ότι το στέλεχος A6, είναι όντως ανασυνδυασμένο μεταξύ των δύο γονιδίων ORF1 και ORF2, στην θέση 5.043 του γενώματος, μεταξύ των δύο γενοτύπων εννιά και έξι της γενετικής ομάδας δύο των νοροϊών.



Εικ. 22 Ανάλυση Simplot για τη μερική ακολουθία της RdRp και την ολόκληρη αλληλουχία του γονιδίου του καπιδίου του στελέχους A6. Η κάθετη κόκκινη γραμμή δείχνει το σημείο διασταύρωσης στη θέση 5.043 μεταξύ των ORF1/ORF2 γονιδίων. Το μέγεθος του παραθύρου ήταν 100 bp με μέγεθος βήματος 50 bp. Ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την ομοιότητα μεταξύ των νουκλεοτιδίων (πλάτος στο αριστερό κάτω άκρο του σχήματος), εκφρασμένα ως ποσοστά. Ο οριζόντιος άξονας υποδεικνύει τις θέσεις νουκλεοτιδίων της περιοχής του γονιδιώματος που αναλύθηκαν.

Επιπρόσθετα και δεδομένου ότι το τμήμα της αλληλουχίας που ενισχύθηκε ήταν μεγάλο και μας επέτρεπε την ανάλυση, εφαρμόστηκε και η ανάλυση BootScan, ως επιπλέον επιβεβαίωση ύπαρξης ανασυνδιασμού. Η συγκεκριμένη ανάλυση στηρίζεται στην ομοπαράθεση της αλληλουχίας που εξετάζεται με ένα σύνολο αλληλουχιών αναφοράς. Η ομοπαράθεση πραγματοποιείται ανά μικρά διαδοχικά τμήματα των προς εξέταση αλληλουχιών, δημιουργώντας φυλογενετικά δέντρα. Έτσι, δημιουργείται για κάθε δέντρο που παράγεται μία τιμή, η οποία τοποθετεί το ανασυνδυασμένο τμήμα με κάθε ένα από τα δέντρα των αλληλουχιών αναφοράς. Το αποτέλεσμα δίδεται υπό τη μορφή γραφήματος το οποίο παρουσιάζει τη μεταβολή της ομοιότητας μεταξύ των στελεχών, κατά μήκος της αλληλουχίας τους, (εικ. 23).

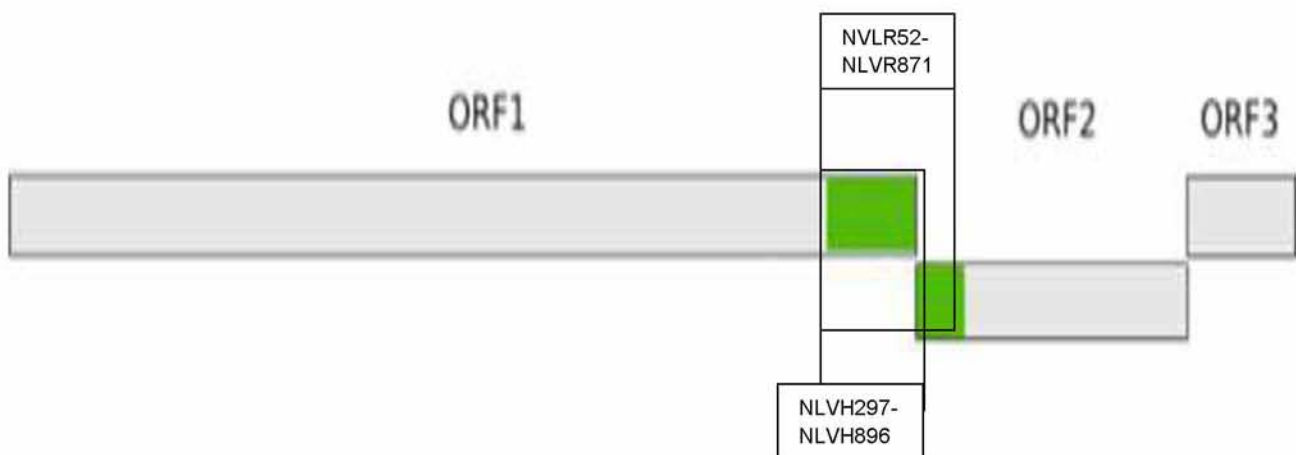


Εικ. 23. Ανάλυση BootScan της γονιδιωμικής περιοχής του ανασυνδιασμού στη θέση 5.043 του στελέχους A6 με τα στελέχη των Νοροϊών που συμμετείχαν στην φυλογενετική ανάλυση.

3.3.2 Ανασυνδιασμένα στελέχη Νοροϊών GII.9/GII.6

Η εμφάνιση ανασυνδυασμού μεταξύ διαφορετικών νοροϊκών γονιδιωμάτων, όπως του στελέχους A6, αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των νοροϊών ως προς την εξέλιξη τους. Έχει αποδειχθεί ότι, οι ανασυνδυασμοί μπορούν να επηρεάσουν καθοριστικά τη μολυσματικότητα των Νοροϊών και να τους προσδώσουν έναν αποτελεσματικό μηχανισμό για τη διατήρησή τους σε ένα δεδομένο πληθυσμό. Η εμφάνιση και η περαιτέρω εξάπλωση ενός συγκεκριμένου ανασυνδυασμένου στελέχους στον πληθυσμό, αποδεικνύει ότι, ο ανασυνδυασμός όχι μόνο δεν εμποδίζει την λοιμογόνο δύναμη του στελέχους αλλά ενδεχομένως και να την ευνοεί.

Με βάση τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε μία προσπάθεια εντοπισμού και παρακολούθησης της κυκλοφορίας του συγκεκριμένου ανασυνδυασμένου στελέχους (A6), με τους εκκινήτες NLVH297-NLVH896 και NVLR52-NLVR871 (πίνακας 7). Οι εκκινήτες αυτοί καλύπτουν το σημείο ανασυνδυασμού, χωρίς να ενισχύουν ολόκληρες τις αλληλουχίες που αποτελούν τα δύο γονίδια (ORF1/ORF2), (εικ. 24). Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 15 περιβαλλοντικά και 10 κλινικά δείγματα, τα οποία συλλέχθηκαν από το 2006 έως το 2011 από την ίδια γεωγραφική περιοχή, (πίνακας 11 και 12).



Εικόνα 24. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται το σημείο πάνω στο γονιδίωμα που ενισχύθηκε στα περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα με τους εκκινήτες NLVH297-NLVH896 και NVLR52-NLVR871.

Πίνακας 11. Αναλυτικός πίνακας όλων των περιβαλλοντικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό του ανασυνδυασμένου στελέχους Α6. Στην πρώτη στήλη παρατίθενται όλα τα περιβαλλοντικά δείγματα που εξετάστηκαν, στην δεύτερη στήλη, ο αριθμός κατάθεσης των αλληλουχιών που κατατεθήκαν στην παγκόσμια τράπεζα δεδομένων GenBank, στην τρίτη στήλη η προέλευση του κάθε δείγματος, στην τέταρτη στήλη η ημερομηνία συλλογής τους, στην πέμπτη στήλη τα εκκινητικά ζεύγη με τα οποία ενισχύθηκαν τα θετικά δείγματα, στην έκτη στήλη οι περιοχές του γενώματος των στελεχών που αλληλουχήθηκαν και στην έβδομη στήλη η γενετική ομάδα και ο γενότυπος που άνηκαν τα στελέχη που ενισχύθηκαν.

Κωδικοποίηση περιβαλλοντικού δείγματος	Accession no	Προέλευση δείγματος	Ημερομηνία συλλογής	Εκκινητές ενίσχυσης	Περιοχή ενίσχυσης Γενώματος	Γενετική ομάδα/ Γενότυπος
EIS5	KC212141	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2009	NLVH297–NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
EX11	KC212142	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2009	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
EX14	KC212143	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2009	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
EIS6	KC212144	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2009	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
LR6F	KC212145	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2006	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
AB9	KC212146	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2009	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6

AB19	KC212147	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2009	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
AB7	KC212148	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2009	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
EIS1	KC212154	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2009	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
LR12	KC212155	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2007	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
EIS2	KC212156	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2009	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
R1_LUG	KC662398	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2010	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
R2_LUG	KC662399	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2010	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
R3_LUG	KC662400	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2010	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126, 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
LR5	–	Βιολ.Καθ.Λάρισα	2006	–	–	–

Πίνακας 12. Αναλυτικός πίνακας όλων των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό του ανασυνδυασμένου στελέχους A6. Στην πρώτη στήλη παρατίθενται όλα τα κλινικά δείγματα που εξετάστηκαν, στην δεύτερη στήλη, ο αριθμός κατάθεσης των αλληλουχιών που κατατεθήκαν στην παγκόσμια τράπεζα δεδομένων GenBank, στην τρίτη στήλη η προέλευση του κάθε δείγματος, στην τέταρτη στήλη η ημερομηνία συλλογής τους, στην πέμπτη στήλη τα εκκινητικά ζεύγη με τα οποία ενισχύθηκαν τα θετικά δείγματα, στην έκτη στήλη οι περιοχές του γενώματος των στελεχών που αλληλουχήθηκαν και στην έβδομη στήλη η γενετική ομάδα και ο γενότυπος που άνηκαν τα στελέχη που ενισχύθηκαν.

Κωδικοποίηση περιβαλλοντικού δείγματος	Accession no	Προέλευση δείγματος	Ημερομηνία συλλογής	Εκκινητές ενίσχυσης	Περιοχή ενίσχυσης Γενώματος	Γενετική ομάδα/ Γενότυπος
KR2	KC212149	ΠΝΛ	2006	NLVH297–NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
KR3	KC212150	ΠΝΛ	2006	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
N3	KC212151	ΠΝΛ	2011	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
A2	KC212152	ΠΝΙ	2008	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
A10	KC212153	ΠΝΙ	2008	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
KR1	KC212157	ΠΝΛ	2006	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
KR4	KC212158	ΠΝΛ	2006	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126 4557 – 5275	GII.9/ GII.6

N2	KC212159	ΠΝΛ	2011	NLVH297 – NLVH896, NLVR52 – NLVR871	4527 – 5126 4557 – 5275	GII.9/ GII.6
A1	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-

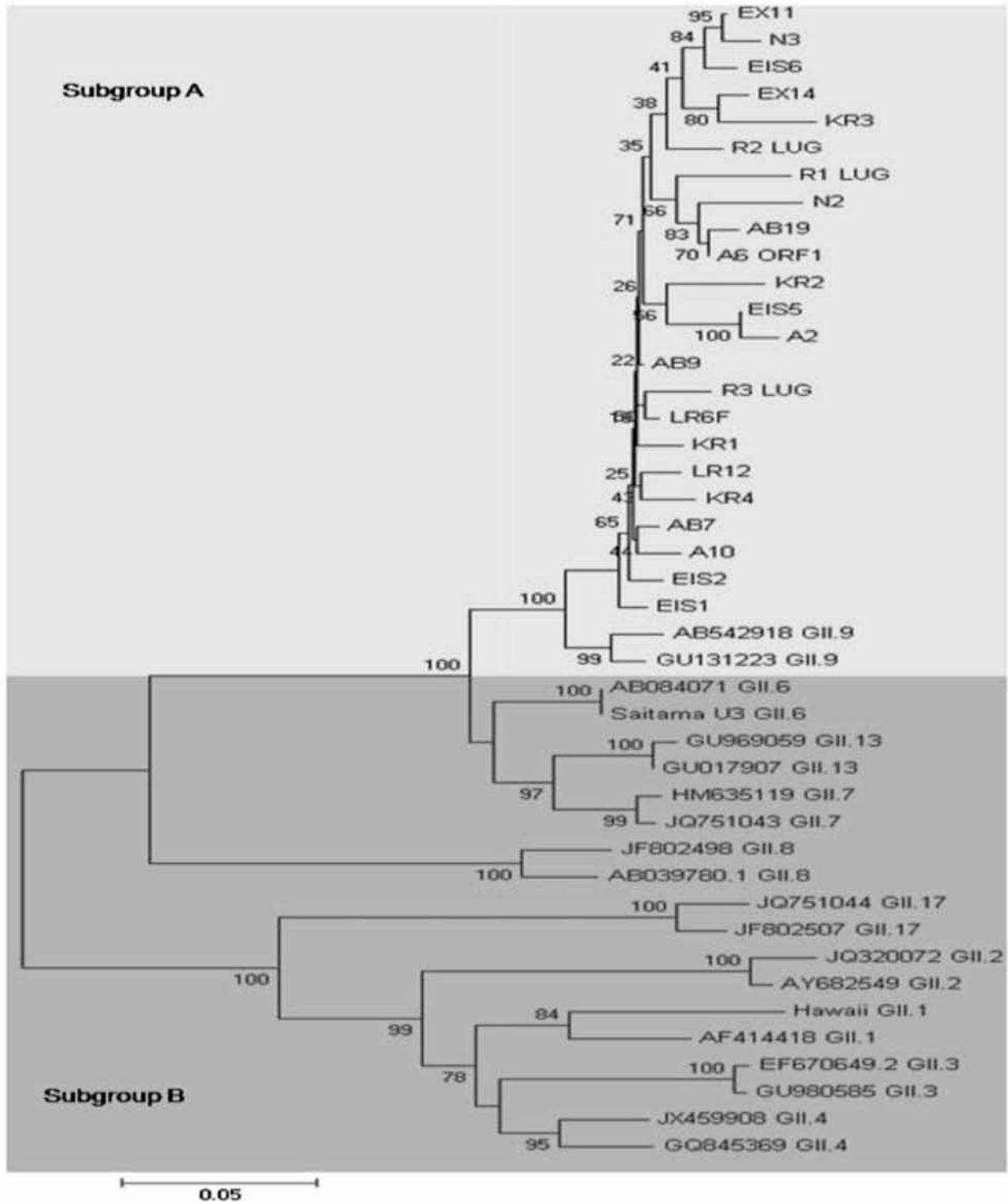
Ακολούθησε η αλληλούχιση των θετικών ζωνών που ενισχύθηκαν με τα επιλεγμένα εκκινητικά ζεύγη NLVH297-NLVH896 και NLVR52-NLVR871. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αναζήτηση της κοντινότερης ή όμοιας αλληλουχίας μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στην διεθνή τράπεζα δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Από τα 15 περιβαλλοντικά δείγματα και από τα 10 κλινικά δείγματα τα 14 και 8 αντίστοιχα ήταν θετικά για τον ίδιο τύπο ανασυνδυασμού GII.9/GII.6

Κατόπιν, ολόκληρες οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν σε ομοπαράθεση με τις διαθέσιμες αλληλουχίες που παρουσίασαν υψηλή ομολογία, με βάση τα αποτελέσματα του BLAST καθώς και με τα πρότυπα στελέχη των Νοροϊών με την χρήση του προγράμματος clustalW (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>), έτσι ώστε να διαχωριστούν σωστά τα δύο γονίδια (ORF1 και ORF2). Αφού τα δύο γονίδια διαχωρίστηκαν, σε όλες τις αλληλουχίες, ακολούθησε η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων για το κάθε γονίδιο ξεχωριστά και με δύο αντιπροσωπευτικά στελέχη από κάθε γενότυπο των Νοροϊών.

ORF1

Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με χρήση των μερικών αλληλουχιών που άνηκαν στο γονίδιο ORF1, κατέταξε τα στελέχη με αυτά που ανήκουν στην γενετική ομάδα δύο και στον γενότυπο εννιά, σχηματίζοντας έναν μονοφυλογενετικό κλάδο μεταξύ τους και με σαφή διαχωρισμό από τους

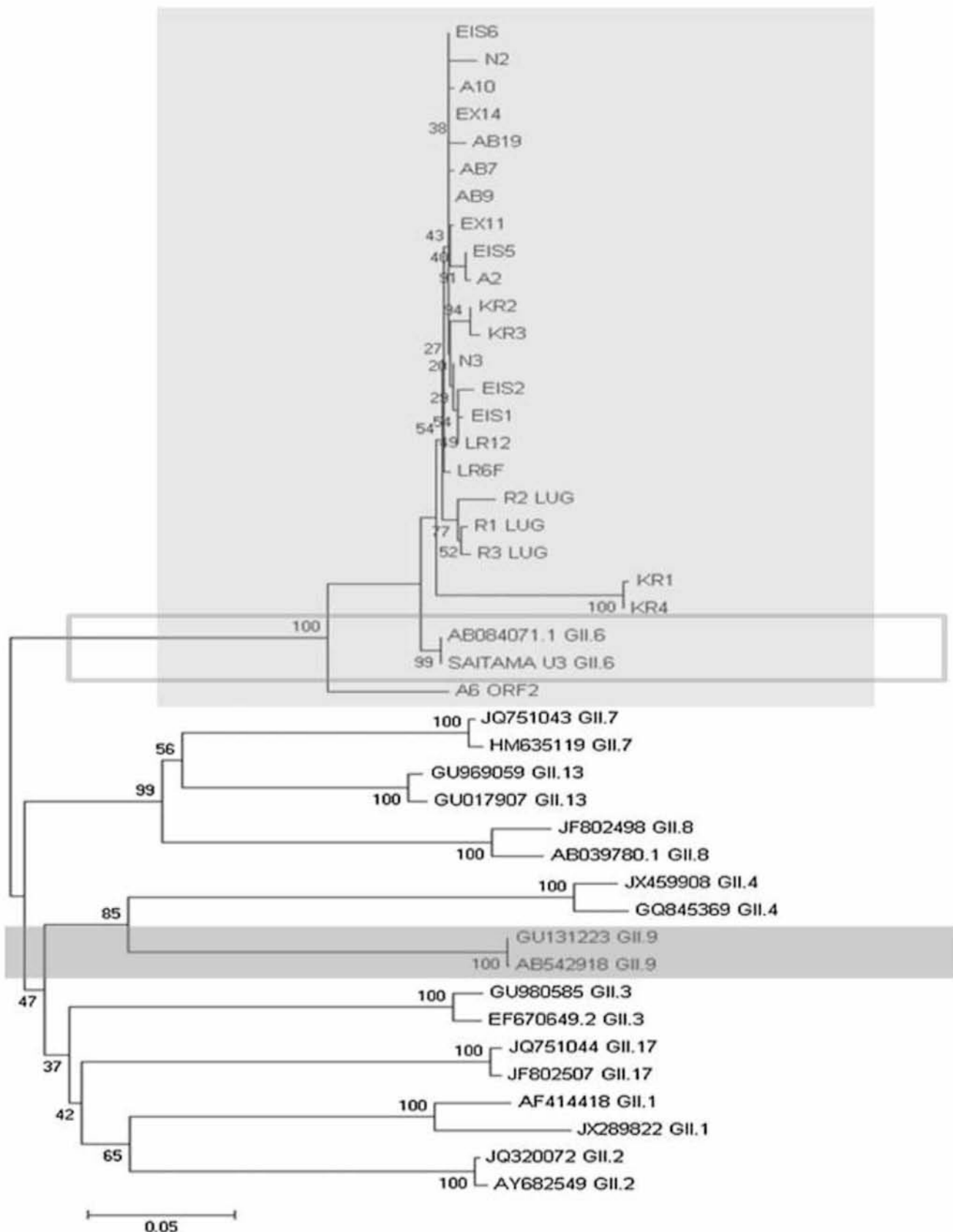
υπόλοιπους γενότυπους της γενετικής ομάδας II των Νοροϊών, που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη ανάλυση, (εικ.25).



Εικ. 25. Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο με βάση τις μερικές αλληλουχίες του ORF1 γονιδίου (4523–5061bp). ΥποομάδαA (SubgroupA): Μονοφυλογενετικός κλάδος των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, ομαδοποιημένος με τα δύο αντιπροσωπευτικά στελέχη του γενότυπου 9. ΥποομάδαB (SubgroupB): όλα τα υπόλοιπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, από όλους τους διαθέσιμους γενότυπους της γενετικής ομάδας II των Νοροϊών.

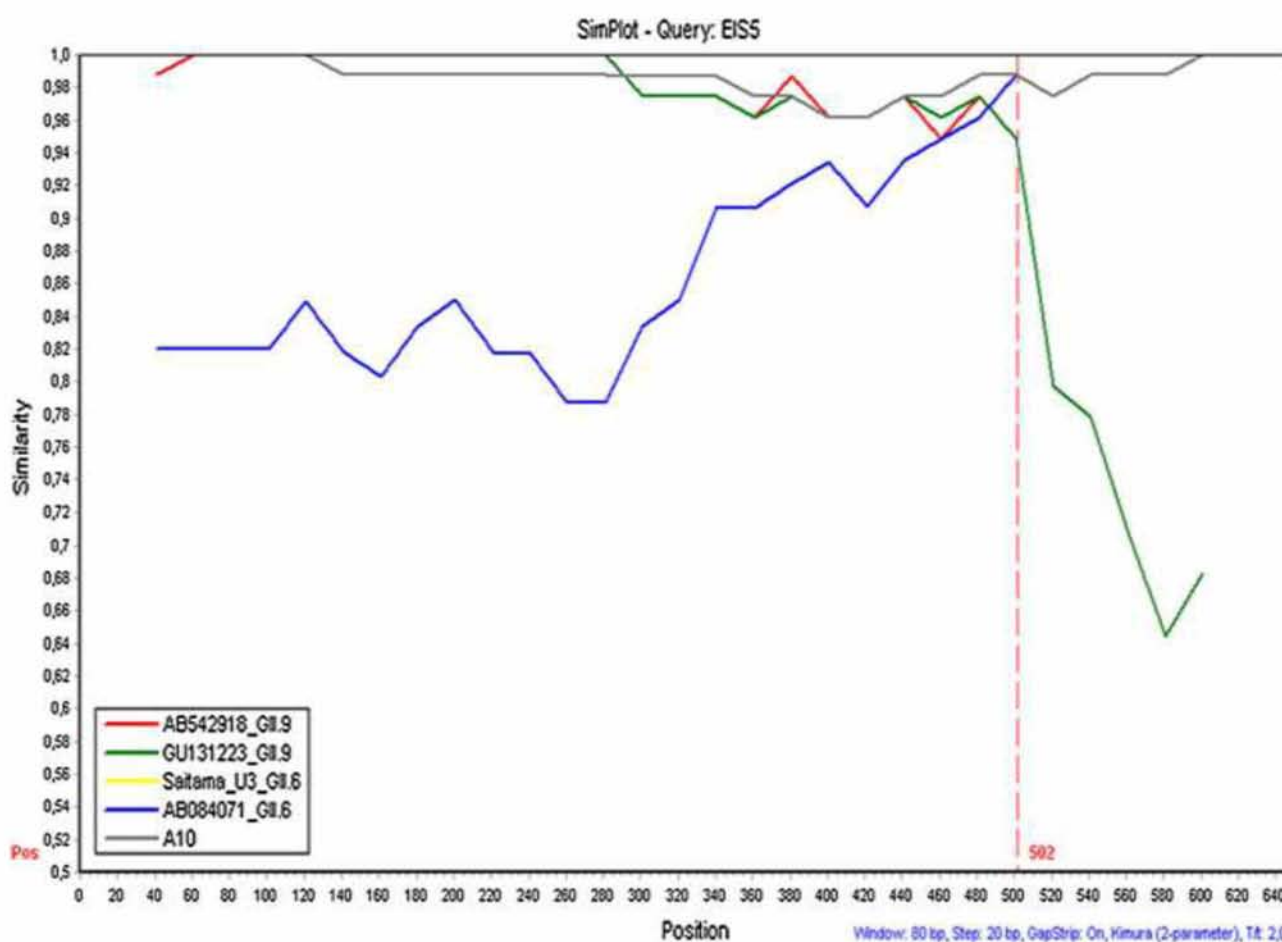
ORF2

Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με χρήση των μερικών αλληλουχιών που άνηκαν στο γονίδιο ORF2, κατέταξε τα στελέχη με τα στελέχη που ανήκουν στον γενότυπο έξι της γενετικής ομάδας II. Σχημάτισαν μονοφυλετική σχέση με τα δύο αντιπροσωπευτικά στελέχη του γενότυπου, και έδειξαν σαφή διαχωρισμό από τον γενότυπο εννιά που είχαν ομαδοποιηθεί στο γονίδιο ORF1 καθώς και μεγάλη φυλογενετική απόσταση από όλους τους υπόλοιπους γενότυπους, (εικ. 26).



Εικ. 26. Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο με βάση τις μερικές αλληλουχίες του ORF2 γονιδίου. Πλαίσιο με γκρι ανοιχτό χρώμα: Μονοφυλογενετικός κλάδος των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, ομαδοποιημένος με τα δύο αντιπροσωπευτικά στελέχη του γενότυπου 6. Πλαίσιο με γκρι περίγραμμα : τα δύο αντιπροσωπευτικά στελέχη του γενότυπου 6. Πλαίσιο με γκρι σκούρο χρώμα : τα δύο αντιπροσωπευτικά στελέχη του γενότυπου 9 της γενετικής ομάδας II των νοροϊών.

Μετά τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης και την σαφή ένδειξη που αυτά έδωσαν για την ύπαρξη ανασυνδιασμού μεταξύ δύο διαφορετικών γενοτύπων, εφαρμόστηκε το πρόγραμμα SimPlot για την επιβεβαίωση ύπαρξης του ανασυνδιασμού καθώς και τον καθορισμό της ακριβούς θέσης αυτού, (εικ. 27). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε, ενδεικτικά, σε δύο στελέχη που απομονώθηκαν από ένα περιβαλλοντικό (EIS6) και ένα κλινικό δείγμα (A10), δεδομένου ότι η νουκλεοτιδική ομοιότητα που εμφάνιζαν όλα τα στελέχη μεταξύ τους κυμαινόταν από 97-99%. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης φάνηκε ότι τα στελέχη, ήταν όντως ανασυνδυασμένα μεταξύ των δύο γονιδίων ORF1 και ORF2, στην θέση 5.023 του γενώματος.

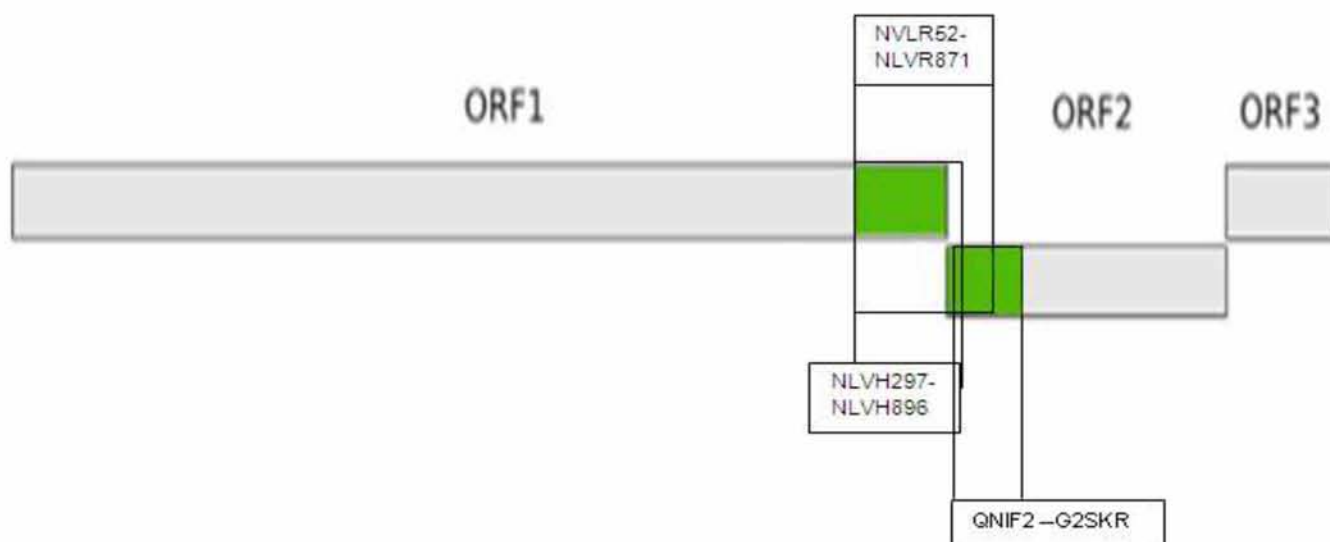


Εικ. 27 Ανάλυση SimPlot για τις ακολουθίες της RdRp και του καψιδίου του περιβαλλοντικού στελέχους EIS5 και του κλινικού στελέχους A10. Η κάθετη κόκκινη γραμμή δείχνει το σημείο ανασυνδιασμού μεταξύ των δύο γονιδίων ORF1/ORF2 στη θέση 5.023. Το μέγεθος του παραθύρου ήταν 80 bp με μέγεθος βήματος 20 bp. Ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την ομοιότητα μεταξύ των νουκλεοτιδίων (παραθύρο αριστερά του σχήματος), εκφρασμένα ως ποσοστά. Ο οριζόντιος άξονας υποδεικνύει τις θέσεις των νουκλεοτιδίων της περιοχής του γονιδιώματος που αναλύθηκαν, (4527 – 5275bp).

3.3.3 Άλλοι ανασυνδυασμοί

Εκτός των ανασυνδυασμών του τύπου GII.9/GII.6, εντοπίστηκαν τρία ακόμη στελέχη, τα οποία σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, έφεραν καινούργιους ανασυνδυασμούς μεταξύ των δύο γονιδίων ORF1/ORF2. Τα στελέχη αυτά (LR13, LR15 και AG4) απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα και προήρχοντο από το πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ιωαννίνων από άτομα τα οποία εισήχθησαν φέροντας όλα τα τυπικά κλινικά συμπτώματα προσβολής του ιού. Τα στελέχη LR13 και LR15 ήταν ανασυνδυασμένα μεταξύ δύο διαφορετικών γονοτύπων της ίδιας γενετικής ομάδας συγκεκριμένα μεταξύ των GII.9/GII.4 νοροϊκών γονιδιωμάτων (ORF1/ORF2 αντίστοιχα), στην θέση 5039, ενώ το στέλεχος AG4 ήταν ανασυνδυασμένο μεταξύ δύο διαφορετικών γενετικών ομάδων GII.9/GI.7 νοροϊκών γονιδιωμάτων (ORF1/ORF2 αντίστοιχα), στην θέση 4982.

Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν πέντε κλινικά δείγματα, τα οποία συλλέχθηκαν από πέντε νεαρά άτομα (αγόρια και κορίτσια), ηλικίας 14 – 17 ετών, τα οποία εισήχθησαν στο πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ιωαννίνων φέροντας όλα τα τυπικά κλινικά συμπτώματα προσβολής του ιού. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την χρήση των προαναφερθέντων εκκινητικών μορίων NLVH297-NLVH896 και NVLR52-NLVR871 και ενός ακόμα ζεύγους QNIF2 – G2SKR. Το ζεύγος QNIF2–G2SKR είναι αλληλεπικαλυπτόμενο με τα προηγούμενα και χρησιμοποιήθηκε έτσι ώστε να αυξήσει το μήκος της τελικής αλληλουχίας που θα προέκυπτε ώστε η αλληλουχία να είναι καταλληλότερη για την φυλογενετική ανάλυση, (εικ. 29, πίν. 13).



Εικόνα 29. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται σημείο πάνω στο γονιδίωμα που ενισχύθηκε στα περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα με τους εκκινητές NLVH297-NLVH896, NLVR52-NLVR871 και QNIF2 – G2SKR

Πίνακας 13. Αναλυτικός πίνακας των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

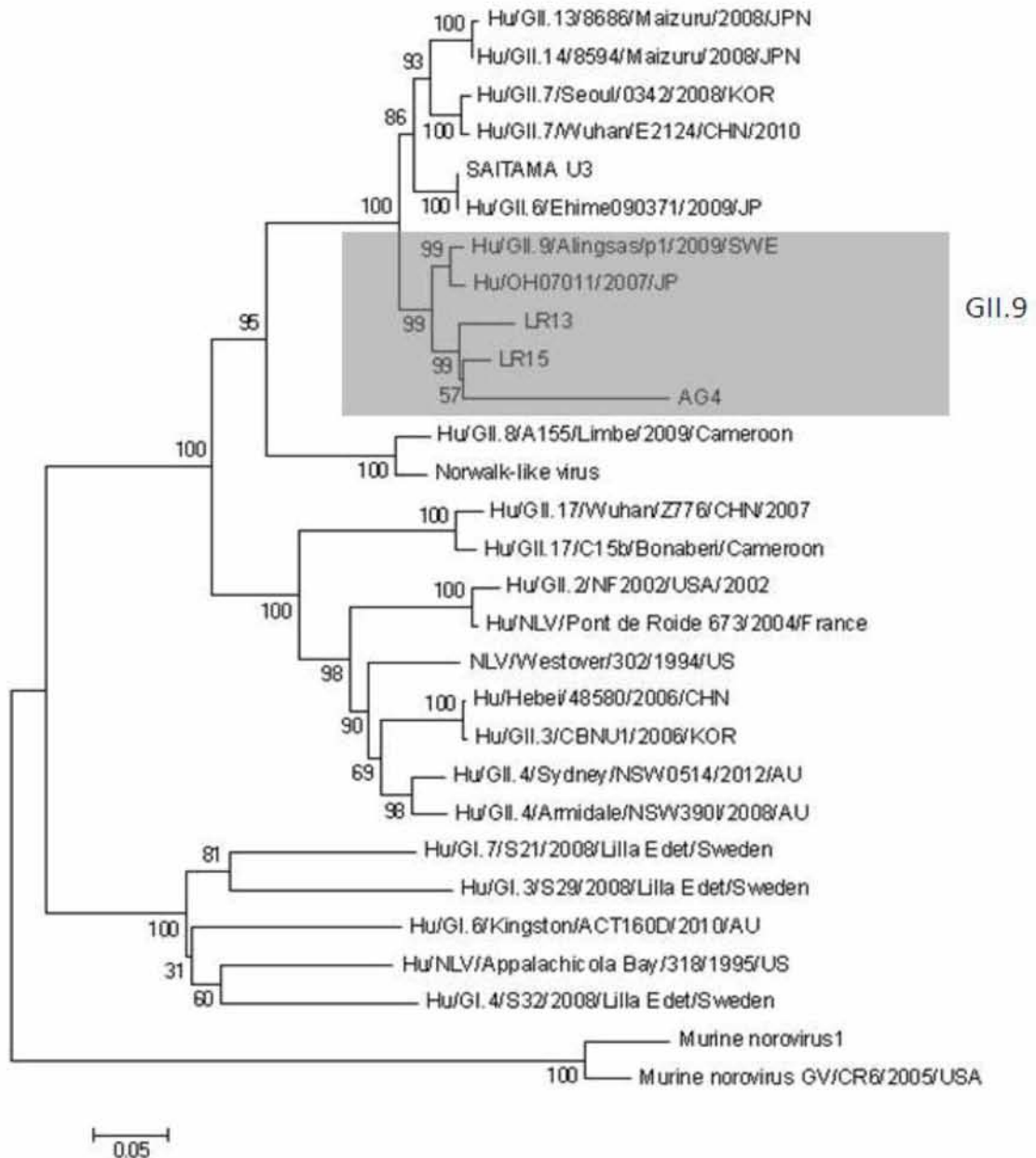
Κωδικοποίηση δείγματος	Accession no	Προέλευση δείγματος	Ημερομηνία συλλογής	Εκκινητές ενίσχυσης	Περιοχή ενίσχυσης Γενώματος	Γενετική ομάδα/ Γενότυπος
LR13	KC212149	ΠΝΙ	2012	NLVH297–NLVH896 NLVR52 – NLVR871 QNIF2 – G2SKR	4527 – 5126 4557 – 5275 5012 – 5389	GII.9/ GII.4
LR14_η	–	ΠΝΙ	2012	NLVH297 – NLVH896 NLVR52 – NLVR871 QNIF2 – G2SKR	–	–
LR15	KC212151	ΠΝΙ	2012	NLVH297 – NLVH896 NLVR52 – NLVR871 QNIF2 – G2SKR	4527 – 5126 4557 – 5275 5012 – 5389	GII.9/ GII.4

AG4	KC212152	ΠNI	2012	NLVH297 – NLVH896 NLVR52 – NLVR871 QNIF2 – G2SKR	4527 – 5126 4557 – 5275 5012 – 5389	GII.9/ GI.7
AG5_n	KC212153	ΠNI	2012	NLVH297 – NLVH896 NLVR52 – NLVR871 QNIF2 – G2SKR	–	–

Από τα πέντε κλινικά δείγματα τα τρία ήταν θετικά στην ύπαρξη Νοροϊκού στελέχους. Αφού ολοκληρώθηκε η αλληλούχιση των θετικών ζωνών, στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αναζήτηση της κοντινότερης ή όμοιας αλληλουχίας μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στην διεθνή τράπεζα δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Κατόπιν, ολόκληρες οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν σε ομοπαράθεση με τις διαθέσιμες αλληλουχίες που παρουσίασαν υψηλή ομολογία, με βάση τα αποτελέσματα του BLAST καθώς και με τα πρότυπα στελέχη των Νοροϊών με την χρήση του προγράμματος clustalW (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>), έτσι ώστε να διαχωριστούν σωστά τα δύο γονίδια (ORF1 και ORF2). Αφού τα δύο γονίδια διαχωρίστηκαν, και στις τρεις αλληλουχίες, ακολούθησε η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων για το κάθε γονίδιο ξεχωριστά, με δύο αντιπροσωπευτικά στελέχη από κάθε γενότυπο των νοροϊών από τρεις γενετικές ομάδες GI, GII και GV.

ORF1

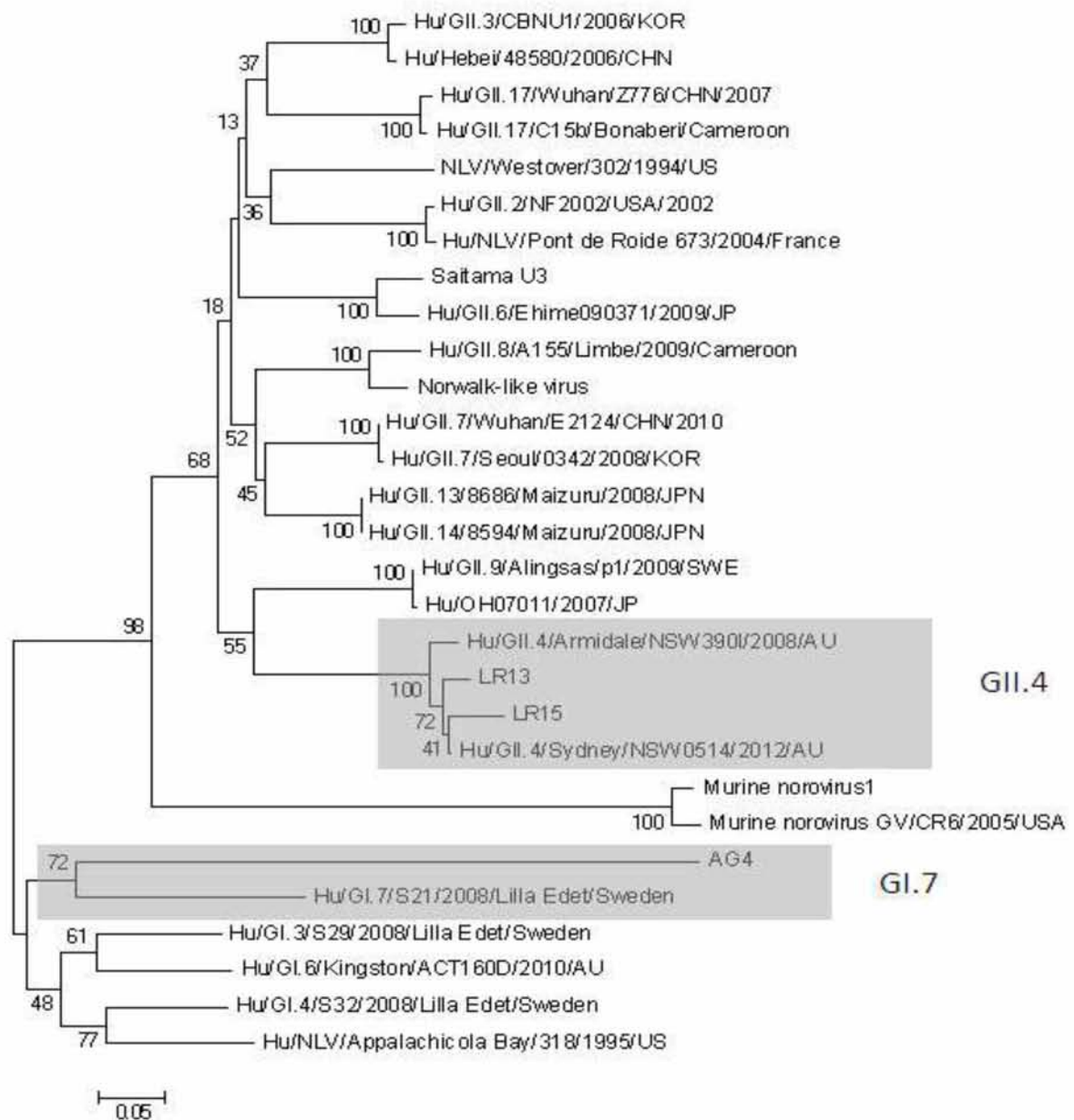
Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με χρήση των μερικών αλληλουχιών που άνηκαν στο γονίδιο ORF1, κατέταξε και τα τρία στελέχη AG4, LR13 και LR15, με αυτά που ανήκουν στην γενετική ομάδα δύο και στον γενότυπο εννιά, σχηματίζοντας έναν μονοφυλογενετικό κλάδο μεταξύ τους και με σαφή διαχωρισμό από τους υπόλοιπους γενότυπους της γενετικής ομάδας II των Νοροϊών, που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη ανάλυση, (εικ.29).



Εικ. 29. Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο με βάση τις μερικές αλληλουχίες του ORF1 γονιδίου (4523–5061bp). Γκρι πλαίσιο: τα στελέχη που ομαδοποιήθηκαν στον GII.9 γενότυπο.

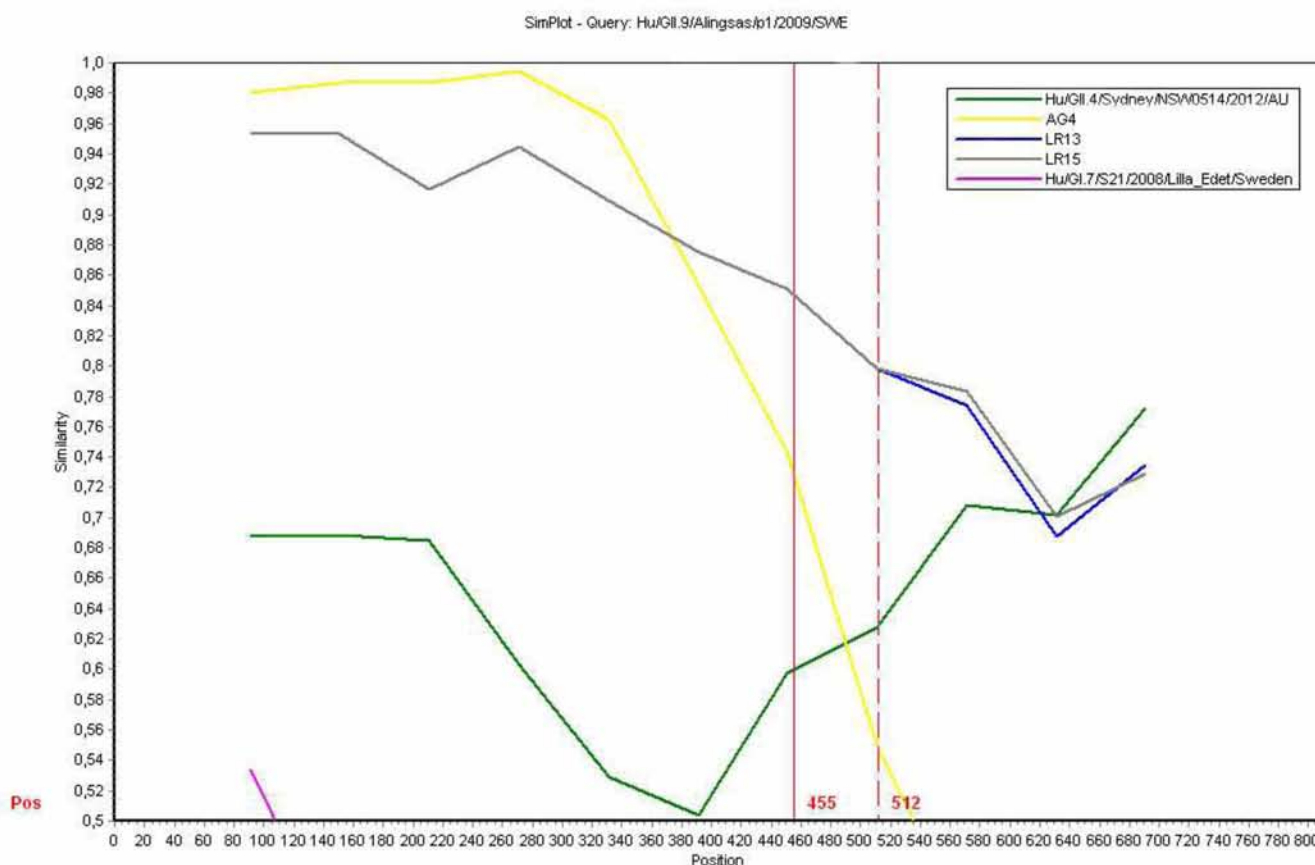
ORF2

Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε με χρήση των μερικών αλληλουχιών που άνηκαν στο γονίδιο ORF2, ομαδοποίησε τα δύο στελέχη, LR13 και LR15, με τα στελέχη που ανήκουν στον γενότυπο τέσσερα της γενετικής ομάδας II, ενώ το στέλεχος AG4 ομαδοποιήθηκε με την γενετική ομάδα I των νοροϊών, δημιουργώντας συγκεκριμένα φυλογενετικό κλάδο με ένα στέλεχος του γενότυπου 7, (εικ. 30).



Εικ. 30. Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο με βάση τις μερικές αλληλουχίες του ORF2 γονιδίου. GII.4: Τα στελέχη LR13 LR15 που ομαδοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη ομάδα. GI.7: Το στέλεχος AG4 ομαδοποιημένο με την GI γενετική ομάδα.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της φυλογενετικής ανάλυσης και για την ύπαρξη ανασυνδιασμού μεταξύ δύο διαφορετικών γενότυπων στην περίπτωση των δύο στελεχών (LR13 και LR15) και μεταξύ δύο διαφορετικών γενετικών ομάδων (AG4), εφαρμόστηκε το πρόγραμμα SimPlot για την επιβεβαίωση ύπαρξης των ανασυνδιασμών καθώς και τον καθορισμό της ακριβούς θέσης αυτών, (εικ.31). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε και στα τρία στελέχη ταυτόχρονα, με ένα στέλεχος από τον κάθε γενότυπο που ομαδοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση, (φυλογενετικά δέντρα ORF1 και ORF2). Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης φάνηκε ότι και τα τρία στελέχη είναι όντως ανασυνδιασμένα μεταξύ των δύο γονιδίων ORF1 και ORF2, τα LR13 και LR15 στην θέση 5039 μεταξύ των γενότυπων εννιά και τέσσερα της γενετικής ομάδας δύο και το στέλεχος AG4 στην θέση 4982 μεταξύ των γενετικών ομάδων ένα και δύο.



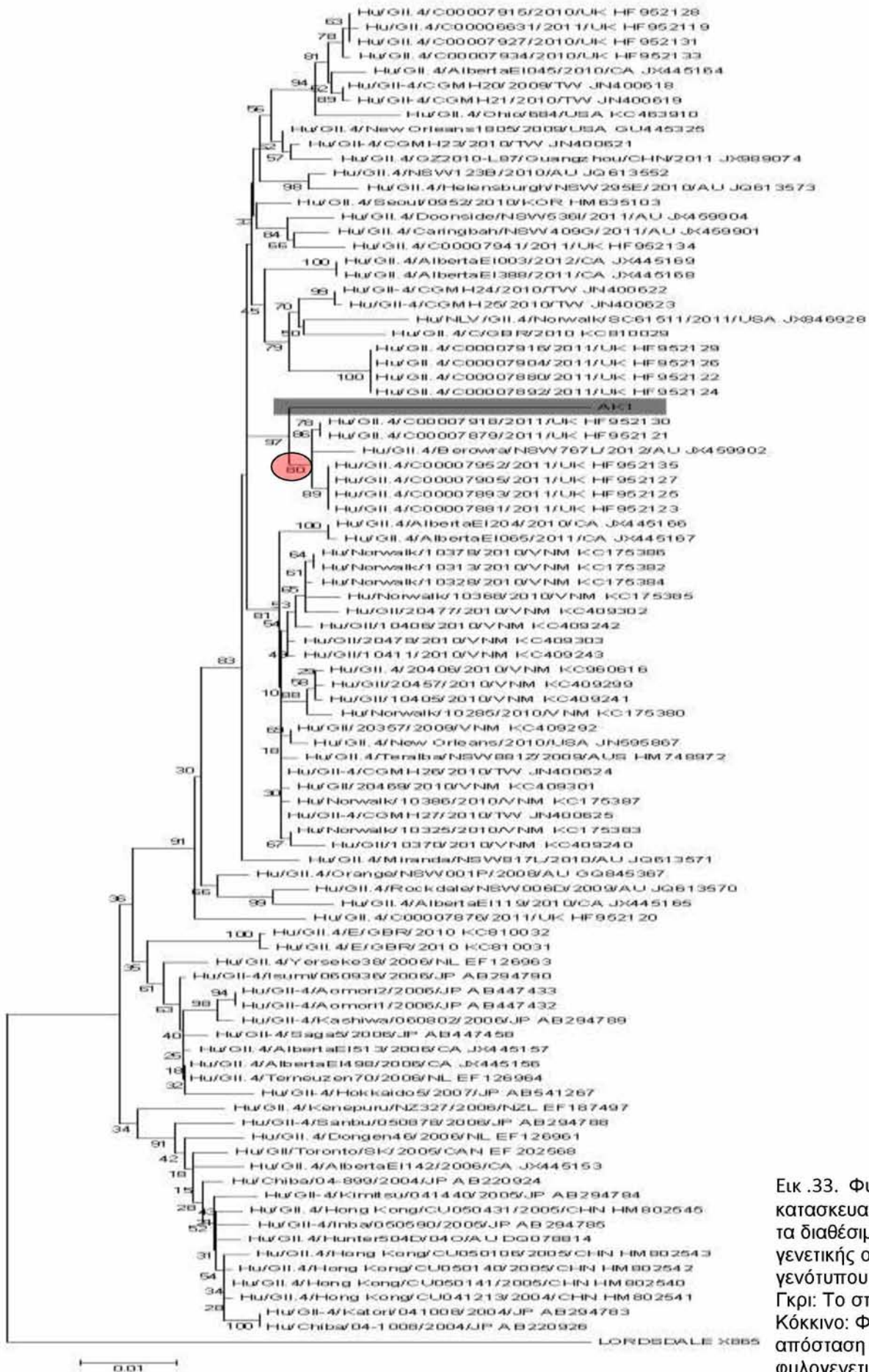
Εικ. 31. Ανάλυση SimPlot για τις μερικές ακολουθίες της RdRp και του καψιδίου των στελεχών LR13 LR15 και AG4. Η κάθετη κόκκινη γραμμή δείχνει το σημείο διασταύρωσης του στελέχους AG4 στη θέση 4982 μεταξύ των ORF1/ORF2 γονιδίων. Η διακεκομμένη κάθετη κόκκινη γραμμή δείχνει το σημείο διασταύρωσης των στελεχών LR13 LR15 στη θέση 5039 μεταξύ των ORF1/ORF2 γονιδίων. Το μέγεθος του παραθύρου ήταν 100 bp με μέγεθος βήματος 40 bp. Ο κατακόρυφος άξονας δείχνει την ομοιότητα μεταξύ των νουκλεοτιδίων (παραθύρο άνω δεξιά του σχήματος), εκφρασμένα ως ποσοστά. Ο οριζόντιος άξονας υποδεικνύει τις θέσεις των νουκλεοτιδίων της περιοχής του γονιδιώματος που αναλύθηκαν.

3.3.4 Εύρεση νέου κυκλοφορούντος στελέχους

Το στέλεχος AK1 ανιχνεύτηκε σε κλινικό δείγμα το οποίο συλλέχθηκε από ένα παιδί δύο ετών, θηλυκού γένους, το οποίο εισήχθη στο πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ιωαννίνων φέροντας όλα τα τυπικά κλινικά συμπτώματα προσβολής του ιού. Πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση ενός μεγάλου τμήματος του γενώματος του Νοροϊού με τους εκκινητές P290 – G2SKR (πίνακας 6, εικ. 32), το οποίο καλύπτει την θέση ανασυνδυασμού μεταξύ ORF1/ORF2 και ακολούθησε φυλογενετική επεξεργασία. Αρχικά, η αλληλουχία εξετάστηκε για την ύπαρξη ανασυνδιασμού, ενδεχόμενο το οποίο απορρίφθηκε, λόγω του ότι και τα δύο γονίδια (ORF1 και ORF2), ομαδοποιήθηκαν με τα ίδια στελέχη. Συγκεκριμένα, ομαδοποιήθηκαν με τα στελέχη της γενετικής ομάδας δύο, γενότυπου τέσσερα. Στην συνέχεια, εξετάστηκε ολόκληρη η αλληλουχία με όλα τα διαθέσιμα στελέχη της ομάδας, τα οποία λόγω υψηλού ρυθμού συσσώρευσης μεταλλάξεων μπορούν και διαχωρίζονται μεταξύ τους, αποτελώντας έτσι, καινούργιες παραλλαγές του ίδιου γενότυπου. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την επεξεργασία απέδειξαν πως το στέλεχος αυτό ανήκει στην GI.4 γενετική ομάδα των νοροϊών, αλλά διαχωρίζεται από όλα τα άλλα στελέχη δημιουργώντας έτσι, ένα μοναδικό φυλογενετικό κλάδο με μεγάλη φυλογενετική απόσταση, (εικ. 33). Γεγονός, που το κατατάσσει ως μια νέα παραλλαγή της γενετικής ομάδας δύο, γενότυπου τέσσερα.



Εικόνα 32. Με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται το σημείο πάνω στο γονιδίωμα που ενισχύθηκε. Τέλος του γονιδίου ORF1 και αρχής του γονιδίου ORF2 στο κλινικό δείγμα AK1 με τους εκκινητές P290 – G2SKR, (4295 – 5370bp).



Εικ .33. Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο με βάση όλα τα διαθέσιμα στελέχη της γενετικής ομάδας II, γενότυπου 4. Γκρι: Το στέλεχος AK1 Κόκκινο: Φυλογενετική απόσταση στελέχους στον φυλογενετικό κλάδο.

4. Συζήτηση

Οι Νοροϊοί, αποτελούν την πιο κοινή αιτία πρόκλησης οξείας μη βακτηριακής γαστρεντερίτιδας, με πολλά κρούσματα της νόσου παγκοσμίως (123). Το γονιδίωμα των Νοροϊών υφίσταται συνεχείς αλλαγές, μεταλλάξεις και ανασυνδυασμούς. Τα υψηλά ποσοστά των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων, λόγω των μικρών χρόνων αντιγραφής, καθώς και η αδυναμία διόρθωσης λαθών τα οποία εισάγονται από την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του ιού, συμβάλλουν ώστε οι Νοροϊοί να παράγουν μεταλλαγμένα γονιδιώματα, (124). Οι ανασυνδυασμοί στο RNA των Νοροϊών είναι γνωστό ότι εξαρτώνται από διάφορους ανοσολογικούς και ενδοκυτταρικούς περιορισμούς, οι οποίοι μπορούν να επιτρέψουν την ανάδειξη βιώσιμων ανασυνδυασμένων στελεχών (125). Από την πρώτη αναφορά του ιού (126) μέχρι και σήμερα, παγκοσμίως, οι αναφορές ανασυνδυασμένων στελεχών, είτε μεταξύ των γενετικών ομάδων όπως GI/GII, είτε διαφορετικών γενοτύπων όπως GII.1/GII.12, GII.b/GII.18, GII.b/GII.4, GII.b/GII.4, GII.d/GII.3, GII.3/GII.13, GII.7/GII.13, GII.b/GII.7, GII.4/GII.8, GII.5/GII.12, GI.3/GII.4, GII.1/GII.12, GII.4/GII.2 και GII.4/GII.3 ανάμεσα στην RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του ιού (RdRp) και στο γονίδιο του καψιδίου αντίστοιχα, είναι πολλές (113, 127-130).

Το πρώτο στέλεχος Νοροϊών, το οποίο χαρακτηρίστηκε κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής, προέρχονταν από το κλινικό δείγμα A6. Αρχικά, με βάση την φυλογενετική επεξεργασία της διαθέσιμης αλληλουχίας του, προσδιορίστηκε ότι άνηκε στην GII γενετική ομάδα. Στην συνέχεια, όταν τα δύο γονίδια διαχωρίστηκαν και πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση στη μερική αλληλουχία του ORF1 και στην πλήρη αλληλουχία του γονιδίου ORF2 αποκαλύφθηκε ότι τα δύο γονίδια (ORF1 και ORF2) ανήκαν σε δύο διαφορετικούς γενοτύπους, GII.9 και GII.6 αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, όταν πραγματοποιήθηκε SimPlot ανάλυση επιβεβαιώθηκε ότι το στέλεχος A6 ήταν πράγματι ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος, με την θέση ανασυνδυασμού να συνάδει με το «crossover» σημείο που αναφέρεται στην παγκόσμια βιβλιογραφία (131).

Η κυκλοφορία μιας ευρείας ποικιλίας διαφορετικών στελεχών Νοροϊών εντός ενός δεδομένου πληθυσμού αυξάνει τις πιθανότητες για την εμφάνιση

μικτών λοιμώξεων, οι οποίες εν συνεχεία μπορούν να οδηγήσουν σε γεγονότα ανασυνδυασμού (131). Η ανίχνευση του συγκεκριμένου ανασυνδυασμένου στελέχους, υποστηρίζει την υπόθεση ότι ορισμένα στελέχη των Νοροϊών, μπορούν να κυκλοφορούν σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές χωρίς κλινικές εκδηλώσεις στους πληθυσμούς και περιστασιακά να αλλάξουν τις γενετικές τους ιδιότητες διαμέσου γεγονότων ανασυνδυασμού. Ο ανασυνδυασμός επιτρέπει στον ιό να αλλάξει τη γενετική του δομή, να εξελιχθεί και να εξαπλωθεί σε ένα δεδομένο πληθυσμό παρακάμπτοντας την ανοσολογική πίεση του ξενιστή.

Σύμφωνα με τα στοιχεία του προγράμματος της Ευρωπαϊκής παρακολούθησης «των τροφιμογενών λοιμώξεων στην Ευρώπη», μια ομάδα φυσικά ανασυνδυασμένων Νοροϊκών στελεχών, εμφανίστηκε στην Ευρώπη και προκάλεσε διηπειρωτικές λοιμώξεις, οι οποίες μεταδόθηκαν μέσω του πόσιμου νερού και των τροφών, (132). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος (GII.b) που εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 2000 στη Γαλλία, έγινε κυρίαρχο, προκαλώντας σποραδικά κρούσματα στην Ισπανία, τη Σουηδία και την Ουγγαρία, (133). Η εμφάνιση νέων αντιγονικών παραλλαγών στους Νοροϊούς είναι κατά συνέπεια ανάλογη με εκείνη των ιών της γρίπης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ανοσία που εμφανίζει ένας δεδομένος πληθυσμός εμμέσως μπορεί να προάγει την εξέλιξη των ιών (134).

Με βάση τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια εντοπισμού και παρακολούθησης της κυκλοφορίας του συγκεκριμένου ανασυνδυασμένου στελέχους (A6), από τον Οκτώβριο του 2006 έως και τον Δεκέμβριο του 2011. Συλλέχθηκαν παράλληλα περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα από την ίδια γεωγραφική περιοχή, της Κ. Ελλάδας κατά την ανωτέρω χρονική περίοδο και εξετάστηκαν ως προς την ύπαρξη του συγκεκριμένου ανασυνδυασμού (GII.9/GII.6). Η ύπαρξη του ανασυνδυασμένου στελέχους εντοπίστηκε στο 80% των εξετασθέντων κλινικών δειγμάτων και στο 93,3% των περιβαλλοντικών δειγμάτων, αποδεικνύοντας ότι, η εμφάνιση, η περαιτέρω εξάπλωση και η λοιμογόνος δύναμη ενός συγκεκριμένου ανασυνδυασμένου στελέχους σε έναν δεδομένο πληθυσμό, δεν παρεμποδίζεται από τον τύπο ανασυνδυασμού αλλά αντιθέτως ευνοείται από αυτόν, (135-137). Ακολούθως δέκα κλινικά δείγματα, τα οποία συλλέχθηκαν τον Δεκέμβριο του 2012 από το πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ιωαννίνων ελέγχθηκαν για τον εντοπισμό θέσεων

ανασυνδυασμού και εντοπίστηκαν τρία ακόμη στελέχη τα οποία έφεραν καινούργιους ανασυνδυασμούς μεταξύ των δύο γονιδίων ORF1/ORF2 και αναφέρονται για πρώτη φορά στην διεθνή βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, δύο στελέχη που εντοπίστηκαν στα δείγματα LR13 και LR15 είχαν τον ανασυνδυασμό GII.9/GII.4 και ένα που εντοπίστηκε στο δείγμα AG4 τον ανασυνδυασμό GII.9/GI.7.

Τέλος, εντοπίστηκε και ένα στέλεχος στο δείγμα AK1, το οποίο άνηκε στην γενετική ομάδα II και στο γενότυπο 4, αλλά μετά από φυλογενετική επεξεργασία αποδείχθηκε ότι πρόκειται για μία καινούργια παραλλαγή του γενότυπου GII.4.

Υπάρχουν δύο αναγνωρισμένοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα των Νοροϊκών λοιμώξεων: οι γενετικοί παράγοντες και η επίκτητη ανοσία. Ο πιθανός ρόλος της ανθεκτικότητας αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά όταν πειραματικές μελέτες με το στέλεχος Norwalk, έδειξαν ότι οι συμμετέχοντες εμφάνιζαν επανειλημμένα ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στη συμπτωματική λοίμωξη μετά από επαναλαμβανόμενη έκθεση στον ιό (82). Στη συνέχεια, με χρήση των VLPs, από το ίδιο στέλεχος, φάνηκε ότι συνδέονται με διαφορετικούς υποδοχείς HBGA, αποδεικνύοντας έτσι ότι το δεσμευτικό μοτίβο συσχετίζεται με την ευαισθησία στη μόλυνση και την εκδήλωση ασθένειας (75, 79). Έτσι, είναι πιθανό κάθε άτομο να είναι γενετικά ευπαθές σε έναν ή περισσότερους νοροϊκούς γενότυπους.

Καθώς το σύστημα των ομάδων αίματος ABO συναντιέται στο 80% του Ευρωπαϊκού και Βόρειο Αμερικάνικου πληθυσμού, στελέχη Νοροϊών τα οποία αναγνωρίζουν αυτές τις πλέον συνήθεις ομάδες αίματος θα πρέπει να υπερισχύουν έναντι άλλων στελεχών τα οποία αναγνωρίζουν πιο σπάνιες ομάδες αίματος (138). Σύμφωνα λοιπόν με αυτή την υπόθεση τα στελέχη Νοροϊών που συνδέονται με την ομάδα αίματος A/B συνδέονται με την ομάδα A ή και B αλλά όχι με την ομάδα O και κατά συνέπεια στοχεύουν σε μικρότερο εύρος ξενιστών δεδομένου ότι η ομάδα O είναι η περισσότερο κοινή ομάδα σε σύνολο πληθυσμού. Σημαντικό ρόλο στη σύνδεση παίζει η ύπαρξη του αντιγόνου H, το οποίο κατέχει λίγες αντιγονικές θέσεις στις ομάδες αίματος A, B αλλά την πλειοψηφία στην ομάδα O με αποτέλεσμα να προσδίδει πλεονέκτημα στα στελέχη των Νοροϊών που συνδέονται με αυτό (138).

Έτσι, στελέχη τα οποία προσδένονται στην ομάδα αίματος A/B πρέπει να συναντιούνται πιο σπάνια σε σχέση με τα στελέχη τα οποία προσδένονται στην ομάδα αίματος O όπως τα στελέχη που ανήκουν στο GII.4 γενότυπο. Πράγματι η σύσταση των αμινοξέων τα οποία αλληλεπιδρούν με το σύστημα HBGA έχει σχεδόν διατηρηθεί στο 100% μεταξύ όλων των γνωστών παραλλαγών GII.4 που έχουν εντοπισθεί την τελευταία δεκαετία (139), γεγονός το οποίο δηλώνει ότι ο γενότυπος GII.4 ίσως είναι ο μόνος γενότυπος με τον βέλτιστο φαινότυπο επιβίωσης (140). Έτσι λοιπόν τα στελέχη GII.4 τα οποία μπορούν να προσδένονται στις ομάδες αίματος A/B/O αναμένεται να είναι τα επικρατούντα στελέχη και των επόμενων επιδημιών. Τα γεγονότα αυτά οδήγησαν στην αντίληψη της συγκλίνουσας εξέλιξης των Νοροϊών και των HBGAs. Όμως για την πληρέστερη κατανόηση των έλξεων μεταξύ Νοροϊών και ξενιστών περισσότερη έρευνα απαιτείται κυρίως μεταξύ των ανασυνδυασμένων στελεχών στη γενωμική περιοχή ORF1/ORF2 σε συνδυασμό με τον χαρακτηρισμό ενδεχομένως και άλλων υποδοχέων και συν-υποδοχέων οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την ευαισθησία των ξενιστών. Επιπλέον η ανοσολογική απάντηση των ξενιστών ενδέχεται να εμπλέκεται στην εξέλιξη και την επιδημιολογία των Νοροϊών.

Τα αμινοξέα τα οποία εμπλέκονται στη σύνδεση με τους HBGAs μέσα στην ίδια γενετική ομάδα είναι ιδιαίτερα συντηρημένα στην υπερμεταβλητή P2 γενωμική υπό περιοχή, (141). Ανάλυση των μεταλλάξεων σε βάθος χρόνου της P2 γενωμικής υπό περιοχής των GII.4 παραλλαγών οι οποίες κυκλοφόρησαν μεταξύ των ετών 1974 και 2006 έδειξαν ότι τα εμπλεκόμενα αμινοξέα των στελεχών GII.4 στην σύνδεση με την φουκόζη ήταν αξιοσημείωτα συντηρημένα ανεξάρτητα των παραλλαγών GII.4 (85, 142).

Αυτές οι έλξεις ακολουθούν την αρχή κλειδαριά-κλειδί. Ένα δομικό στοιχείο προσαρμόζεται στο χώρο (κλειδαριά) και προσδένει στοιχεία των HBGA (κλειδί). Αυτά τα στοιχεία αποτελούν την βάση της συγκλίνουσας εξέλιξης των Νοροϊών εξηγώντας ότι οι διάφορες ομάδες των Νοροϊών είναι αποτέλεσμα επιλογής της πολυμορφικότητας των HBGAs στον ξενιστή.

Η αλληλουχία των γονιδιωμάτων των Νοροϊών, οι διαφορές στη δομή των καψιδίων και κατά συνέπεια στη δομή των αμινοξέων και στους διαφορετικούς τρόπους σύνδεσης των HBGA μεταξύ των γενετικών ομάδων GI και GII συνηγορούν ότι ήταν δυο διαφορετικά είδη τα οποία εξελισσόμενα

συνδέθηκαν με το σύστημα HBGA και αυτό μπορεί να συνέβη είτε πριν ή μόλις έγιναν παθογόνα του ανθρώπου. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι οι δύο ομάδες, GI και GII, σε επίπεδο φυλογένεσης διαχωρίζονται από την ομάδα των βοοειδών (GIII) και των τρωκτικών (GV), (32, 143). Ως εκ τούτου πιθανολογείται ότι οι δύο γενετικές ομάδες συνέκλιναν μετά την σύνδεση τους με τους HBGAs τους οποίους χρησιμοποίησαν ως κοινούς παράγοντες σύνδεσης και πρόκλησης λοιμώξεων στον άνθρωπο, με αποτέλεσμα οι δύο γενετικές ομάδες να αναπτύξουν δύο διαφοροποιούμενες θέσεις σύνδεσης στο σύστημα HBGAs του ανθρώπου.

Πρόσφατα δεδομένα δηλώνουν ότι οι υδαάνθρακες ως υποδοχείς ή ως παράγοντες δέσμευσης είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των calici ιών καθώς έχουν εντοπισθεί στα μέλη τους όπως στους : Lago ιούς, Reco ιούς, Vesi ιούς και Νοροϊούς (139, 144-149). Η αναγνώριση πλέον των υδατανθράκων ως υποδοχέων οι οποίοι μπορούν να προάγουν συγκλίνουσα εξέλιξη εισάγει νέα δεδομένα στη κατανόηση της εξέλιξης των παθογόνων του ανθρώπου τα οποία χρησιμοποιούν αυτού του τύπου τους υποδοχείς. Κατά συνέπεια η ανάλυση της συγγένειας των έλξεων των νεοεμφανιζόμενων στελεχών Νοροϊών με το σύστημα HBGAs μπορεί στο μέλλον να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη επιδημιών και ενδεχομένως μέτρων για την πρόληψη αυτών των επιδημιών.

Τα τελευταία χρόνια ο GII.4 γενότυπος είναι ο πιο διαδεδομένος και ένας μεγάλος αριθμός των κρουσμάτων ιογενούς γαστρεντερίτιδας σχετίζεται με την εμφάνιση των νέων GII.4 παραλλαγών του. Η πρώτη πανδημία οφειλόμενη στον GII.4 γενότυπο αναγνωρίστηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1990, (100). Κατά τη διάρκεια του 1996, το στέλεχος US95/96 ήταν υπεύθυνο για το 85% των κρουσμάτων στις Κάτω Χώρες και περίπου για το 60% των κρουσμάτων στις Ηνωμένες Πολιτείες (150). Μεταξύ του 2000 και του 2004, το στέλεχος αυτό αντικαταστάθηκε από δύο νέες GII.4 παραλλαγές. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, με το στέλεχος Farmington Hills (151), το οποίο συνδέθηκε με περίπου το 80% των περιπτώσεων οξείας γαστρεντερίτιδας, και την ίδια στιγμή στην Ευρώπη (152), το στέλεχος GII.4b, εμφανίστηκε και προκάλεσε επιδημίες. Το 2004, η παραλλαγή Hunter GII.4 εντοπίστηκε στην Αυστραλία, την Ευρώπη και την Ασία (107). Το στέλεχος αυτό αντικαταστάθηκε στις αρχές του 2006 με δύο νέες παραλλαγές GII.4, στις

Ηνωμένες Πολιτείες, την Ευρώπη και την Ασία και από το 2006 και μετά, έγινε το κυρίαρχο εμφανιζόμενοστέλεχος σε πολλές χώρες όπως η Κίνα, η Ινδία, η Ιαπωνία, η Κορέα, το Βιετνάμ, η Αίγυπτος, η Τουρκία και η Ιταλία (153). Ένα από αυτά τα δύο στελέχη ήταν το στέλεχος Sakai, το οποίο αντιπροσωπεύει μία καινούργια παραλλαγή του γενότυπου GII.4 που σχετίστηκε με κρούσματα σε εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης στη Νοτιοανατολική Ασία, (95), ενώ το δεύτερο στέλεχος ήταν το στέλεχος Minerva, το οποίο είχε προσδιοριστεί στις Ηνωμένες Πολιτείες και στις Κάτω Χώρες, (110). Ωστόσο, σε πολλές χώρες, μεταξύ των ετών 2006 – 2008, εντοπίστηκαν και κυριάρχησαν και άλλες παραλλαγές του γενότυπου GII.4. Για παράδειγμα στην Αίγυπτο κατά την περίοδο 2006-2007, η παραλλαγή GII.4/2006a ανιχνεύθηκε πιο συχνά, ενώ στην Ινδία, κατά τη διάρκεια του 2006 – 2007 και στη Νότια Αφρική το 2008, η παραλλαγή GII.4/2007 και GII.4/2008 ήταν αντίστοιχα κυρίαρχες (112-114).

Όλα τα παραπάνω ευρήματα επικύρωσαν την προαναφερθείσα έννοια της συγκλίνουσας εξέλιξης των Νοροϊών μέσω επιλογής σύνδεσης με τους υποδοχείς HBGA, αλλά αυτή η έννοια εξηγεί μόνο εν μέρει τις διάφορες σημαντικές πτυχές της επιδημιολογίας, της ταξινόμησης καθώς και τον έλεγχο της νόσου.

Η ανάπτυξη εμβολίων έναντι των Νοροϊών είναι σε πλήρη εξέλιξη αν και το μέγιστο πρόβλημα είναι η γενετική ποικιλομορφία των Νοροϊών. Η επικρατούσα άποψη της ανοσίας σε επίπεδο πληθυσμού ωθεί προς την ανάπτυξη εμβολίων κυρίως έναντι του επικρατέστερου γενότυπου, όπως του GII.4, ο οποίος συγκεντρώνει τις περισσότερες πιθανότητες να προκαλέσει τις επόμενες επιδημίες όσο η ανοσία σε επίπεδο πληθυσμού θα παραμένει χαμηλή. Για την επιτυχή έκβαση ενός σχεδίου εμβολιασμών θα πρέπει να συμπεριληφθούν όχι μόνο οι ομάδες πληθυσμού οι οποίες μπορούν να συμβάλουν στην εξάπλωση της λοίμωξης όπως, εργαζόμενοι σε νοσηλευτικά ιδρύματα, παιδικούς σταθμούς και στην αλυσίδα παραγωγής – παρασκευής τροφίμων, αλλά και στις ευπαθείς ομάδες όπως άτομα νεαρής ηλικίας, ηλικιωμένα και ανοσοκατασταλμένα άτομα. Παράλληλα οι έρευνες θα πρέπει να ενταθούν για την ανάπτυξη συνθετικών ανταγωνιστών ικανών να παρεμβάλλονται αποφασιστικά μεταξύ των έλξεων ιϊκού καψιδίου και υδατανθράκων του επιθηλίου του εντερικού συστήματος των ξενιστών.

Τέλος, δεδομένης της σημασίας των Νοροϊών ως αιτία επιδημίας ιογενούς γαστρεντερίτιδας, επιβάλλεται η περιβαλλοντική παρακολούθηση της κυκλοφορίας των Νοροϊών ως ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο επιδημιολογικής επαγρύπνησης και ενδεχομένως πρόβλεψης Νοροϊικών εξάρσεων. Ο έλεγχος του περιβάλλοντος έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε πολλές περιπτώσεις για τον προσδιορισμό της κυκλοφορίας ιικών στελεχών ως προγνωστικό εργαλείο, μιας και στελέχη νοροϊών αλλά και άλλων ιών όπως εντεροϊών, έχουν ανιχνευτεί σε περιβαλλοντικά δείγματα πολύ πριν την απομόνωση τους από κλινικά περιστατικά, (116).

Σήμερα η ιογενής γαστρεντερίτιδα είναι σε γενικές γραμμές καλά τεκμηριωμένη στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, σε αντίθεση με την Ελλάδα, όπου τα επιδημιολογικά στοιχεία που αφορούν την ιογενή γαστρεντερίτιδα Νοροϊικής προέλευσης εξακολουθούν να είναι ελλιπή. Η μελέτη σε μοριακό επίπεδο των κυκλοφορούντων Νοροϊικών στελεχών θα μπορούσε να παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη, την παθογένεια και την εξάπλωση των ιών αυτών σε ένα δεδομένο πληθυσμό.

Abstract

Noroviruses (NoVs) are a major causative agent of acute gastroenteritis in humans. Noroviruses are members of the *Caliciviridae* family and based on the genetic analysis of the RdRp and capsid regions, human NoVs are divided into three genogroups (Gs), GI, GII, and GIV, which further segregate into distinct lineages called genotypes. The NoV genus is genetically diverse and recombination of viral RNA is known to depend upon various immunological and intracellular constraints that may allow the emergence of viable recombinants.

Noroviruses (NoVs) are a major cause of epidemic acute gastroenteritis affecting 96% of people worldwide. Viral gastroenteritis is now well documented in most of the industrialized countries, in contrast to Greece where epidemiological data concerning NoVs are still lacking.

For this purpose, in the present PhD thesis, the detection and molecular characterisation of circulating recombinant Noroviruses was performed, in order to create important information on the evolution, pathogenesis and spread of these viruses in the population of central Greece. Sewage samples and fecal specimens were collected from central Greece and molecular techniques, that documented the genetic relationships between the circulating recombinant and non recombinant strains were assessed.

The first Noroviral strain which was characterized during the present study was isolated from the clinical sample A6. The detection was carried out initially by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the subsequent detection and molecular characterization of NoV strain was achieved by reverse transcription-PCR and sequencing. RT-PCR assay for GII NoVs that targets conserved regions of the genome, allowed the characterization of A6 strain at the molecular level, established its genetic relationship at the sub-genogroup level and classified A6 strain at the sub-genotype level by performing phylogenetic analyses with other GII NoVs that have previously been grouped into genotypes. Based on the sequence analysis, A6 strain was revealed to belong to the GII genogroup of NoVs. Partial ORF1 gene sequencing analysis and complete ORF2 gene sequencing revealed that ORF1 and ORF2 belonged to two distinct genotypes GII/9 and GII/6, respectively, making

obvious that A6 strain was a rare intergenotypic recombinant within the genogroup GII between GII.9 and GII.6 genotypes.

Subsequently, in an attempt to discern the circulation of the above intergenotypic recombinant GII.9/GII.6, we investigated NoVs from samples collected from raw sewages between the years 2006 to 2011 and compared the results with Noroviruses detected from clinical samples in the same area and in the same time period. Two specific primer pairs for NoVs were designed which amplified in a single PCR fragment from polymerase to capsid gene covering the widespread recombination point in ORF1/ORF2 junction. Based on the genetic analysis, recombinant NoV strains GII.9/GII.6 were identified. Fourteen out of 15 environmental and eight out of ten clinical samples that were used in the present study were positive, with both primer pairs, confirming that the intergenotypic recombinant GII.9/GII.6 was circulating in the population of central Greece from 2006 to 2011. The crossover point was identified to be within the overlapping region of ORF1/ORF2 (GII.9/GII.6, respectively) and was determined by Simplot at nucleotide position 5,032 bp.

Finally, three more Noroviral strains were detected in clinical samples collected in the University Hospital of Ioannina, Greece that revealed a hitherto unobserved recombination event between GII.9/GII.4 and GII.9/GI.7 genogroups. Moreover a novel strain was also detected in clinical sample AK1 belonging to GII.4 genocluster. Phylogenetic analysis classified AK1 strain as GII.4 genotype, but forming clearly a new cluster at the nucleotide level, according to BLAST clustering.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mead PS, Slutsker L, Griffin PM, Tauxe RV. Food - related illness and death in the United States. Reply to Dr. Hedberg. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 841–842.
2. Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am* 2006; 35: 275–290, viii.
3. Rockx B, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35:246–253.
4. Lopman B, Zambon M, Brown DW. The evolution of norovirus, the “gastric flu”. *PLoS Med* 2008; 5: e42.
5. Zahorsky J. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease . *Arch Pediatr* 1929;46:391-5.
6. Hodges R.G., McCorkle L.P., Badger G.F., Curtiss C., Dingle J.H., Jordan W.S. A study of illness in a group of cleveland families: XI. The occurrence of gastrointestinal symptoms. *Am J Hyg* 1956; 64: 349-56.
7. Gordon I., Ingraham H.S., Korns R.F. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J Exp Med* 1947;86:409-422.
8. Kojima S., Fukumi H., Kusama H., et al. Studies on the causative agent of the infectious diarrhea: records of the experiments on human volunteers. *Jpn Med J* 1948; 1: 467-476.
9. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10: 1075–1081.
10. Adler J.L. and R. Zickl. Winter vomiting disease. *J. Infect Dis.* 1969; 119: 668-673.
11. Dolin R., Blacklow N.R., DuPont H., et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1972; 140: 578-583.
12. Almeida J.D., Waterson A.P. The morphology of virus-antibody interaction. *Adv Virus Res* 1969; 15: 307-338.

13. Thornhill T.S., Wyatt R.G., Kalica A.R., et al. Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm virus-like particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 1977; 135: 20-27.
14. Dolin R., Reichman R.C., Roessner K.D., et al. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 1982; 146: 184-189.
15. Caul E.O. and Appleton H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol* 1982;9:257-65.
16. Jiang X., Wang M., Wang K., et al. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993; 195: 51-61.
17. Lambden P.R., Caul O., Ashley C., et al. Sequence and genome organization of a human small round structured (Norwalk-like) virus. *Science* 1993;259:516-519.
18. Liu B.L., Lambden P.R., Gunther H., et al. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 1999;73 :819-825.
19. Karst S.M., Wobus C.E., Lay M., et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 2003; 299:1575-1578.
20. Parashar UD, Monroe SS (2001). "Norwalk-like viruses" as a cause of foodborne disease outbreaks". *Rev. Med. Virol.*11 (4): 243-52. doi:10.1002/rmv.321. PMID 11479930.
21. Green K.Y., Ando T., Balayan M.S., et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 2000;181:S322-330.
22. Matthews R.E. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 1979;12:129–296.
23. Green, K.Y. et al. (2001) Human caliciviruses. In *Fields Virology* (Vol. 1) (Knipe, D.M. et al., eds), pp. 841–874, Lippincott, Williams & Wilkins
24. Vinje, J. et al. (2000) Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Arch. Virol.* 145, 223–241.
25. Oliver, S.L. et al. (2003) Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J. Virol.* 77, 2789–2798

26. Deng, Y. et al. (2003) Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2300–2305
27. Smiley, J.R. et al. (2003) Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3089–3099
28. Sugieda, M. and Nakajima, S. (2002) Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus “Norwalk-like viruses”. *Virus Res.* 87, 165–172
29. Karst, S.M. et al. (2003) STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 299, 1575–1578.
30. Fankhauser, R.L. et al. (2002) Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like Viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* 186, 1–7.
31. Mesquita J.R et al. Presence of antibodies against genogroup VI norovirus in humans. *Viol J* 2013; 10:1186/1743-422X-10-176.
32. Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312-323.
33. Hale, A. et al. (2000) Distinct epidemiological patterns of Norwalk-like virus infection. *J. Med. Virol.* 62, 99–103
34. Jiang, X. et al. (1990) Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250, 1580–1583
35. Prasad, B.V. et al. (1999) X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286, 287–290
36. Glass, P.J. et al. (2000) The Norwalk virus ORF 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* 74, 6581–6591
37. Bertolotti - Ciarlet, A. et al. (2002) Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J. Virol.* 76, 4044–4055.
38. Caul EO. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* 1994;343:1240–1242.
39. 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.

40. 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 Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
41. Wobus C.E., Karst S.M., Thackray L.B., et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology* 2004; 2:e432.
42. Jiang X, Graham D, Wang K, Estes M. NV genome cloning and characterization. *Science* 1990; 250:1580–1583.
43. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. NV genome cloning and characterization. *Science* 1990;250:1580–1583.
44. Baric RS, et al. Expression and self-assembly of NV capsid protein from Venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J Virol* 2002;76:3023–3030.
45. Green KY, Lew JF, Jiang X, Kapikian AZ, Estes MK. 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* 1993;31:2185–2191.
46. Jiang X, Wang M, Graham D, Estes M. Expression, self-assembly and antigenicity of the NV capsid protein. *J Virol* 1992;66:6527–6532.
47. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the NV capsid. *Science* 1999;286:287–290.
48. Prasad BV, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed NV capsids. *J Virol* 1994;68: 5117–5125.
49. Venkataram Prasad BV, Hardy ME, Estes MK. Structural studies of recombinant Norwalk capsids. *J Infect Dis* 2000;181 (Suppl.):S317–S321.
50. Tan M, Huang P, Meller J, ZhongW, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histoblood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol* 2003;77:12562–12571.
51. Cao S, et al. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 2007;81:5947–5957.
52. Seah EL, Marshall JA, Wright PJ. Trans activity of the norovirus Camberwell proteinase and cleavage of the N-terminal protein encoded by ORF1. *J Virol* 2003;77:7150–7155.

53. Ettayebi K, Hardy ME. 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* 2003;77:11790–11797.
54. Fernandez-Vega V, et al. NV N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol* 2004;78:4827–4837.
55. Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME. The genome-linked protein VPg of the NV binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* 2003;22:2852–2859.
56. Daughenbaugh KF, Wobus CE, Hardy ME. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virology* 2006;343:33–41.
57. Rohayem J, Robel I, Jager K, Scheffler U, Rudolph W. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J Virol* 2006;80:7060–7069.
58. Rohayem J, Jager K, Robel I, Scheffler U, Temme A, Rudolph W. Characterization of norovirus 3Dpol RNA-dependent RNA polymerase activity and initiation of RNA synthesis. *J Gen Virol* 2006;87:2621–2630.
59. Blakeney SJ, Cahill A, Reilly PA. Processing of NV nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology* 2003;308:216–224.
60. Liu B, Clarke IN, Lambden PR. Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol* 1996;70:2605–2610.
61. Liu BL, Lambden PR, Gunther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 1999;73:819–825.
62. Seah EL, Marshall JA, Wright PJ. Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberwell: completion of sequence and expression in mammalian cells. *J Virol* 1999;73:10531–10535.
63. Sosnovtsev SV, et al. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* 2006;80:7816–7831.
64. Zeitler CE, Estes MK, Venkataram Prasad BV. X-ray crystallographic structure of the NV protease at 1.5-Å resolution. *J Virol* 2006;80:5050–5058.

65. Fukushi S, et al. Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of Norovirus. *J Virol* 2004;78:3889–3896.
66. Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm NV: an historic perspective. *J Infect Dis* 2000;181 (Suppl):S295–S302.
67. Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK. Replication and packaging of NV RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:10327–10332.
68. Neill J.D. The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res* 2002;87:89–93.
69. Marionneau S., Ruvoen N., Le Moullac-Vaidye B., et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 2002;122:1967–1977.
70. Harrington PR, Yount B, Johnston RE, Davis N, Moe C, Baric RS. Systemic, mucosal, and heterotypic immune induction in mice inoculated with Venezuelan equine encephalitis replicons expressing NV-like particles. *J Virol* 2002;76:730–742.
71. Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, Moe CL, Baric RS. Binding of NV-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J Virol* 2002;76:12335–12343.
72. Harrington PR, Vinje J, Moe CL, Baric RS. Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. *J Virol* 2004;78:3035–3045.
73. Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes MK. Department of molecular V, microbiology BCoMHTUSA. NV-like particle hemagglutination by binding to histo-blood group antigens. *J Virol* 2003;77:405–415.
74. Marionneau S, et al. NV binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 2002;122:1967–1977.
75. Lindesmith L, et al. Human susceptibility and resistance to NV infection. *Nat Med* 2003;9:548–553.

76. Marionneau S, et al. ABH and Lewis histoblood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 2001;83:565–573.
77. Le Pendu J, Ruvoen-Clouet N, Kindberg E, Svensson L. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin Immunol* 2006;18:375–386).
78. Hennessy EP, Green AD, Connor MP, Darby R, MacDonald P. NV infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 2003;188:176–177
79. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. NV infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 2002;185:1335–1337.
80. Rockx BH, Vennema H, Hoebe CJ, Duizer E, Koopmans MP. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis* 2005;191: 749–754.
81. Koopman JS, Eckert EA, Greenberg HB, Strohm BC, Isaacson RE, Monto AS. NV enteric illness acquired by swimming exposure. *Am J Epidemiol* 1982;115:173–177.
82. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 1977;297:86–89.
83. Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis* 1990;161: 18–21.
84. Larsson MM, et al. Antibody prevalence and titer to Norovirus (Genogroup II) correlate with secretor (FUT2) but Not with ABO phenotype or Lewis (FUT3) genotype. *J Infect Dis* 2006;194:1422–1427.
85. Lindesmith LC, et al. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 2008;5:e31.
86. Koelle K, Cobey S, Grenfell B, Pascual M. Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpandemic influenza A (H3N2) in humans. *Science* 2006;314:1898–1903.
87. Van Nimwegen E. *Epidemiology*. Influenza escapes immunity along neutral networks. *Science* 2006;314:1884–1886.

88. Siebenga JJ, et al. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 2007;81:9932–9941.
89. Nilsson M, et al. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol* 2003;77:13117–13124.
90. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan;17(1):7-15.
91. Kaplan JE, Schonberger LB, Varano G, Jackman N, Bied J, Gary GW. An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home. Demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol* 1982;116:940–948.
92. Ike AC, Brockmann SO, Hartelt K, Marschang RE, Contzen M, Oehme RM. Molecular epidemiology of norovirus in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany from 2001 to 2004. *J Clin Microbiol* 2006;44:1262–1267.
93. Jiang X, et al. Outbreaks of gastroenteritis in elderly nursing homes and retirement facilities associated with human caliciviruses. *J Med Virol* 1996;50:335–341.
94. Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, Matsuzaki Y. Prolonged norovirus shedding in infants over 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:46–49.
95. Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 2006;151:1635–1641.
96. Mattner F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, Koopmans M. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:69–74.
97. Parashar UD, Monroe SS “Norwalk -like viruses” as a cause of foodborne disease outbreaks. *Rev Med Virol* 2001;11:243–252.
98. Fankhauser RL, et al. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002;186: 1–7.

99. Waters A, Coughlan S, Dunford L, Hall WW. Molecular epidemiology of norovirus strains circulating in Ireland from 2003 to 2004. *Epidemiol Infect* 2006;134: 917–925.
100. Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. Identification of a distinct common strain of “Norwalk-like viruses” having a global distribution. *J Infect Dis* 1999;179: 1334–1344.
101. Vinje J, Altena SA, Koopmans MP. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* 1997;176:1374–1378.
102. Widdowson MA, et al. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus – United States, 2002. *J Infect Dis* 2004;190:27–36.
103. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection* 2003;9: 247-262.
104. Phan TG, et al. Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004–2005. *Clin Lab* 2006;52:519–525.
105. Norovirus activity–United States, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52: 41–45.
106. Vainio K, Myrmet M. Molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Norway during 2000 to 2005 and comparison of four norovirus real-time reverse transcriptase PCR assays. *J Clin Microbiol* 2006;44: 3695–3702.
107. Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2006;44:327–333.
108. Kroneman A, et al. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill* 2006;11:E0612141.
109. Norovirus activity–United States, 2006–2007. *Morb Mortal Wkly Rep* 2007;56:842–846.
110. Siebenga JJ, et al. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 2007;81:9932–9941.
111. CDC. *Morb Mortal Wkly Rep* 2007;56:842–846.
112. A.H. Kamel, M.A. Ali, H.G. El-Nady, A. de Rougemont, P. Pothier, G. Belliot. *J. Clin. Microbiol.* 47(4):1037-45 (2009).

113. M.K. Nayak, D. Chatterjee, S.M. Natareju, M. Pativada, U. Mitra, M.K. Chatterjee, et al. *J. Clin. Virol.* 45(3):223-9 (2009).
114. J. Mans, J.C. de Villiers, N.M. du Plessis, T. Avenant, M.B. Taylor. *J. Clin. Virol.* 49(4):258-64 (2010).
115. Crane J.K., Guerrant R.L. *Acute Watery Diarrhea*. New York: Raven Press; 1995.
116. Barker J., Vipond I.B., Bloomfield S.F. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect* 2004;58:42-122. Outbreaks of Norwalk-like viral gastroenteritis - Alaska and Wisconsin, 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2000;49:207-211.
117. Estes M.K., Ball J.M., Guerrero R.A.. Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis* 2000;181:S367-373.
118. Treanor JJ, Dolin R. Norwalk Virus and Other Caliciviruses. In: Mandell GL, Bennett JE, 5th Edition ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Vol. 2. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. 1949-1956.
119. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2001;14:15-37.
120. CDC Norovirus Activity- United States 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2003;52:41-45.
121. Parashar UD, Quiroz ES, Mounts AW, et al. "Norwalk-like viruses:" Public health consequences and outbreak management. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2001;50: 1-17.
122. van Olphen M, Kapsenberg JG, van de Baan E, Kroon WA. Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol.* 1984;47(5):927-32.
123. Allen DJ, Gray JJ, Gallimore CI, Xerry J, Iturriza-Gómara M. Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS One.* 2008 Jan 23;3(1):e1485.
124. K.Y. Green, *Fields virology*, 5th edn. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007), pp. 949–979.
125. Wrobel M, Holmes EC. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol.* 1999;80(Pt 10):2535-43. Review.

126. M.E. Hardy, S.F. Kramer, J.J. Treanor, M.K. Estes. Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype Snow Mountain agent. *Arch Virol.* 1997;142(7):1469-79
127. R.A. Bull, M.M. Tanaka, P.A. White. Norovirus recombination. *J Gen Virol.* 2007 Dec;88(Pt 12):3347-59.
128. Chhabra P, Walimbe AM, Chitambar SD. Molecular characterization of three novel intergenotype norovirus GII recombinant strains from western India. *Virus Res.* 2010 Feb;147(2):242-6.
129. Nakamura K, Iwai M, Zhang J, Obara M, Horimoto E, Hasegawa S, Kurata T, Takizawa T. Detection of a novel recombinant norovirus from sewage water in toyama prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2009 Sep;62(5):394-8.
130. Dey SK, Phan TG, Mizuguchia M, Okitsu S, Ushijima H. Novel recombinant norovirus in Japan. *Virus Genes.* 2010 Jun;40(3):362-4.
131. T.G. Phan, K. Kaneshi, Y. Ueda, S. Nakaya, S. Nishimura, A. Yamamoto, K. Sugita, S. Talanashi, S. Okitsu, H. Ushijima. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *J. Med. Virol.* 79(9), 1388–1400 (2007)
132. M. Koopmans, H. Vennema, H. Heersma, E. van Strien, Y. van Duynhoven, D. Brown, European Consortium on Foodborne Viruses et al., *Emerg. Infect. Dis.* 9(9), 1136–1142 (2003).
133. G. Reuter, H. Vennema, M. Koopmans, G. Szűcs, Epidemic spread of recombinant noroviruses with four capsid types in Hungary. *J. Clin. Virol.* 35(1), 84–88 (2006)
134. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S, Halperin T, Rasool NB, Hewitt J, Greening GE, Jin M, Duan ZJ, Lucero Y, O’Ryan M, Hoehne M, Schreier E, Ratcliff RM, White PA, Iritani N, Reuter G, Koopmans M. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis.* 2009 Sep 1;200(5):802-12
135. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol.* 2010 Aug;84(16):8085-97.

136. S. Fukuda, Y. Sasaki, S.J. Takao. Recombinant norovirus implicated in gastroenteritis outbreaks in Hiroshima Prefecture, Japan. *J Med Virol.* 2008 May;80(5):921-8.
137. R. Vidal, P. Roessler, V. Solari. Novel recombinant norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile. *J. Clin Microbiol.* 2006 Jun;44(6):2271-5.
138. Le Pendu J. Histo-blood group antigen and human milk oligosaccharides: genetic polymorphism and risk of infectious diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2004;554:135-43. Review.
139. Zakhour M, Ruvoën-Clouet N, Charpilienne A, Langpap B, Poncet D, Peters T, Bovin N, Le Pendu J. The alphaGal epitope of the histo-blood group antigen family is a ligand for bovine norovirus Newbury2 expected to prevent cross-species transmission. *LoS Pathog.* 2009 Jul;5(7):e1000504.
140. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Mar;8(3):231-41.
141. Tan M, Xia M, Chen Y, et al. Conservation of carbohydrate binding interfaces: evidence of human HBGA selection in norovirus evolution. *PLoS One* 2009; 4: e5058.
142. Bok K, Abente EJ, Realpe-Quintero M, et al. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *Journal of Virology* 2009; 83: 11890–11901.
143. Wobus, C.E. et al. (2006) Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol.* 80, 5104–5112
144. Farkas, T. et al. (2010) Genetic diversity and histo-blood group antigen interactions of rhesus enteric caliciviruses. *J. Virol.* 84, 8617–8625.
145. Magalhaes, A. et al. (2009) Fut2-null mice display an altered glycosylation profile and impaired BabA-mediated *Helicobacter pylori* adhesion to gastric mucosa. *Glycobiology* 19, 1525–1536
146. Ruvoen-Clouet, N. et al. (2000) Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J. Virol.* 74, 11950–11954
147. Stuart, A.D. and Brown, T.D. (2007) Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for feline calicivirus. *J. Gen. Virol.* 88 (Pt 1), 177–186.

148. Taube, S. et al. (2009) Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. *J. Virol.* 83, 4092–4101.
149. Zakhour, M. et al. Bovine norovirus: carbohydrate ligand, environmental contamination, and potential cross-species transmission via oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* (2010) 76, 6404–6411.
150. Vinjé J, Altena SA, Koopmans MP. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis.* 1997;176(5):1374-8.
151. Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, Bulens SN, Charles M, Chege W, Isakbaeva E, Wright JG, Mintz E, Forney D, Massey J, Glass RI, Monroe SS. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus--United States, 2002. *J Infect Dis.* 2004;190(1):27-36.
152. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis.* 2004;39(3):318-24.
153. Rimoldi SG, Stefani F, Pagani C, Chenal LL, Zanchetta N, Di Bartolo I, Lombardi A, Ruggeri FM, Di Lillo D, Zuccotti GV, Gismondo MR. Epidemiological and clinical characteristics of pediatric gastroenteritis associated with new viral agents. *Arch Virol.* 2011;156(9):1583-9.

Molecular characterization of a new intergenotype Norovirus GII recombinant

I. G. A. Ruether · D. Tsakogiannis · V. Pliaka ·
Z. Kyriakopoulou · A. Krikelis · C. Gartzonika ·
S. Leveidiotou-Stefanou · P. Markoulatos

Received: 12 October 2011 / Accepted: 1 December 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Human noroviruses (NoVs) of the *Caliciviridae* family are a major cause of epidemic gastroenteritis. The NoV genus is genetically diverse and recombination of viral RNA is known to depend upon various immunological and intracellular constraints that may allow the emergence of viable recombinants. In the present study, we report the development of a broadly reactive RT-PCR assay, which allowed the characterization of strain A6 at molecular level, established its genetic relationship at the sub-genogroup level and classified A6 strain at the sub-genotype level. The detection was carried out initially by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the subsequent detection and molecular characterization of NoV strain was achieved by reverse transcription-PCR and sequencing. Based on the sequence analysis, A6 strain was revealed to belong to the GII genogroup of NoVs. Partial ORF1 gene sequencing analysis and complete ORF2 gene sequencing revealed that ORF1 and ORF2 belonged to two distinct genotypes GII/9 and GII/6, respectively, making obvious that A6 strain is a rare intergenotypic recombinant

within the genogroup GII between GII.9 and GII.6 genotypes. A6 strain represents the first human NoV from Greece, whose genome has been partially (ORF1&ORF3) and completed (ORF2) sequenced. To our knowledge the recombination event GII.9/GII.6 in RdRp and capsid gene, respectively, that was revealed in the present study is reported for the first time.

Keywords Noroviruses · Phylogenetic analysis · Genotyping · Recombination · Greece

Introduction

Noroviruses (NoVs) belonging to *Caliciviridae* family are recognized as a worldwide cause of epidemic acute gastroenteritis [1, 2]. NoVs are non-enveloped viruses, 27–35 nm in diameter, with a single-stranded positive sense polyadenylated RNA genome of 7.5–7.7 kb [3]. The genome of NoVs comprises 3 ORFs. ORF1 at the 5'-end of the genome encodes for six nonstructural proteins (p48, NTPase, p22, Vpg, 3CL, and RdRp). ORF2 encodes the major structural capsid protein (VP1) and ORF3 the minor capsid protein (VP2) at the 3'-end of the genome [4, 5]. Currently, NoVs are divided into five major genogroups (GI to GV) according to the amino acid sequence diversity of the VP1 gene. GI, GII, and GIV infect humans, while GIII and GV infect bovine and murine species [6]. These five genogroups are further subdivided into at least 32 phylogenetic clusters or genotypes: Nine in GI, nineteen in GII, two in GIII, and one in GIV and GV [4].

Genotype GII-4 is the most common type causing outbreaks [7–10]. Viruses belonging to other NoV genotypes are found less consistently, causing sporadic outbreaks or temporary epidemics [11–14].

I. G. A. Ruether · D. Tsakogiannis · V. Pliaka ·
Z. Kyriakopoulou · P. Markoulatos (✉)
School of Health Sciences, Department of Biochemistry &
Biotechnology, Microbiology–Virology Laboratory, University
of Thessaly, Ploutonos 26 & Aioulou, 41221 Larissa, Greece
e-mail: markoulatos@bio.uth.gr

A. Krikelis
Abcam plc, Cambridge, UK

C. Gartzonika · S. Leveidiotou-Stefanou
Medical School, Department of Microbiology,
University of Ioannina, Ioannina, Greece

Published online: 16 December 2011

 Springer

Most of the previous genetic analyses have been based on partial nucleotide sequence analyses of the genome, mainly derived from a relatively small region of either the ORF1 or ORF2 gene, differentiating a number of NoVs into their distinct lineages [15–18].

In the present study a stool specimen from a 2-year-old female child, suffering from typical clinical symptoms of viral gastroenteritis was collected in the University Hospital of Ioannina, Greece. Acute gastroenteritis was defined as consecutively episodes of diarrhea (watery or loose stools in a 24 h period), accompanied with vomiting. The detection was carried out initially by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the subsequent detection and molecular characterization of NoV strain was achieved by reverse transcription-PCR and DNA sequencing. RT-PCR assay for GII NoVs that targets conserved regions of the genome, allowed the characterization of A6 strain at molecular level, established its genetic relationship at the sub-genogroup level and classified A6 strain at the sub-genotype level by performing phylogenetic analyses with other GII NoVs that have previously been grouped into genotypes [16]. Overall, A6 strain represents the first human NoV from Greece, whose genome has been partially (ORF1 and ORF3) and completely (ORF2) sequenced and for which its relationship with other NoVs was established.

Materials and methods

Viral RNA extraction from fecal specimen

The stool specimen was diluted into 10 ml of complete solution of phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4), which was homogenized by vortex and stored at -20°C .

Viral RNA was extracted from 140 μl of the supernatant using the QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Germany).

Reverse transcription

Reverse Transcription was carried out as follows: 7 μl consisting of random primers (d N9), (Takara Biomedical group, Shiga, Japan), (50 nmol/ μl), 1 $\mu\text{l}/\text{tube}$, 10 mM dNTPs, 1 $\mu\text{l}/\text{tube}$, (Invitrogen, UK), ddH₂O 5 $\mu\text{l}/\text{tube}$, (Sigma, USA), and 5 μl of isolated RNA were incubated at 65°C for 5 min. Reverse Transcription was carried out in a final volume of 20 μl containing the 12 μl of the previous mixture and 8 μl of a mixture containing 5 \times first strand buffer (4 $\mu\text{l}/\text{tube}$), 0.1 M, DTT (2 $\mu\text{l}/\text{tube}$), RNase Out (20 U/ μl , 0.5 $\mu\text{l}/\text{tube}$), ddH₂O (1 $\mu\text{l}/\text{tube}$), and 0.5 μl reverse transcriptase M-MLV (200 U/ μl , Invitrogen, UK). The samples were sequentially incubated at 25°C for 10 min, at 37°C for 50 min and finally at 70°C for 15 min.

PCR

Three μl of the reverse transcription product was used for PCR in a total volume of 50 μl containing 10 \times PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, 0.5 μl of Paq polymerase (Stratagene), (5 U/ μl) and 100 pmol of primers (Table 1). After an initial denaturation step at 95°C for 2 min, 25 amplification cycles (denaturation at 95°C for 30 s, annealing temperature according to Table 1 for 30 s and extension at 72°C for 1 min) were performed followed by a final extension step at 72°C for 5 min.

Auto Nested PCR with the same set of primers and under the same conditions for 40 cycles of amplification was used to further increase the sensitivity of the assay [19].

Primers

The primer pairs used in the present study are shown in Table 1. Initially, partial amplification of the ORF2 gene was performed using the published primer pair Mon381/Mon383 [20]. Specific primers for Norovirus were

Table 1 Primers used to detect NoV by RT-PCR

Primer	Tm	Target genogroup	ORF	Location	DNA Sequence (5'–3')
NLVR58	56.0	GII	1	4529–4548	GCCCACTCCTGTTTTTCATT
NLVR756	56.0	GII	2	5143–5162	TGCCATAACCTCATTGTTGG
NLVH297	56.0	GII	1	4527–4546	AAGCCCACTCCTGTTTTTCA
NLVH896	56.0	GII	2	5143–5162	TGCCATAACCTCATTGTTGG
MON381	49.1	GII	2	5362–5383	CCAGAATGTACAATGGTTATGC
MON383	48.0	GII	2	5661–5683	CAAGAGACTGTGAAGACATCATC
NLVC463	59.0	GII	2	5577–5559	CTTCTGCCCTCCCTGATA
NLVC1430	58.0	GII	3	6508–6489	GGTGCTGCTTCTGGTAAAA
NLVORF 1955	58.0	GII	3	6429–6448	CAGGAATGGGTTTCAGCACTT
NLVORF 2902	59.0	GII	3	7403–7385	CTTGGGGACGGTTGAGAC

designed by Primer3 software (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>) using published nucleotide sequences of GII viral genomes, (strains: NLV/Miami/292/1994/US, Hu/L154/2000/France, Hu/HCMC204/2006/VNM and Norwalk-like virus, GenBank accession numbers: AF414410, AY921623, EU137732 and AB078337, respectively).

Molecular cloning

After electrophoresis in 2% agarose gel in TBE buffer PCR amplicons were excised from agarose gel, purified using the QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) and cloned into the pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA), according to the manufacturer's instructions.

Phylogenetic analysis

Sequence identity was achieved through BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>). The relationships among the strains were determined using the multiple alignment program CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) and the program MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, version 4.1 Beta3).

Nucleotide sequence accession numbers

The sequences were submitted to GenBank with the accession numbers: HM172493 (A6ORF1), HM172494 (A6ORF2), and HM172495 (A6ORF3).

The GenBank accession numbers used in this study are as follows:

GI: L07418 (Southampton), AF093797 (Norwalk virus), HM87661 (CVXRNA), and AB042808 (Chiba).

GII: GU131223 (Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE), EF190920 (Hu/NLV/DjiboutiVdG66/2003/Djibouti), AY038599 (NLV/VA97207/1997), DQ379715 (Hu/GII/GoulburnValleyG5175C/1983/AUS), AB067537 (U3GII), AB039776 (SaitamaU3), AF414407 (NLV/Florida/269/1993/US), AB067539 (U16GII), AY134748 (Snow Mountain), X86557 (Lordsdale), and U07611 (Hawaii).

Results

Initially the primers used for the detection of A6 strain have been designed to amplify partial amplification of the ORF2 gene [21, 22]. Other regions of the genome have been also selected as targets for amplification, including the RNA-dependent RNA polymerase region and the ORF3 one.

In order to confirm the sole presence of A6 strain, nucleotide sequences were assembled in not conserved regions of the genome, using the multiple alignment

program MEGA. The 3' end of each fragment was 100% homologous with the 5' end of the following fragment. With this approach, due to the great genetic diversity in these regions, the probability of coupling different strains that might coexist in the sample was minimized.

Four overlapping cDNAs fragments: Fragment A, from nucleotides 4529–5126; fragment B, from nucleotides 5044–5638; fragment C, from nucleotides 5505–6501 and fragment D, from nucleotides 6466–7376, encompassing the viral RNA from the 3' end of ORF1 to the 3' end of ORF3, were assembled. Amplicons were cloned and three independent clones from each amplicon were sequenced to avoid any selection that might occur during cloning. The joining together of these four overlapping fragments was performed in non-conserved regions [16], using the multiple alignment program MEGA. The 3' end of each fragment was 100% homologous with the 5' end of the following fragment.

The partial genome sequence was organized into three ORFs, with ORF2 overlapping ORF1 by 19 nucleotides and ORF3 by one nucleotide; spanning nucleotides 4527–5062, 5043–6689, and 6689–7376 for ORF1, ORF2, and ORF3, respectively.

Phylogenetic analysis

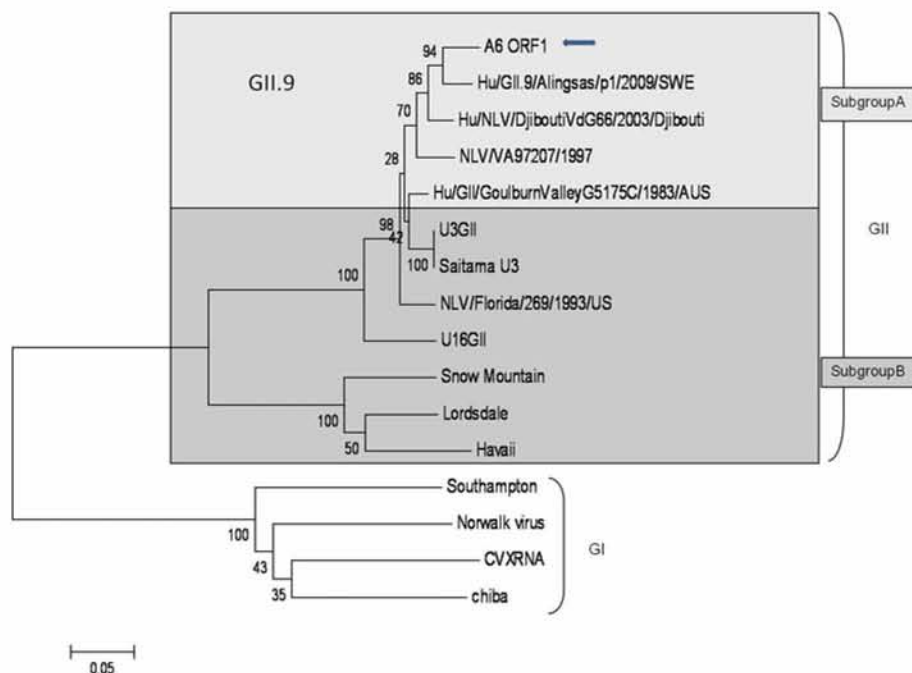
The relationship of A6 strain characterized in the present study, with other strains was assessed using sequences available from GenBank (Fig. 2). Phylogenetic analyses were conducted using the partial length of nucleotide sequences of ORF1 and the full length of nucleotide sequences of ORF2 with completely sequenced NoVs strains. The length of ORF3 was short enough to be compared without segregation. Moreover, we used partially sequenced NoVs strains that were genetically close according to BLAST clustering.

Our initial phylogenetic analysis revealed that ORF1 clustered with GII/9 strains, whereas ORF2 branched outside of the above cluster, clustering with GII/6 strains.

ORF1

The phylogenetic tree of ORF1 partial gene was constructed using the neighbor-joining method based on part of the RdRp region, corresponding to 4527–5027 nucleotides. The analysis revealed that strain A6 was genetically closed and clustered together with GII strains (Fig. 1). Specifically, the phylogenetic tree revealed two distinct phylogenetic groups with reliable bootstrap support, which matched two genogroups, GI and GII [23]. GI, contained four human NoVs from; USA (CYXRNA), UK (Southampton), Germany (Norwalk), and Japan (Chiba), whereas GII consisted of twelve strains closely related NoVs that

Fig. 1 Phylogenetic tree construct based on partial sequences of the ORF1 open reading frame of NVs. The analysis was performed using MegAlign, version 4.1 (BETA 3). The distance was calculated by the neighbor-joining method. Numbers at each branch indicate bootstrap values for the clusters supported by that branch



for the purpose of discussion were divided into major subgroups: Subgroup A, contained five strains, A6ORF1, Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE, Hu/NLV/DjiboutiVdG66/2003/Djibouti, NLV/VA97207/1997, and Hu/GII/GoulburnValleyG5175C/1983/AUS, all of which were classified to genotype GII.9. Subgroup B consisted of the remaining seven strains that were closely related to each other, but it formed a significant number of clusters and single branches. Within subgroup A strain, A6 was most closely related to NoVs strains: Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE with nucleotide identity 94%, Hu/NLV/DjiboutiVdG66/2003/Djibouti with nucleotide identity 93%, NLV/VA97207/1997 with nucleotide identity 92%, and Hu/GII/GoulburnValleyG5175C/1983/AUS with nucleotide identity 91%.

ORF2

The phylogenetic analysis of complete ORF2 gene was constructed using the neighbor-joining method based upon capsid sequences available from GenBank. A total of 15 capsid sequences from NoVs genogroups GI and GII strains were used. The ORF2-based phylogenetic tree was constructed with the nucleotide sequences of four strains [34–36] that were genetically close to A6 strain ORF2 gene, plus seven other GII NoVs, in conjunction with four human GI NoVs as above for ORF1. From the phylogenetic tree presented in Fig. 2 was deduced that A6 strain belonged to the GII genogroup of NoVs and was genetically close to: NLV/Florida/269/1993/US with nucleotide identity 95%, U3GII with nucleotide identity 93%, Saitama U3 with nucleotide identity 93%, and U16GII strain

with nucleotide identity 90%. It is noteworthy that the three strains (Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE, Hu/NLV/DjiboutiVdG66/2003/Djibouti and NLV/VA97207/1997) which were most closely related to A6 strain in the ORF1-based phylogeny, belonged to genotype GII.9 regarding ORF2 gene. On the other hand, as it is pointed out in Fig. 2, four strains (NLV/Florida/269/1993/US, U3GII, SaitamaU3 and U16GII), which were most closely related to A6 strain in the phylogenies based on the ORF2 gene, belonged to genotype GII.6 regarding the ORF1 gene. These findings suggest that A6 strain is an intergenotypic recombinant within the genogroup GII between the GII.9 and GII.6 strains.

Recombination event

To identify the putative parent-like strains and potential recombination sites, phylogenetic profile analysis was performed using SimPlot program [24]. The plots of the nucleotide sequences are depicted in Fig. 3. When a similarity plot for the A6 strain was generated, with strains available from GenBank, a recombination breakpoint at nucleotide position 5,043 of the sequence alignment was visible between two different genotypes within the same genogroup.

These findings were further confirmed by boot scanning of the same genome sequences, demonstrating higher levels of phylogenetic relatedness between the A6 genome sequence and the Hu/GII.9/alingsas/p1/2009/SWE and U16GII genome sequence on the upstream and downstream side of the recombination site, respectively (Fig. 4).

Fig. 2 Phylogenetic tree construct based on complete sequences of the ORF2 open reading frame of NVs. The analysis was performed using MegAlign, version 4.1 (BETA 3). The distance was calculated by the neighbor-joining method. Numbers at each branch indicate bootstrap values for the clusters supported by that branch

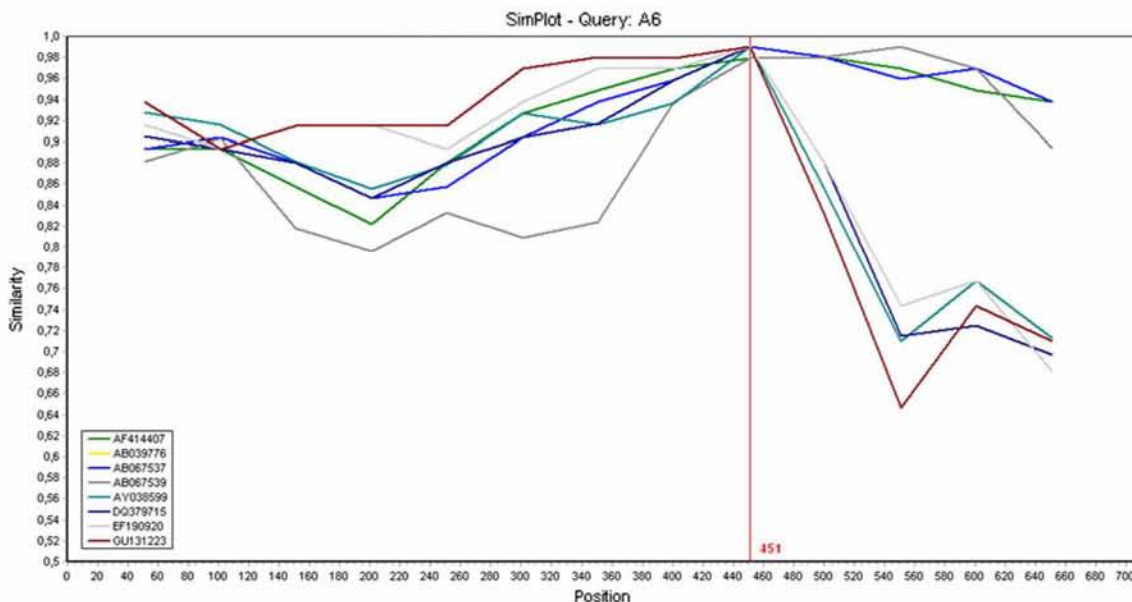
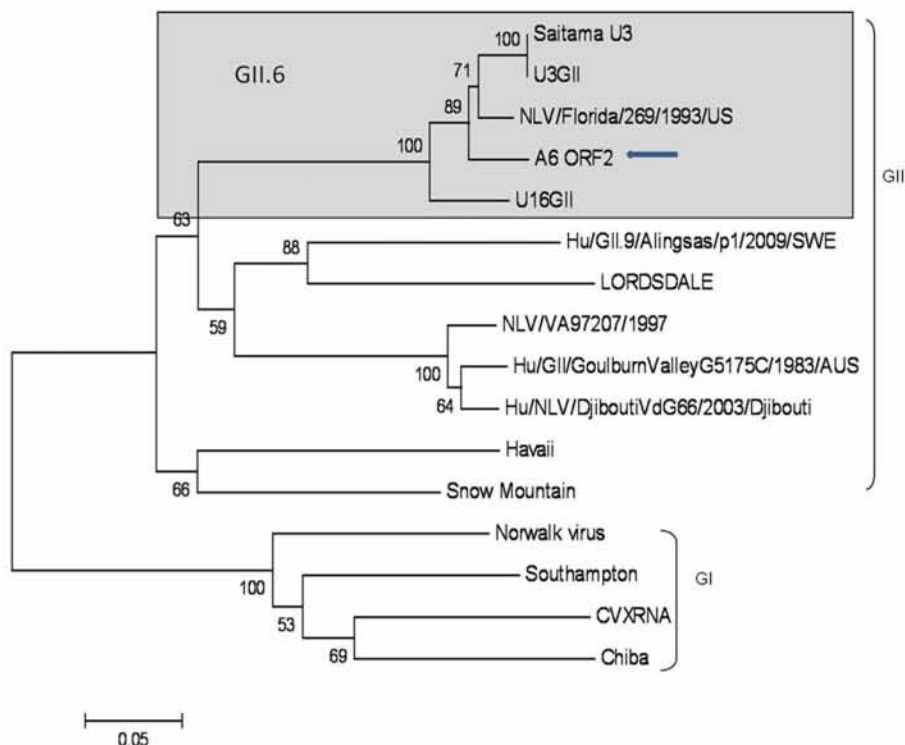


Fig. 3 SimPlot analysis for partial RdRp and capsid sequences. Vertical red line indicates the crossover point at position 5,043 in the ORF1/ORF2 junction. The window size was 100 bp with a step size of 50 bp. The vertical axis indicates the nucleotide identities between

the query sequence (A6) and the strains (listed on the window on the right of the figure), expressed as percentages. The horizontal axis indicates the nucleotide positions of the analyzed genome region

Discussion

Recombination of viral RNA is known to depend upon various immunological and intracellular constraints that may allow the emergence of viable recombinants [25].

Since its first reporting [26], many recombinant NoVs from different genotypes and genogroups have been described worldwide. Recombination intergenotype events have been reported between GII.1/GII.12, GII.b/GII.18, GII.b/GII.4, GII.b/GII.4, GII.d/GII.3, GII.3/GII.13, GII.7/GII.13, GII.b/

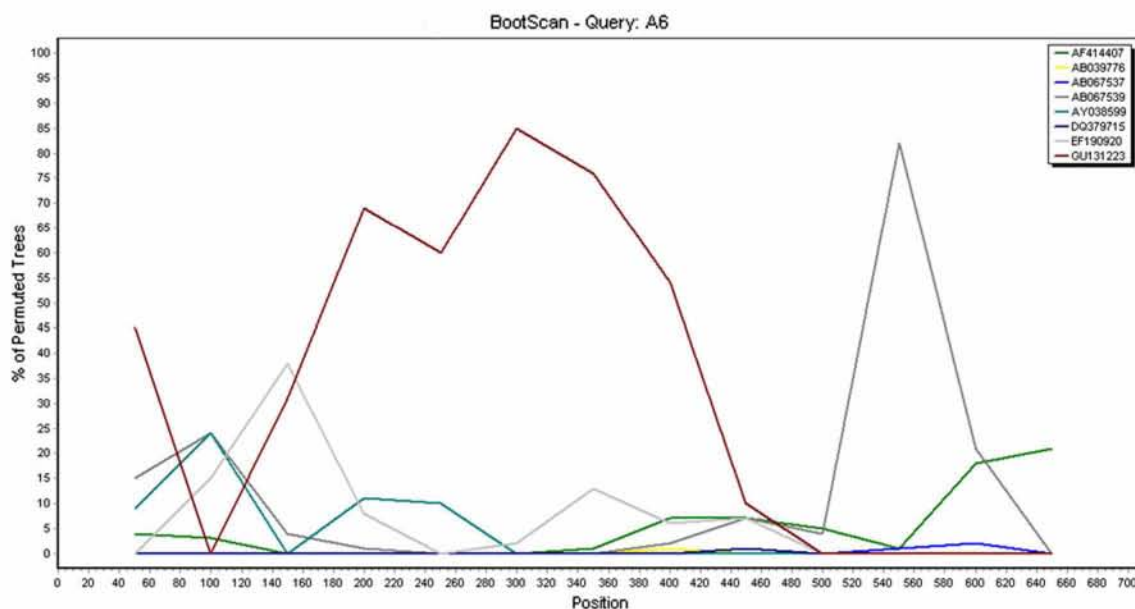


Fig. 4 Bootscan analysis of the genomic region involved in the recombination event at position 5,043 of A6 strain with eight groups of Noroviruses: Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE, Hu/NLV/Djibouti

VdG66/2003/Djibouti, NLV/VA97207/1997, Hu/GII/GoulburnValleyG5175C/1983/AUS, U3GII, Saitama U3, NLV/Florida/269/1993/US and U16GII

GII.7, GII.4/GII.8, GII.5/GII.12, GI.3/GII.4, GII.1/GII.12, GII.4/GII.2, and GII.4/GII.3 in RdRp and capsid gene, respectively [27–31].

Based on the sequence analysis, A6 strain was revealed belonging to the GII genogroup of NoVs. Partial ORF1 and complete ORF2 gene sequencing analysis revealed that ORF1 and ORF2 belonged to two distinct genotypes GII/9 and GII/6, respectively, and SimPlot plus boot scanning analysis confirmed that strain A6 was indeed a recombinant. The recombination site was also consistent with the fact that most of the recombinant strains have a crossover point within or around the junction of ORF1 and ORF2 [32].

To our knowledge the recombination event GII.9/GII.6 in RdRp and capsid gene, respectively, that was revealed in the present study is reported for the first time.

The circulation of a wide variety of different NoVs within a population increases the potential for mixed infections, which could result to recombination events [33]. The findings of the present report support the hypothesis that certain NoVs strains may circulate in specific areas without clinical manifestations and occasionally may change their genetic properties by recombination events.

As recombination allows the virus to increase its genetic fitness, to evolve, to spread in the population and probably escape the host immune response, our findings suggest that the huge capacity for genetic changes displayed by the NoVs will continue to generate new recombination types.

Acknowledgments The study was supported by research grants of the Postgraduate Programs “Applications of Molecular Biology-Genetics. Diagnostic Biomarkers,” code 3817 and “Biotechnology,” code 3439, of the University of Thessaly, School of Health Sciences, Department of Biochemistry & Biotechnology.

Conflict of interests The authors declare that they have no conflicting or dual interests.

References

1. M.A. Widdowson, S.S. Monroe, R.I. Glass, *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 735–737 (2005)
2. M.M. Patel, *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1224–1231 (2008)
3. D.P. Zheng, T. Ando, R.L. Fankhauser, R.S. Beard, R.I. Glass, S.S. Monroe, *Virology* **346**, 312–323 (2006)
4. K.Y. Green, *Fields Virology*, 5th edn. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007), pp. 949–979
5. R.L. Atmar, M.K. Estes, *Clin. Microbiol. Rev.* **14**(1), 15–37 (2001)
6. R.L. Fankhauser, S.S. Monroe, J.S. Noel, C.D. Humphrey, J.S. Bresee, U.D. Parashar, T. Ando, R.I. Glass, *J. Infect. Dis.* **186**, 1–7 (2002)
7. J.S. Noel, R.L. Fankhauser, T. Ando, S.S. Monroe, R.I. Glass, *J. Infect. Dis.* **179**, 1334–1344 (1999)
8. M. Koopmans, J. Vinje, E. Duizer, M. De Wit, Y. Van Duynhoven, *Novartis Found. Symp.* **238**, 197–214 (2001). discussion 198–214
9. P.A. White, G.S. Hansman, A. Li, J. Dable, M. Isaacs, M. Ferson, C.J. McIver, W.D. Rawlinson, *J. Med. Virol.* **68**, 113–118 (2002)
10. B. Lopman, H. Vennema, E. Kohli, P. Pothier, A. Sanchez, A. Negrodo, J. Buesa, E. Schreier, M. Reacher, D. Brown, J. Gray, M. Iturriza, C. Gallimore, B. Bottiger, K.O. Hedlund, M. Torven,

- C.H. Von Bonsdorff, L. Maunula, M. Poljsak-Prijatelj, J. Zimsek, G. Reuter, G. Szucs, B. Melegh, L. Svennson, Y. Van Duynhoven, M. Koopmans, *Lancet* **363**, 682–688 (2004)
11. R.A. Bull, T.V. Elise, C.J. McIver, W.D. Rawlinson, P.A. White, *J. Clin. Microbiol.* **44**, 327–333 (2006)
 12. N. Iritani, A. Kaida, H. Kubo, N. Abe, T. Murakami, H. Venemina, M. Koopmans, N. Takeda, H. Ogura, Y. Seto, *J. Clin. Microbiol.* (2008). doi:[10.1128/JCM.01993-07](https://doi.org/10.1128/JCM.01993-07)
 13. M. Koopmans, J. Vinje, M. De Wit, I. Leenen, W. Van, Y. der Poel, Van Duynhoven, *J. Infect. Dis.* **181**(Suppl. 2), S262–S269 (2000)
 14. D.C. Lewis, A. Hale, X. Jiang, R. Eglin, D.W.G. Brown, *J. Infect. Dis.* **175**, 951–954 (1997)
 15. J. Vinje, R.A. Hamidjaja, M.D. Sobsey, *J. Virol. Methods.* **116**, 109–117 (2004)
 16. Q.H. Wang, M.G. Han, S. Cheetham, M. Souza, J.A. Funk, L.J. Saif, *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1874–1881 (2005)
 17. K.Y. Green, T. Ando, M.S. Balayan, T. Berke, I.N. Clarke, M.K. Estes, D.O. Matson, S. Nakata, J.D. Neill, M.J. Studdert, H.J. Thiel, *J. Infect. Dis.* **181**(Suppl.2), S322–S330 (2000)
 18. J. Vinje, M.P. Koopmans, *J. Clin. Microbiol.* **38**(7), 2595–2601 (2000)
 19. J. Green, K. Henshilwood, C.I. Gallimore, D.W.G. Brown, D.N. Lees, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 858–863 (1998)
 20. J.S. Noel, T. Ando, J.P. Leite, K.Y. Green, K.E. Dingle, M.K. Estes, Y. Seto, S.S. Monroe, R. Glass, *J. Med. Vir.* **53**, 372–383 (1997)
 21. T. Ando, S.S. Monroe, J.R. Gentsch, Q. Jin, D.C. Lewis, R.I. Glass, *J. Clin. Microbiol.* **33**, 64–71 (1995)
 22. X. Jiang, P.W. Huang, W.M. Zhong, T. Farkas, D.W. Cubitt, D.O. Matson, *J. Virol. Methods* **83**, 145–154 (1999)
 23. D.P. Zheng, T. Ando, R.L. Fankhauser, R.S. Beard, R.I. Glass, S.S. Monroe, *Virology* **346**, 312–323 (2006)
 24. K.S. Lole, R.C. Bollinger, R.S. Paranjape, D. Gadkari, S.S. Kulkarni, N.G. Novak, R. Ingersoll, H.W. Sheppard, S.C. Ray, *J. Virol.* **73**(1), 152–160 (1999)
 25. M. Worobey, E.C. Holmes, *J. Gen. Virol.* **80**, 2535–2543 (1999)
 26. M.E. Hardy, S.F. Kramer, J.J. Treanor, M.K. Estes, *Arch. Virol.* **142**, 1469–1479 (1997)
 27. R.A. Bull, M.M. Tanaka, P.A. White, *J. Gen. Virol.* **88**, 3347–3359 (2007)
 28. P. Chhabra, A.M. Walimbe, S.D. Chitambar, *J. Vir. Res.* **147**, 242–246 (2010)
 29. K. Nakamura, M.I.J. Zhang, M. Obara, E. Horimoto, S. Hasegawa, T. Kurata, T. Takizawa, *J. Infect. Dis.* **62**, 394–398 (2009)
 30. M.K. Nayak, D. Chatterjee, S.M. Natoreju, M. Pativada, U. Mitra, M.K. Chatterjee, T.K. Saha, U. Sarkar, T. Krishnan, *J. Clin. Virol.* **45**, 223 (2009)
 31. S.K. Dey, T.G. Phan, M. Mizuguchia, S. Okitsua, H. Ushijima, *Virus Genes* **40**, 362 (2010)
 32. T.G. Phan, K. Kaneshi, Y. Ueda, S. Nakaya, S. Nishimura, A. Yamamoto, K. Sugita, S. Talanashi, S. Okitsu, H. Ushijima, *J. Med. Virol.* **79**(9), 1388–1400 (2007)
 33. P.J. Wright, I.C. Gunesekere, J.C. Doultree, J.A. Marshall, *J. Med. Virol.* **55**, 312–320 (1998)
 34. T. Ando, S.S. Monroe, J.S. Noel, R.I. Glass, *J. Clin. Microbiol.* **35**(3), 570–577 (1997)
 35. S. Kojima, T. Kageyama, S. Fukushi, F.B. Hoshino, M. Shinohara, K. Uchida, K. Natori, N. Takeda, K. Katayama, *J. Virol. Methods* **100**(1–2), 107–114 (2002)
 36. K. Katayama, H. Shirato-Horikoshi, S. Kojima, T. Kageyama, T. Oka, F. Hoshino, S. Fukushi, M. Shinohara, K. Uchida, Y. Suzuki, T. Gojobori, N. Takeda, *J. Virol.* **299**(2), 225–239 (2002)

Circulation of intergenotype recombinant noroviruses GII.9/GII.6 from 2006 to 2011 in central Greece

I. G. A. Ruether · D. Tsakogiannis · Z. Kyriakopoulou · T. G. Dimitriou · C. Papamichail · C. Gartzonika · S. Leveidiotou-Stefanou · P. Markoulatos

Received: 12 June 2013 / Accepted: 10 October 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Noroviruses (NoVs) are members of the *Caliciviridae* family and are recognized as a worldwide cause of acute nonbacterial gastroenteritis. Based on the genetic analysis of the RdRp and capsid regions, human NoVs are divided into three genogroups (Gs), GI, GII, and GIV, which further segregate into distinct lineages called genotypes. In this study, in an attempt to discern the circulation of an intergenotypic recombinant GII.9/GII.6, which was previously reported by our group in central Greece, we investigated NoVs in raw sewages from 2006 to 2011 and compared the results with the viruses detected from clinical samples in the same area and in the same time period. Two specific primer pairs for NoVs were designed which amplified in a single PCR fragment from polymerase to capsid gene covering the widespread recombination point in ORF1/ORF2 junction. Based on the genetic analysis, recombinant NoV strains GII.9/GII.6 were identified. Fourteen out of 15 environmental and eight out of ten clinical samples that were used in the present study were positive, with both primer pairs, confirming that the intergenotypic recombinant GII.9/GII.6 was circulating in the population of central Greece from 2006 to 2011. The crossover point was identified to be within the overlapping region of ORF1/ORF2 (GII.9/GII.6, respectively) and was determined by Simplot at nucleotide position 5,032 bp.

Keywords Noroviruses · Intergenotypic recombinant GII.9/GII.6 · Raw sewages · Clinical samples · Central Greece

Introduction

Noroviruses (NoVs) are members of the *Caliciviridae* family and are recognized as a worldwide cause of acute nonbacterial gastroenteritis [1]. NoVs are composed of a 30–40-nm non-enveloped icosahedral particle that contains a positive-sense, single-stranded RNA genome of approximately 7.5–7.7 kb organized into three open reading frames (ORFs). ORF1 encodes nonstructural proteins which include the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The ORF2 encodes the major capsid protein, VP1, which consists of a shell (S) and two protruding (P) domains, P1 and P2. The S domain is responsible for assembly of VP1, and the P1 domain enhances the stability of virus particles [2, 3]. The P2 domain, the most exposed surface of the viral particle [2] is involved in interaction with both potential neutralizing antibody and histo-blood group antigens (HBGAs), which are the presumptive initial binding site in establishing human infection [4–6]. ORF3 encodes a minor capsid protein which plays a role in the stability of VP1 [7]. Currently, classification of noroviral strains beneath the species level has been based on sequences from different regions of the viral genome [8]. To provide a consistent and reliable scientific basis for classifying NoVs, Zheng and colleagues analyzed the amino acid sequences for the major capsid protein of 164 noroviral strains using an alignment based on the predicted 3D structures. Subsequently a Bayesian tree was generated, and the maximum likelihood pairwise distances of the

I. G. A. Ruether · D. Tsakogiannis · Z. Kyriakopoulou · T. G. Dimitriou · C. Papamichail · P. Markoulatos (✉)
Microbiology-Virology Laboratory, Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Health Sciences, University of Thessaly, Larissa, Greece
e-mail: markoulatos@bio.uth.gr

C. Gartzonika · S. Leveidiotou-Stefanou
Department of Microbiology, Medical School, University of Ioannina, Ioannina, Greece

Published online: 20 October 2013

 Springer

aligned sequences were used to evaluate the results from the uncorrected pairwise distance method. Analyses of the pairwise distances demonstrated three clearly resolved peaks, suggesting that NoV strains beneath the species level can be classified at three levels: strain (S), cluster (C), and genogroup (G). A scheme with 29 genetic clusters (8 in genogroup GI, 19 in GII, 2 in GIII, and 1 each in GIV, GV and GVI) were defined on the basis of the tree topology and was supported by the distance analysis [9, 10].

The GII.4 genotype, which is represented by the Lordsdale/93/UK strain, has been the most commonly identified genotype worldwide in recent years [11, 12]. Viruses belonging to other NoV genotypes are found less consistently and are involved in sporadic outbreaks or temporary epidemics in a limited geographic region and time period [11, 13].

The diversity of noroviral genotypes may indicate co-circulation of multiple genotypes in the nearby areas and suggests that contamination of water by multiple genotypes may facilitate the emergence of new recombinants via co-infections [14]. The presence of enteric viruses in aquatic environments is of great concern to issues of public health [15]. Raw sewages are a suitable material for follow up NoVs, circulating in the population and the environment, as enteric viruses are shed by infected people. NoVs are present in feces at 10^5 – 10^9 viral particles per gram during the symptomatic phase [16] and viruses continue to shed from patients for some weeks after cessation of the symptoms [16, 17]. Asymptomatic individuals, as well as those who recover from the acute symptomatic phase of the disease, can shed virus particles for up to 3 weeks after exposure and these virus carriers can transmit the disease [17–19]. In addition, recent reports showed also relatively high levels of shedding of viruses from asymptomatic individuals [16, 20]. Far less is known about the population composition of these variants and it is believed that NoVs can circulate in the area without clinical manifestations and occasionally may change their genetic properties by recombination events [21]. The genetic analysis of NoVs genotypes, other than GII.4, will improve our understanding for the epidemiology of NoVs. According to a recent study by our group in central Greece, partial ORF1 and complete ORF2 gene sequencing analysis of the clinical sample A6 revealed that ORF1 and ORF2 belonged to two distinct genotypes GII.9 and GII.6 making obvious that this clinical strain was at that time a rare intergenotypic recombinant GII.9/GII.6 in RdRp and capsid gene, respectively [22].

In the present study, we investigated for the presence of these intergenotypic recombinant GII.9/GII.6 NoVs in raw sewage that were collected from October 2006 to December 2011 from the wastewater-treatment plants in central Greece and from clinical samples that were collected from

the same area and from the same time period, to reveal the circulation in the community of the intergenotypic recombinant GII.9/GII.6.

Materials and methods

Wastewater sample collection and processing

Five hundred (500) ml of 15 raw sewage samples collected once every 3–4 months from October 2006 to December 2011 from the wastewater-treatment plants in central Greece were investigated in the present report [23]. Each raw sewage was centrifuged at 1,000 rpm for 2 min (4 °C) and the supernatants were applied for subsequent concentration of viruses using the conventional filter adsorption–elution method [24]. The suspension was centrifuged at 11,000 rpm for 1 h (4 °C), the pellet was collected and dissolved in 4 ml of complete solution of phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4, 1× working concentration: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ and 2 mM KH₂PO₄) and used for viral RNA extraction.

Viral RNA was extracted from 140 µl of the supernatant using the QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Germany).

Stool samples collection and processing

Fecal specimens were collected from ten children, suffering from typical clinical symptoms of viral gastroenteritis at the University Hospital of Ioannina, Greece. The specimens were diluted into 10 ml of complete solution of PBS (pH 7.4, 1× working concentration: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ and 2 mM KH₂PO₄), homogenized by vortex and stored at –20 °C.

Viral RNA was extracted from 140 µl of the supernatant using the QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Germany).

Reverse transcription

Reverse transcription was carried out as follows: 7 µl consisting of random primers (d N9) (50 nmol/µl) 1 µl/tube (Takara Biomedical group, Shiga, Japan), 10 mM dNTPs, 1 µl/tube (Invitrogen, UK), ddH₂O, 5 µl/tube (Sigma, USA), and 5 µl of isolated RNA were incubated at 65°C for 5 min. Reverse transcription was carried out in a final volume of 20 µl containing the 12 µl of the previous mixture and 8 µl of a mixture containing 5× first strand buffer (4 µl/tube), 0.1 M, DTT (2 µl/tube), RNase Out (20units/µl, 0.5 µl/tube, Invitrogen, UK), ddH₂O (1 µl/tube) and 0.5 µl Reverse transcriptase M-MLV (200units/µl, Invitrogen, UK). The samples were

Table 1 Primers used for the detection of intergenotypic recombinant noroviruses GII9/GII6

Primer	Target genogroup/genotype	ORF	Location	Ref. strain	DNA sequence (5'–3')
NLVH297	GII.9	1	4527–4546	A6ORF1 ACC.NO. HM172493	AAGCCCACTCCTGTTTTCA
NLVH896	GII.6	2	5191–5162	A6ORF2 ACC.NO. HM172494	TGCCATAACCTCATTGTTGG
NVLR52	GII.9	1	4523–4541	Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE ACC.NO.GU131223	GTCCAAGCCCACTCCTGTT
NLVR871	GII.6	2	5258–5277	Norwalk-like virus ACC.NO. AB084071	AAACAGTAAACTCGCCCTGT

sequentially incubated at 25°C for 10 min, at 37°C for 50 min and finally at 70°C for 15 min, according to manufacturer's instructions.

Primers

The primer pairs used in the present study are shown in Table 1.

Knowing from a previous report by our group that a rare intergenotypic recombinant GII.9/GII.6 was circulating in central Greece [22], we initially used the specific primer pair NLVH297-NLVH896 which enable us to retrace this recombination for the first time. Then, for all the positive samples, a new primer pair NVLR52-NLVR871 was designed by Primer3 software (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>) using published nucleotide sequences of GII viral genomes, as well as strains A6ORF1 and A6ORF2 accession numbers HM172493 and HM172494, respectively, that were previously characterized by our group [22], covering a more suitable length in ORF2 gene, for phylogeny purposes [25].

PCR

Three microliters of the reverse transcription product was used for PCR in a total volume of 50 µl containing 10× PCR buffer (5 µl/tube), 2 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs (5 µl/tube), 0.5 µl of Paq 5000 DNA polymerase (Stratagene) (5u/µl), and 50 pmol of primers (1 µl/tube) (Table 1). After an initial denaturation step at 95 °C for 2 min, 20 amplification cycles were performed (denaturation at 95 °C for 30 s, annealing temperature at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s), followed by a final extension step at 72 °C for 5 min.

Auto Nested PCR with the same set of primers and under the same conditions for 40 cycles of amplification was then applied to increase the sensitivity of the assay [22, 26].

Molecular cloning: sequencing

Two independent PCR assays, with both primer pairs, were carried out for each individual sample and amplicons from the four distinct PCR assays were subjected to cloning. PCR amplicons were purified using the QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) and cloned into the TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions.

Three clones from each individual amplicon were isolated and sequenced bidirectionally at CEMIA (Larissa, Greece).

Phylogenetic analysis

Sequence identity was determined through BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>). The relationships among the strains were determined using the multiple alignment program CLUSTALW (available at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) and the program MEGA (MolecularEvolutionaryGeneticAnalysis, version4.1, Beta3). The sequences were submitted to GenBank and their corresponding accession numbers are shown in Table 2.

Results

Fourteen out of fifteen environmental and eight out of ten clinical samples that were used in the present study were NoVs positive, with both primer pairs, confirming that the intergenotypic recombinant GII.9/GII.6 that was initially reported in the clinical sample A6 in 2011 was circulating in the population of central Greece from 2006 to 2011 (Table 2).

Each sample was amplified in a single PCR fragment from polymerase to capsid covering the widespread recombination point in ORF1/ORF2 junction [27], since these PCR fragments cover from nucleotides 4527 to 5162 and from 4523 to 5279 (primer pairs NLVH297-NLVH896

Table 2 Nucleotide sequence accession numbers of environmental and clinical strains, detected in this study

Environmental samples	Accession no.	Clinical samples	Accession no.
EIS5	KC212141	KR2	KC212149
EX11	KC212142	KR3	KC212150
EX14	KC212143	N3	KC212151
EIS6	KC212144	A2	KC212152
LR6F	KC212145	A10	KC212153
AB9	KC212146	KR1	KC212157
AB19	KC212147	KR4	KC212158
AB7	KC212148	N2	KC212159
EIS1	KC212154		
LR12	KC212155		
EIS2	KC212156		
R1_LUG	KC662398		
R2_LUG	KC662399		
R3_LUG	KC662400		

and NLVR52-NLVR871, respectively). Four independent PCR assays were carried out for each individual sample and amplicons from the four distinct PCR assays were subjected to cloning. Three clones from each individual amplicon were selected and sequenced bidirectionally. The results of the sequencing revealed that all three clones from each amplicon were NoVs with nucleotide identity ranging from 98 to 100 %, carrying the intergenotypic recombinant GII.9/GII.6. The sequence of one clone from amplicons generated with primers NLVR52-NLVR871 was submitted to GenBank (Table 2).

Phylogenetic analysis

The phylogenetic relationship of fourteen environmental with the eight clinical samples characterized in the present study, with other noroviral sequences available from GenBank (Figs. 1, 2) was investigated. Phylogenetic analysis was conducted using the partial length of nucleotide sequences of ORF1 (4,523–5,061 bp) and ORF2 (5,042–5,279 bp) obtained in the present report, with sequenced noroviral strains available in Genbank data base. Moreover, partially sequenced noroviral strains that were genetically close to the sequenced strains of the present study according to BLAST clustering were used.

Our initial phylogenetic analysis revealed that ORF1 sequences in clinical strains: KR1, KR2, KR3, KR4, N2, N3, A2, A10, A6, and in environmental strains: AB7, AB9, LR6F, EIS6, AB19, EX14, EX11, EIS5, EIS1, EIS2, LR12, R1_LUG, R2_LUG, R3_LUG clustered with GII.9 strains, whereas the same strains in ORF2 sequences branched outside of the above cluster, clustering with GII.6 strains.

ORF1

The phylogenetic tree of ORF1 partial gene was constructed using the neighbor-joining method based on part of the RdRp region, corresponding to 4,527–5,042 nucleotides. The analysis revealed two distinct phylogenetic groups (subgroup A and B) with reliable bootstrap support (1,000 *Bootstrap Replications*) (Fig. 1).

Subgroup A, contained all the environmental and clinical strains, all of which were classified to genotype GII.9. Subgroup B, consisted of strains, GIFU'99, SaitamaU3, Hu/GII.13/8686/Maizuru/2008/JPN, Hu/GII.13/8594/Maizuru/2008/JPN, Hu/GII.7/Seoul/0342/2008/KOR, Hu/GII.7/Wuhan/E2124/CHN/2010,

Hu/GII.8/A155/Limbe/2009/Cameroon, SaitamaU25, Hu/GII.17/Wuhan/Z776/CHN/2007, Hu/GII.17/C15b/Bonaberi/Cameroon, Hu/GII.2/NF2002/USA/2002, Hu/NLV/PontdeR-oides673/2004/Francethat, Hu/GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU, Hu/GII.4/Armidale/NSW390I/2008/AU, Hu/GII.1/7EK/Hawaii/1971/USA, NLV/Westover/302/1994/US, Hu/Hebei/48580/2006/CHN, and Hu/GII.3/CBNU1/2006/KOR deposited in GenBank under accession numbers AB084071, AB039776, GU969059, GU017907, HM635119, JQ751043, JF802498, AB039780, JQ751044, JF802507, JQ320072, AY682549, JX459908, GQ845369, JX289822, AF414418, EF670649, and GU980585, respectively, which were closely related to each other, but formed a significant number of clusters and single branches.

Within subgroup A, all clinical strains: KR1, KR2, KR3, KR4, N2, N3, A2, A10, A6, and environmental strains: AB7, AB9, LR6F, EIS6, AB19, EX14, EX11, EIS5, EIS1, LR12, EIS2, R1_LUG, R2_LUG, R3_LUG were most closely related to: Hu/OH07011/2007/JP with nucleotide identity 91–96 % and Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE with nucleotide identity 93–96 %.

ORF2

The phylogenetic analysis of partial ORF2 gene was also constructed using the Statistical Method neighbor-joining (1,000 *Bootstrap Replications*) based upon capsid sequences available from GenBank (Fig. 2). The ORF2-based phylogenetic tree was constructed with the nucleotide sequences of strains that were genetically close to environmental and clinical strains, plus 18 other GII NoVs, as above for ORF1. From the phylogenetic tree presented in Fig. 2, was deduced that strains were genetically close to: Norwalk-like virus-GIFU'99 with nucleotide identity 95–97 %, and Saitama U3 with nucleotide identity 93–97 %.

It is noteworthy that the strains Hu/OH07011/2007/JP and Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE which were most closely related to environmental and clinical strains in the ORF1-based phylogeny, belonged to genotype GII.9

Fig. 1 Phylogenetic tree construct based on partial sequences of the ORF1 open reading frame of NoVs. The analysis was performed using MegAlign, version 5.1 (BETA3). The distance was calculated by the neighbor-joining method. *Numbers* at each branch indicate bootstrap values for the clusters supported by that branch

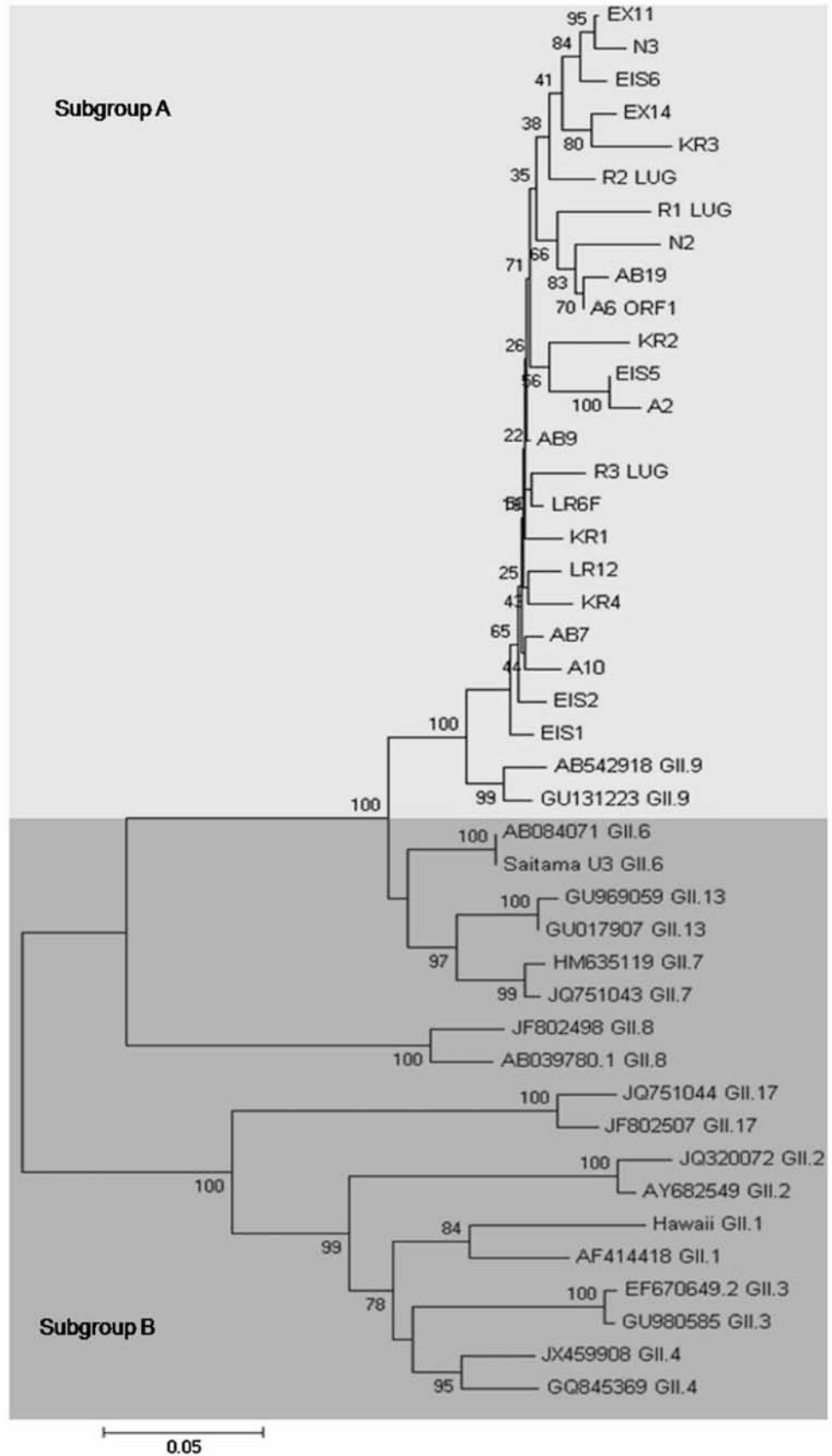
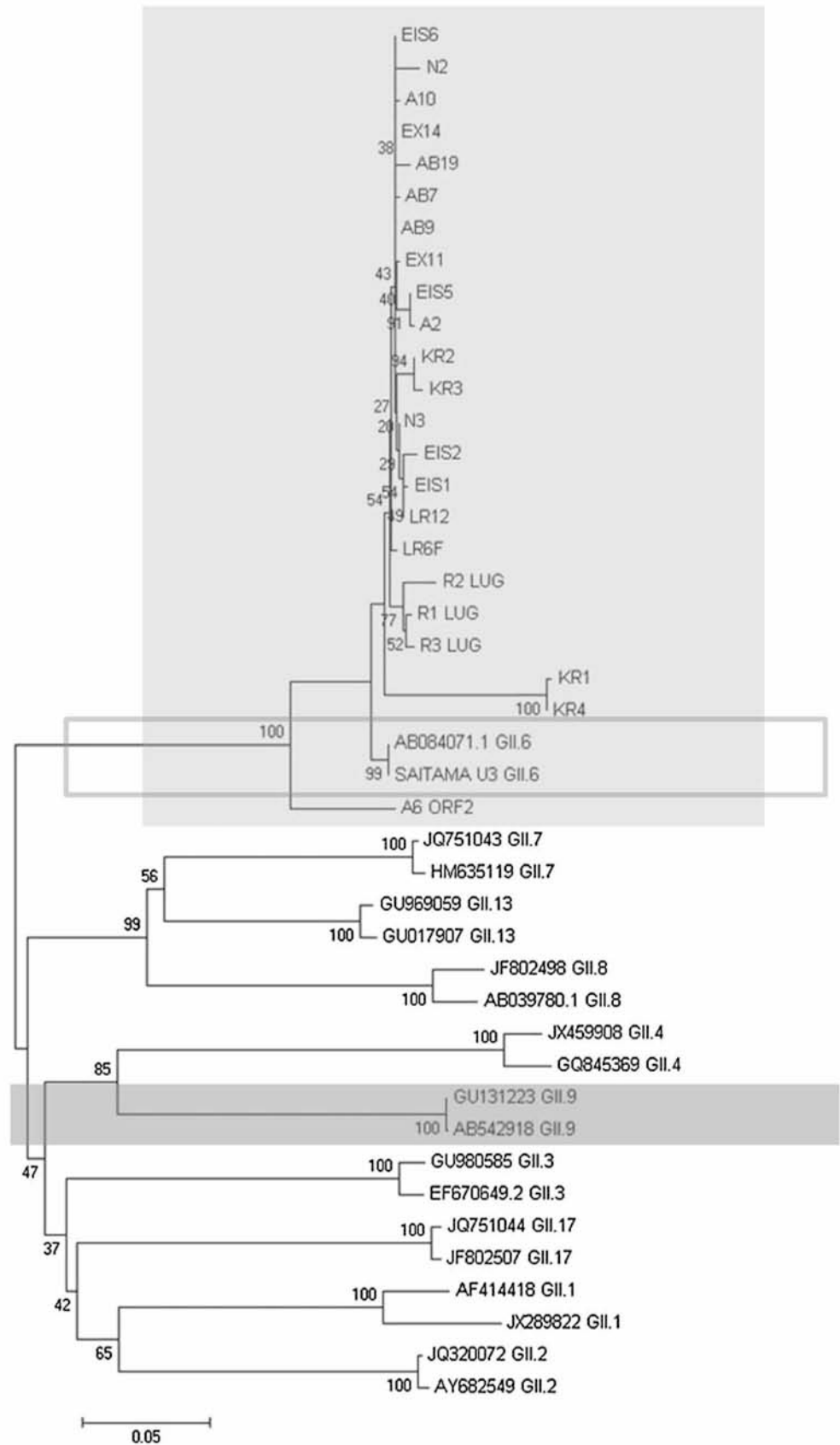


Fig. 2 Phylogenetic tree construct based on partial sequences of the ORF2 open reading frame of NoVs. The analysis was performed using MegAlign, version 5.1 (BETA3). The distance was calculated by the neighbor-joining method. *Numbers* at each branch indicate bootstrap values for the clusters supported by that branch



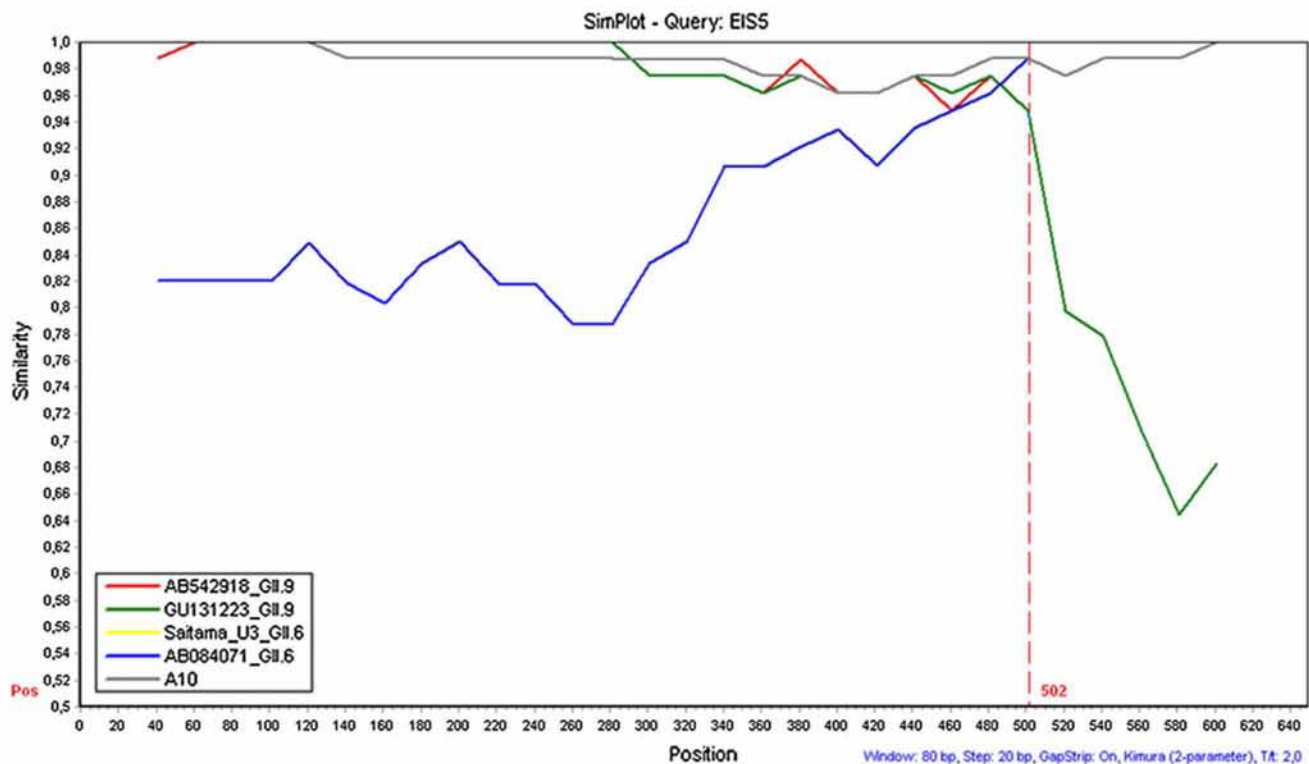


Fig. 3 Simplot analysis for partial RdRp and capsid sequences. Vertical red line indicates the crossover point at position 5,023 in the ORF1/ORF2 junction. The window size was 80 bp with a step size of 20 bp. The vertical axis indicates the nucleotide identities between

the query sequences (EIS5 and A10) and the strains (listed on the window on the right of the figure), expressed as percentages. The horizontal axis indicates the nucleotide positions of the investigated genome region.

regarding ORF2 gene. On the other hand, as it is pointed out in Fig. 2, strains (Norwalk-like virus-GIFU'99 and SaitamaU3), which were most closely related to strains in the phylogenies based on the ORF2 gene, belonged to genotype GII.6 regarding the ORF1 gene.

These findings suggest that both groups of environmental and clinical strains were intergenotypic recombinants within the genogroup GII between GII.9 and GII.6.

Recombination event

In an attempt to identify the putative parent-like strains and potential recombination sites, phylogenetic profile analysis was performed using SimPlot program. The plots of the nucleotide sequences are depicted in Fig. 3. Since the environmental and clinical strains shared 97–99 % nucleotide similarity, we used one of each group, EIS5 from the environmental group and A10 from the clinical group. A similarity plot for strains EIS5 and A10 was generated, with the strains Hu/OH07011/2007/JP and Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE, accession numbers AB542918 and GU131223, respectively, and GIFU'99 and SaitamaU3 accession numbers AB084071 and AB039776, respectively. A recombination breakpoint at nucleotide position

5023 of the sequence alignment was evident between the two different genotypes within the same genogroup.

Discussion

NoVs are the most common cause of nonbacterial acute gastroenteritis, causing numerous outbreaks worldwide [1]. The NoV genome undergoes continuous changes by mutation and recombination. High rates of nucleotide substitutions, due to short replication times, high multiplicity and a lack of proofreading activity of RdRp, allow NoVs to continuously generate mutant genomes [7].

Recombination between noroviral genomes occurs frequently and is another important feature of the NoVs evolution [7]. Recombination may influence virulence as well as being an essential mechanism for maintenance of the virus in the population. Spread and occurrence of recombinant NoVs in symptomatic persons validate their infectivity in human hosts and shows that recombination does not prevent virulence [28]. Molecular epidemiological studies provide vital information on the circulating strains in any region and can aware of emergence of new recombinant strains [29, 30]. According to data of the

established European surveillance project “Food-borne Viruses in Europe” [31], an emerging group of natural recombinant noroviral strains appeared in Europe and caused transcontinental infections, which were thought to be linked via water-borne and food-borne spread [32]. Recent studies have indicated that a novel recombinant strain which first emerged in 2000 in France became predominant the following seasons with outbreaks and sporadic cases in Spain, Sweden, and Hungary [32]. The emergence of new variants is analogous to what is seen with influenza viruses, suggesting that population immunity may be driving the evolution of the viruses [33]. The antigenic variations encountered in the P2 domain are believed to allow NoVs to evade herd immunity in the population [12].

There are two recognized mechanisms involved in resistance to noroviral infection: genetic factors and acquired immunity. The potential role of genetic resistance was first recognized when experimental studies with Norwalk virus showed that participants were repeatedly susceptible or resistant to symptomatic infection following repeated virus challenge [34]. Subsequently, VLPs from Norwalk virus were shown to differentially bind to HBGAs, and the binding pattern correlates with susceptibility to infection and illness [35, 36]. Thus, it is likely that every person is genetically susceptible to one or more noroviral genotypes.

The selection of human NoVs by HBGAs might be multifunctional due to the polymorphic nature of the human HBGAs. Each of the three types of saccharides of the HBGAs the A/B, H, and Lewis epitopes represents one such selection within each of the two major human NoV genogroups GI and GII. This assumption is supported by the finding that A/B-, H-, and Lewis are binding NoVs in both GI and GII genogroups. Thus, each cluster (genotype) is expected to have a common HBGA binding profile that fits in one of the three binding groups [37]. The GI Norwalk virus interacts with HBGAs where less saccharide is involved in binding through fewer interactions to the capsids, while HBGAs bind to the GII viruses, resulting in more interactions with optimal or maximal binding affinities to GII NoVs and therefore, with higher epidemiologic consequences [6, 38].

As ABO secretors are the most popular blood type, representing 80 % of the European and North American populations [39], strains recognizing these blood types should be more prevalent than other strains binding to less popular HBGA types. According to this assumption, NoVs in the A/B binding group bind the A and/or B but not O secretors, and thus might have a narrower target population compared with those in the H binding group. As a result, strains in the A/B binding group might be less prevalent compared to strains in the H binding groups, such as many

members of the GII.4 cluster. In fact, the amino acid compositions of the HBGA binding interfaces are nearly 100 % conserved among all known GII.4 variants found during the past decade [40]. This suggests that the GII.4 genotype could be the only genotype with an optimal survival phenotype [41]. Thus, GII.4 strains with the current H binding phenotype that is able to bind A/B/O secretors would be expected to continue to be a predominant cause of epidemics.

These findings led to the concept of convergent evolution of NoVs via selection by human HBGAs. But this concept partially explains several important aspects of human NoVs, including epidemiology, classification, and disease control. However, for understanding NoVs–host interactions and their clinical outcomes more research is needed in the future on the structures of the HBGA binding interfaces with more NoVs genotypes and particularly with those NoVs found recombinant in ORF1/ORF2 genomic region in correlation with the identification and characterization of other host receptors or co-receptors that could also affect the host susceptibility. Furthermore, it should be noted that additional factors, such as the host immunity, could also play a role in NoV evolution and epidemiology.

Viral gastroenteritis is now well documented in most of the industrialized countries, in contrast to Greece where epidemiological data concerning NoVs are still lacking. To date, there have been only two epidemiological studies in North Eastern Greece covering the year 2006 [42, 43] which refer to a waterborne outbreak due to contaminated potable water, although no viruses were detected in any tested water samples [42]. Furthermore, evaluation of 22 PCR products targeting a 213 bp region of GI and GII RdRps presented an average homology of 94.8 % to GII strains in GenBank [42].

In this report, we describe the molecular characterization of recombinant NoVs GII.9/GII.6 associated with gastroenteritis in clinical samples and revealed the presence of these same recombinant strains in raw sewages during the same time period. According to a recent study by our group in central Greece, the same recombination event between GII.9/GII.6 in polymerase and capsid genes, respectively, was reported in a clinical sample in 2011 proving that this group of recombinant NoVs was circulating from 2006 to at least 2011 in the population of central Greece [22]. Sequence analysis of the eight clinical and of 14 environmental recombinant strains, which were detected in the present study, revealed naturally inter-genotype recombination between NoV GII strains. The crossover point was restricted at the overlapping region of ORF1/ORF2 (GII.9/GII.6, respectively) and was determined by Simplot at nucleotide position 5,032 bp (Fig. 3). The discovery of this novel recombination, GII.9/GII.6, is another illustration of the enormous diversity among the

noroviral strains, and may have important implications for future vaccine strategies.

Thus, circulation of recombinant strains such as GII.9/GII.6 NoVs, even at low rates, may provide a good opportunity to viruses to recombine with other co-infecting NoVs, generating consequently novel genotype strains [32].

In conclusion, given the importance of NoVs as a cause of epidemic gastroenteritis, environmental surveillance of NoVs could be a useful tool illustrating the circulation and the epidemiology of these viruses. Greater community surveillance and further investigation of NoVs could provide further insights into noroviral transmission and pathogenesis and may help to identify different approaches used by the NoVs to evolve, sustain, and spread in the population.

Acknowledgments This work was supported by research Grants of the Postgraduate Programmes “Applications of Molecular Biology-Genetics. Diagnostic Biomarkers,” code 3817 and “Biotechnology,” code 3439, of the University of Thessaly, School of Health Sciences, Department of Biochemistry & Biotechnology.

Conflict of interest All authors declare that they have no conflicting or dual interests.

References

- D.J. Allen, J.J. Gray, C.I. Gallimore, J. Xerry, M. Iturriza-Gomara, *PLoS One* **3**(1), e1485 (2008)
- B.V. Prasad, M.E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M.G. Rossmann, M.K. Estes et al., *Science* **286**(5438), 287–290 (1999)
- M. Tan, X. Jiang, *Trends Microbiol.* **13**(6), 285–293 (2005)
- M. Tan, P. Huang, J. Meller, W. Zhong, T. Farkas, X. Jiang, *J. Virol.* **77**(23), 12562–12571 (2003)
- M. Tan, R.S. Hegde, X. Jiang, *J. Virol.* **78**(12), 6233–6242 (2004)
- S. Cao, Z. Lou, M. Tan, Y. Chen, Y. Liu, Z. Zhang et al., *J. Virol.* **81**(11), 5949–5957 (2007)
- K.Y. Green, *Fields virology*, 5th edn. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007), pp. 949–979
- T. Kageyama, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F.B. Hoshino, S. Kojima, R. Takai, T. Oka, N. Takeda, K. Katayama, *J. Clin. Microbiol.* **42**(7), 2988–2995 (2004)
- D.P. Zheng, T. Ando, R.L. Fankhauser, R.S. Beard, R.I. Glass, S.S. Monroe, *Virology* **346**(2), 312–323 (2006)
- V. Martella, N. Decaro, E. Lorusso, A. Radogna, P. Moschidou, F. Amorisco, M.S. Lucente, C. Desario, V. Mari, G. Elia, K. Banyai, L.E. Carmichael, C.J. Buonavoglia, *Virology* **83**(21), 11391–11396 (2009)
- R.A. Bull, T.V. Elise, C.J. McIver, W.D. Rawlinson, P.A. White, *J. Clin. Microbiol.* **44**(2), 327–333 (2006)
- J.J. Siebenga, H. Vennema, B. Renckens, E. de Bruin, B. van der Veer, R.J. Siezen, M. Koopmans, *J. Virol.* **81**(18), 9932–9941 (2007)
- N. Iritani, A. Kaida, H. Kubo, N. Abe, T. Murakami, H. Vennema, M. Koopmans, N. Takeda, H. Ogura, Y. Seto, *J. Clin. Microbiol.* **46**(7), 2406–2409 (2008)
- C. Lee, S.J. Kim, *J. Water Res.* **42**(17), 4477–4484 (2008)
- R.L. Ward, E.W. Akin, *CRC Crit. Rev. Environ. Contam.* **14**, 297–310 (1984)
- K. Ozawa, T. Oka, N. Takeda, G.S. Hansman, *J. Clin. Microbiol.* **45**(12), 3996–4005 (2007)
- B. Rockx, M. De Wit, H. Vennema, J. Vinjé, E. De Bruin, Y. Van Duynhoven, M. Koopmans, *Clin. Infect. Dis.* **35**(3), 246–253 (2002)
- D.Y. Graham et al., *J. Infect. Dis.* **170**(1), 34–43 (1994)
- T. Patterson et al., *Epidemiol. Infect.* **111**(1), 157–162 (1993)
- C. García, H.L. DuPont, K.Z. Long, J.I. Santos, G. Ko, *J. Clin. Microbiol.* **44**(8), 2997–3000 (2006)
- M. Nilsson, K.O. Hedlund, M. Thorhagen, G. Larson, K. Johansen, A. Ekspong, L. Svensson, *J. Virol.* **77**(24), 13117–13124 (2003)
- I.G.A. Ruether, D. Tsakogiannis, V. Pliaka, Z. Kyriakopoulou, A. Krikelis, C. Gartzonika, S. Leveidiotou-Stefanou, P. Markoulatos, *Virus Genes* **44**(2), 237–243 (2012)
- M. Gilgen, D. Germann, J. Lüthy, P. Hübner, *Int. J. Food Microbiol.* **37**(2–3), 189–199 (1997)
- M. van Olphen, J.G. Kapsenberg, E. van de Baan, W.A. Kroon, *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(5), 927–932 (1984)
- A. Kroneman, H. Vennema, K. Deforche, H. v d Avoort, S. Peñaranda, M.S. Oberste, J. Vinjé, M. Koopmans, *J. Clin. Virol.* **51**(2), 121–125 (2011)
- J. Green, K. Henshilwood, C.I. Gallimore, D.W. Brown, D.N. Lees, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(3), 858–863 (1998)
- R.A. Bull, G.S. Hansman, L.E. Clancy, M.M. Tanaka, W.D. Rawlinson, P.A. White, *Emerg. Infect. Dis.* **11**(7), 1079–1085 (2005)
- K. Motomura, M. Yokoyama, H. Ode, H. Nakamura, H. Mori, T. Kanda, T. Oka, K. Katayama, M. Noda, T. Tanaka, N. Takeda, H. Sato, *J. Virol.* **84**(16), 8085–8097 (2010)
- S. Fukuda, Y. Sasaki, S.J. Takao, *Med. Virol.* **80**(5), 921–928 (2008)
- R. Vidal, P. Roessler, V. Solari, *J. Clin. Microbiol.* **44**(6), 2271–2275 (2006)
- M. Koopmans, H. Vennema, H. Heersma, E. van Strien, Y. van Duynhoven, D. Brown, European Consortium on Foodborne Viruses et al., *Emerg. Infect. Dis.* **9**(9), 1136–1142 (2003)
- G. Reuter, H. Vennema, M. Koopmans, G. Szücs, *J. Clin. Virol.* **35**(1), 84–88 (2006)
- J.J. Siebenga, H. Vennema, D.P. Zheng, J. Vinjé, B.E. Lee, X.L. Pang et al., *J. Infect. Dis.* **200**(5), 802–812 (2009)
- T.A. Parrino et al., *N. Engl. J. Med.* **297**(2), 86–89 (1977)
- A.M. Hutson et al., *J. Infect. Dis.* **185**(9), 1335–1337 (2002)
- L. Lindesmith, C. Moe et al., *Nat. Med.* **9**(5), 548–553 (2003)
- M. Tan, X. Jiang, *Trends Microbiol.* **19**(8), 382–388 (2011)
- W. Bu et al., *J. Virol.* **82**(11), 5340–5347 (2008)
- J. Le Pendu, *Adv. Exp. Med. Biol.* **554**, 135–143 (2004)
- M. Zakhour et al., *PLoS Pathog* **5**(7), e1000504 (2009)
- E.F. Donaldson et al., *Nat. Rev. Microbiol.* **8**(3), 231–241 (2010)
- A. Vantarakis, K. Mellou, G. Spala, P. Kokkinos, Y. Alamanos, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **8**(8), 3468–3478 (2011)
- V.P. Papadopoulos, O. Vlachos, E. Isidoriou, C. Kasmeridis, Z. Pappa, A. Goutzouvelidis, F.A. Filippou, *J. Gastrointest. Liver Dis.* **15**(1), 27–30 (2006)

1 Characterization of novel intergenogroup and intergenotype
2 recombinant Noroviruses from Central Greece

3

4 I.G.A. Ruether¹, T.G. Dimitriou¹, D. Tsakogiannis¹, Z.
5 Kyriakopoulou¹, G.D. Amoutzias¹, C.Gartzonika², S.Leveidiotou-
6 Stefanou², P. Markoulatos^{1*}.

7

8 1) University of Thessaly, School of Health Sciences,
9 Department of Biochemistry & Biotechnology, Microbiology-
10 Virology Laboratory, Larissa , Greece

11 2) University of Ioannina, Medical School, Department of
12 Microbiology, Ioannina, Greece

13

14

15 *Corresponding Author: Professor P. Markoulatos

16 University of Thessaly, School of Health Sciences

17 Department of Biochemistry & Biotechnology

18 Ploutonos 26 & Aiolou

19 41221 Larissa, Greece

20 Tel.: +302410 565274, Fax: +302410 565294

21 E-Mail: markoulatos@bio.uth.gr

22

23

24

25

26 **Abstract**

27

28 Noroviruses (NoVs) are a major causative agent of acute
29 gastroenteritis in humans. They are members of the *Caliciviridae*
30 family and based on the genetic analysis of the RdRp and capsid
31 regions, human NoVs are divided into three genogroups (Gs), GI,
32 GII, and GIV. The three genogroups further segregate into distinct
33 lineages called genotypes. The NoV genus is genetically diverse
34 and recombination of viral RNA is known to depend upon various
35 immunological and intracellular constraints that may allow the
36 emergence of viable recombinants. In this study, three Noroviral
37 strains detected in clinical samples revealed two hitherto
38 unobserved recombination events between GII.9/GII.4 and
39 GII.9/GI.7 genogroups. To our knowledge, these intergenotype
40 and intergenogroup recombination events of GII.9/GII.4 and
41 GII.9/GI.7, in ORF1 and ORF2 genes respectively are reported for
42 the first time and highlight the ongoing evolution of Noroviruses.

43

44

45

46 **Keywords:** Noroviruses, rare recombinants, GII.9/GII.4, GII.9/GI.7

47

1. Introduction

Noroviruses (NoVs), classified as members of the Caliciviridae family, are a major causative agent of acute gastroenteritis in humans [1]. NoVs are non-enveloped and possess a single-strand positive-sense RNA genome of 7.5-7.7 kb, consisting of three open reading frames (ORFs) [2]. Based on the amino acid sequence diversity of ORF2 (designated as VP1 gene), NoVs are classified into six major groups, genogroup I (GI) to genogroup VI (GVI) which further segregate into distinct lineages, called genotypes [3-5]. To date, molecular characterization of NoVs has revealed eight genotypes of GI, nineteen genotypes of GII, two genotypes of GIII and one genotype each for GIV, GV and GVI [4, 5]. The diversity among NoVs is maintained through rapid accumulation of point mutations due to the error-prone nature of RNA replication, the lack of proofreading activity of their RNA polymerase and also due to genetic recombination involving the exchange of sequence fragments between two RNA viruses co-infecting the same cell with nonsegmented genomes [6]; the above mechanisms are recognized as the driving forces of RNA virus evolution, leading to the establishment and ongoing evolution of a new recombinant strain [7]. To date, a large number of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

70 recombinant Noroviral strains have been reported within GI, GII,
71 and GIII genogroups [8-22]. However, outbreaks of GII.4 genotype
72 occur much more frequently than any other genotype within the GII
73 genogroup while GI outbreaks occur less frequently [23, 24].
74 Recent studies on GII.4 genotype suggest that some Noroviral
75 outbreaks correlate with the genetic changes of these emerging
76 strains and every 2 - 3 years new GII.4 variants emerge, which are
77 responsible for the recent increase in the frequency of norovirus
78 gastroenteritis [23]. Over the last decade, GII.4 was the most
79 common genotype circulating worldwide, whereas emergent GII.4
80 strains that resulted from recombination between ORF1 and ORF2
81 have been reported [24].

82 In this report, three Noroviral strains, LR13, LR15 and AG4, were
83 detected in clinical samples and their analyses revealed two
84 hitherto unobserved recombination events between GII.9/GII.4 and
85 GII.9/GI.7 genogroups. To our knowledge these intergenotype and
86 intergenogroup recombination events (GII.9/GII.4 and GII.9/GI.7, in
87 ORF1 and ORF2 respectively) are reported for the first time and
88 highlight the ongoing evolution of Noroviruses.

89

90

91 **2. Materials and Methods**

92

93 2.1 Stool samples collection and processing

94 Five fecal specimens were collected in December 2012 from five
95 children (2 males and 3 females of 14-17 years old), suffering from
96 typical clinical symptoms of viral gastroenteritis at the University
97 Hospital of Ioannina, Greece. The specimens were diluted into 10
98 ml of complete solution of PBS (pH 7.4, 1x working concentration:
99 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ and 2 mM KH₂PO₄),
100 homogenized by vortex and stored at -20⁰C until use. Viral RNA
101 was extracted from 140 µl of the supernatant using the QIAamp®
102 Viral RNA Mini Kit according to the manufacturer's instructions
103 (Qiagen, Germany).

104

105 2.2 Reverse Transcription

106 Five µl of RNA were subjected to cDNA synthesis by Reverse
107 Transcriptase M-MLV (200units/µl, Invitrogen, UK), according to
108 the manufacturer's instructions, using random primers (dN9),
109 (Takara Biomedical group, Shiga, Japan), (50nmol/µl). Three µl of
110 each cDNA were used in subsequent PCR assays.

111

112 2.3 Primers

1
2
3 114 MON381-383 for GII genogroup [25] and P78-P80 for GI
4
5 115 genogroup [26]. Three out of five samples were Norovirus positive.
6
7
8 116 Two samples, LR13 and LR15, were positive for GII NoV and one
9
10
11 117 sample, AG4, was positive for both genogroups, GI and GII.
12
13
14 118 To screen for recombinant NoVs, already published specific primer
15
16
17 119 pairs NVLR52-NLVR871 [27] and NLVH297-NLVH896 [20] were
18
19
20 120 used. These primer pairs were located in highly conserved regions
21
22
23 121 of the viral genome. Moreover for phylogeny purposes the
24
25
26 122 published primer pair QNIF2–G2SKR [28] was used as
27
28
29 123 supplementary for NLVH297-NLVH896 primer pair, covering a
30
31 124 more suitable length in ORF2.
32
33

34 125

36 126 2.4 PCR

37
38
39 127 Three µl of the reverse transcription product were used for
40
41
42 128 subsequent PCR assays in a total volume of 50µl, containing 10x
43
44
45 129 PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 0.5µl of Paq DNA
46
47
48 130 polymerase (Stratagene), (5 U/µl) and 50pmol of each primer pair.
49
50
51 131 After an initial denaturation step at 95⁰C for 2min, 25 amplification
52
53
54 132 cycles (denaturation at 95⁰C for 30s, annealing temperature at
55
56
57 133 60⁰C for 20s and extension at 72⁰C for 30s) were performed,
58
59
60 134 followed by a final extension step at 72⁰C for 5 min. Auto Nested
61
62
63
64

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
135 PCR was performed for 40 cycles, in the same conditions, to
136 further increase the sensitivity of the assay [29]. The amplification
137 of a single PCR fragment of each sample from polymerase to
138 capsid eliminates the risk of co-infection with different NoV
139 genogroups and covers the usual recombination point
140 (ORF1/ORF2) [30].

142 2.5 Molecular cloning – Sequencing

143 Two independent PCR assays were carried out and amplicons
144 from the two distinct PCR assays were subjected to cloning. PCR
145 amplicons were purified using the QIAquick[®] Gel Extraction Kit
146 (Qiagen, Germany) and cloned into the TOPO[®] TA Cloning Kit
147 (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions.
148 Three clones from each individual amplicon were isolated and
149 sequenced bidirectionally at CEMIA (Larissa, Greece). Sequence
150 identity was determined through BLAST
151 (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>).

153 2.6 Phylogenetic analysis

154 The nucleotide sequences of the 3' end of the RdRp gene and of
155 the 5' part of the capsid gene of the Noroviral strains were
156 separately used for the construction of the phylogenetic trees in

157 order to screen for recombinants. Multiple alignments of NoVs
158 were generated by ClustalW (available at
159 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) and the phylogenetic
160 trees were constructed by the neighbor-joining method with 1000
161 bootstrap replicates, using the MEGA 4.1 software. Finally,
162 similarity plots were generated for assessing recombination events
163 with the SimPlot software.

165 3. Results

166
167 Of the five clinical samples, three were positive for Noroviruses,
168 LR13, LR15 (with primer pairs MON381-MON383,NLVH297-
169 NLVH896 and QNIF2-G2SKR) and AG4 (with primer pairs
170 MON381-MON383, P78-80 and NLVR52-NLVR871). The two
171 specific primer pairs (NLVH297-NLVH896 and NLVR52-NLVR871)
172 used in this study amplified both viral regions (polymerase and
173 capsid) in the same amplicon, eliminating the risk that sequences
174 from polymerase and capsid genes came from different noroviral
175 genomes present in the same sample. Moreover the usual
176 recombination point in ORF1/ORF2, from nucleotides 4523-5277
177 (strain Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE, accession no GU131223
178 and strain Norwalk-like virus, accession no AB084071) and from

179 nucleotides 4527-5162 (strain A6ORF1, accession no HM172493
180 and strain A6ORF2, accession no HM172494) was covered by
181 primer pairs NLVR52-NLVR871 and NLVH297-NLVH896,
182 respectively.

183 Three independent clones from each amplicon were sequenced
184 and all three (of the same amplicon) had a nucleotide identity
185 among them ranging from 99 to 100%. The sequence of one clone
186 from each amplicon was submitted to GenBank.

187

188 3.1 Nucleotide sequence accession numbers

189
190
191 The sequences were submitted to GenBank with the accession
192 numbers: LR13 (primers MON381-383): KF848656, LR13 (primers
193 NLVH297-NLVH896 and QNIF2-G2SKR): KF848658, LR15
194 (primers MON381-383): KF848657, LR15 (primers NLVH297-
195 NLVH896 and QNIF2-G2SKR): KF848659 and AG4 (primers P78
196 – P80): KF369985, AG4 (primers MON381-383): KF369986, AG4
197 (primers NLVR52-NLVR871): KC662401.

198 The GenBank accession numbers used in this study, for the
199 phylogenetic analyses, are as follows:

200 **GI:**Hu/GI.7/S21/2008/Lilla_Edet/Sweden(JN603264),Hu/GI.3/S29/
201 2008/Lilla_Edet/Sweden(JN603244),Hu/GI.6/Kingston/ACT160D/2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

202 010/AU(JQ388274),Hu/NLV/Appalachicola_Bay/318/1995/US(AF4
203 14406), Hu/GI.4/S32/2008/Lilla_Edet/Sweden (JN603266).
204 **GII:**Hu/GII.13/8686/Maizuru/2008/JPN(GU969059),Hu/GII.14/8594
205 /Maizuru/2008/JPN(GU017907),Hu/GII.7/Seoul/0342/2008/KOR(H
206 M635119),Hu/GII.7/Wuhan/E2124/CHN/2010(JQ751043),SAITAM
207 AU3(AB039776),Hu/GII.6/Ehime090371/2009/JP(AB682736),Hu/G
208 II.9/Alingsas/p1/2009/SWE(GU131223),Hu/OH07011/2007/JP(AB
209 542918),Hu/GII.8/A155/Limbe/2009/Cameroon(JF802498),Norwal
210 k-like_virus(AB039780),Hu/GII.17/Wuhan/Z776/CHN/2007
211 (JQ751044),Hu/GII.17/C15b/Bonaberi/Cameroon(JF802507),
212 Hu/GII.2/NF2002/USA/2002(JQ320072),Hu/NLV/Pont_de_Roide_
213 673/2004/France(AY682549),NLV/Westover/302/1994/US(AF4144
214 18),Hu/Hebei/48580/2006/CHN(EF670649),Hu/GII.3/CBNU1/2006/
215 KOR(GU980585),Hu/GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU(JX459908)
216 , Hu/GII.4/Armidale/NSW390I/2008/AU (GQ845369),
217 **GV:** Murine norovirus 1 (KC782764), Murine norovirus
218 GV/CR6/2005/USA (JQ237823).

221 3.2 Phylogenetic analysis

222

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

223 Phylogenetic analyses were conducted using the fragments of the
224 three nucleotide sequences of ORF1 and ORF2 obtained in the
225 present report, together with publicly available sequences from
226 GenBank that were representatives of each genotype available.
227 Next we ensured that these publicly available representative
228 sequences had an homologous region in both ORF1 and ORF2.
229 The two phylogenetic trees of ORF1 partial gene and of ORF2
230 partial gene were constructed using the neighbor-joining method
231 with 1,000 Bootstrap Replications.
232 This analysis revealed that ORF1, corresponding to nucleotides
233 4527–5094 for AG4 strain and 4527–5062 for LR13 and LR15,
234 clustered with GII/9 strains, (depicted in Fig. 1). For ORF2, the
235 AG4 fragment corresponding to nucleotides 5078–5340 and LR13
236 and LR15 fragments corresponding to nucleotides 5043-5499
237 clustered with GI/7 and GII/4 strains respectively, (depicted in Fig.
238 2). Therefore, based on ORF1 phylogeny, all three strains were
239 classified as GII.9 genotype and were most closely related to:
240 Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE (accession no GU131223) and
241 Hu/OH07011/2007/JP (accession no AB542918) with an average
242 nucleotide identity of 92,73%, 91,94% and 88,12% respectively.
243 Based on ORF2 phylogeny, AG4 was classified as GI.7 whereas
244 LR13 and LR15 strains were classified as GII.4 genotype and were

1
2
3 245 most closely related to: Hu/GI.7/S21/2008/Lilla Edet/Sweden
4
5 246 (accession no JN603264), Hu/GII.4/Armidale/NSW390I/2008/AU
6
7 247 (accession no GQ845369) and
8
9 248 Hu/GII.4/Sydney/NSW0514/2012/AU (accession no JX459908)
10
11 249 with an average nucleotide identity of 95,16%, 96,04% and
12
13
14 250 84,63%, respectively.
15
16
17 251

20 252 3.3 Detection of Recombination events

21
22 253
23
24
25 254 In an attempt to identify the putative parent-like strains and
26
27
28 255 potential recombination sites, computational analyses (depicted in
29
30
31 256 Fig.3) were performed with the SimPlot software. When a similarity
32
33
34 257 plot was generated for strains LR13, LR15 and AG4, together with
35
36
37 258 strains available from GenBank, two recombination breakpoints
38
39
40 259 were detected: for LR13 and LR15 fragments at alignment position
41
42
43 260 512 (nucleotide position 5039 in strain
44
45 261 Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE) and for AG4 at alignment
46
47
48 262 position 455 (nucleotide position 4982 in strain
49
50
51 263 Hu/GII.9/Alingsas/p1/2009/SWE).

52
53
54 264 These findings suggest that two of the clinical strains (LR13 and
55
56
57 265 LR15) were intragenogroup recombinants between GII.9 and GII.4
58
59
60
61
62
63
64

1
2
3 266 genotypes. In addition, strain AG4 was intergenogroup
4
5
6 267 recombinant between GII.9 and GI.7 genotypes.
7

8 9 269 **4. Discussion**

10
11 270
12
13
14 271 Recombination in RNA viruses is a driving force for evolution,
15
16
17 272 leading to the emergence of new strains. Over the past few years,
18
19
20 273 recombinant NoVs have been reported to cause outbreaks of
21
22
23 274 gastroenteritis in human population [8, 10-13, 15-22,]. Moreover, a
24
25
26 275 novel recombinant strain which first emerged in 2000 in France
27
28
29 276 gradually became predominant and shadowed GGII-4/Lordsdale
30
31
32 277 virus the following years with outbreaks and sporadic cases in
33
34
35 278 Spain, Sweden, and Hungary, [31]. To date more than 25
36
37
38 279 intergenotype and 9 intragenotype recombinations have been
39
40
41 280 reported among NoVs worldwide [8-22], but only one
42
43
44 281 intergenogroup recombinant between GI.3 RdRp and GII.4 capsid
45
46
47 282 gene has been reported [16].

48
49 283 Studies have shown that over the last decade, GII.4 and GII.b
50
51
52 284 were the most common polymerase genotypes circulating
53
54
55 285 worldwide [24]. In most of studies GII.4 was predominant although
56
57
58 286 the relative frequency of GII.4 varied from 27% in Australia [32] to
59
60
61 287 98% in Mexico [33]. In some other countries, other genotypes were

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

288 predominant such as GII.b in Japan and India [12, 34], GII.e in
289 India [16] and GII.12 in Japan and China [11, 35]. On the other
290 hand, capsid-based genotyping data have shown that GII.4 and
291 GII.3 were predominant in most of the countries during the study
292 period, from 2005 until nowadays [24], with a relative frequency of
293 GII.4 genotype ranging from 19% to 100% in Bangladesh and
294 Libya [36, 37] and from 35% to 76% in Japan. For GII.3 genotype,
295 which was the second most dominant genotype in many countries,
296 the relative frequency was 41% in Jordan [38], 46% in China [39]
297 and from 43 to 53% in Japan [11, 12].

298 In this report, we describe the molecular characterization of three
299 Noroviral strains with intergenogroup and intergenotype
300 recombinations, one between GII.9 RdRp and GI.7 capsid gene
301 and two between GII.9 RdRp and GII.4 capsid gene. To our
302 knowledge this is the first time that these novel recombination
303 events are reported.

304 Genetic recombination and mutation in the genome of NoVs is an
305 event that attributes to the genetic diversity of these viruses [40].

306 Presumably NoVs GII.4, GII.9 and GI.7 were circulating in the area
307 without clinical manifestations until recombinations occurred.
308 These events suggest that co-circulation of genetically divergent

1
2
3 309 strains within a small geographical region, may boost up the
4
5
6 310 genomic diversity of NoVs.
7

8
9 311

10 312 **5. Conclusions**

11 313 Our findings shed light on the large capacity for genetic exchanges
12
13 314 and the emergence of new recombinant forms displayed by
14
15 315 Noroviruses. In turn, this elevated potential for recombination
16
17 316 emphasizes the importance for surveillance, in order to detect the
18
19 317 emergence of new recombinant Noroviral strains with altered
20
21 318 properties and better understand the molecular basis of
22
23 319 pathogenicity
24
25
26
27
28
29
30

31 320

32
33
34 321

35 322 **Acknowledgements**

36
37 323 This work was supported by research grants of the Postgraduate
38
39 324 Programmes ‘Applications of Molecular Biology-Genetics.
40
41 325 Diagnostic Biomarkers’, code 3817 and “Biotechnology”, code
42
43 326 3439, of the University of Thessaly, School of Health Sciences,
44
45 327 Department of Biochemistry & Biotechnology.
46
47
48
49
50

51 328

52
53
54 329 All authors declare that they have no conflicting or dual interests.
55
56
57 330

58
59
60 331

332 **References**

333

334 1. Bull RA, Tu, ETV, McIvers CJ. Emergence of a new
335 norovirus genotype II.4 associated with global outbreaks of
336 gastroenteritis. J Clin Microbiol 2006; 44: 327-333.

337 2. Green KY, *Caliciviridae: The noroviruses*, p. 949-979. In B. N.
338 Fields, Knipe DM, Howley P M, Griffin DE, Lamb RA, Martin
339 M A, Roizman B, Straus SE (ed.), *Fields virology*, 5th ed.
340 Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2007.

341 3. Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino
342 FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K.
343 Coexistence of multiple genotypes, including newly identified
344 genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in
345 Japan. J Clin Microbiol , 2004; 42: 2988–2995.

346 4. Zheng DP, Ando T, Fankhauser, RL, Beard RS, Glass RI,
347 Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain
348 nomenclature. Virology 2006; 346(2), 312-23.

349 5. Martella V, Decaro N, Lorusso E, Radogna A, Moschidou P,
350 Amorisco F, Lucente MS, Desario C, Mari V, Elia G, Banyai
351 K, Carmichael LE, Buonavoglia. Genetic heterogeneity and
352 recombination in canine noroviruses. CJ Virol 2009;
353 83(21):11391-6.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 354 6. Hirst GK. Genetic recombination with Newcastle disease
355 virus, polioviruses and influenza virus. Cold Spring Harb
356 Symp Quant Biol. 1962;27:303-9.
- 357 7. Suzuki Y, Gojobori T, Nakagomi O, Intragenic recombinations
358 in rotaviruses. FEBS Lett. 1998; 427 (2): 183-187.
- 359 8. Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T,
360 Hoshino F, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y,
361 Gojobori T, Takeda N. Phylogenetic analysis of the complete
362 genome of 18 Norwalk-like viruses. Virol. 2002; 299: 225-239.
- 363 9. Han MG, Smiley JR, Thomas C, Saif LJ. Genetic
364 recombination between two genotypes of genogroup III
365 bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity
366 among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses.
367 J Clin Microbiol 2004; 42: 5214-5224.
- 368 10. Rohayem J, Munch J, Rethwilm A. Evidence of
369 recombination in the norovirus capsid gene. J Virology 2005;
370 79: 4977-4990.
- 371 11. Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S,
372 Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F,
373 Okitsu S, Muller WE, Maneekarn N, Ushijima H. Changing
374 distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of

- 1
2
3 375 recombinant GIIb among infants and children with diarrhea in
4
5
6 376 Japan. *J Med Virol* 2006; 78: 971-978.
7
8
9 377 12. Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S,
10
11 378 Yamamoto A, Sugita K, Takanashi S, Okitsu S, Ushijima H.
12
13 379 Genetic heterogeneity, evolution and recombination in
14
15 380 noroviruses. *J Med Virol* 2007; 79: 1388-1400.
16
17 381 13. Etherington GJ, Dicks J, Roberts IN. High throughput
18
19 382 sequence analysis reveals hitherto unreported recombination
20
21 383 in the genus Norovirus. *Virology* 2006; 345: 88-95.
22
23
24
25 384 14. Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J.*
26
27
28 385 *Gen. Virol.* 2007; 88: 3347-3359.
29
30
31 386 15. Nayak MK, Balasubramanian G, Sahoo GC, Bhattacharva R,
32
33
34 387 Vinje J, Kobayashi N, Sarkar MC, Bhattacharya MK, Krishnan
35
36
37 388 T. Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus
38
39
40 389 from Kolkata, India. *Virology* 2008; 377: 117-123.
41
42
43 390 16. Nayak MK, Chatterjee D, Nataraju SM, Pativada M, Mitra U,
44
45
46 391 Chatterjee MK, Saha TK, Sarkar U, Krishnan T. A new variant
47
48
49 392 of Norovirus GII/2007 and inter-genotype recombinant strains
50
51
52 393 of NVGII causing acute watery diarrhea among children in
53
54
55 394 Kolkata, India. *J Clin Virol* 2009; 45: 223-229.
56
57
58 395 17. Nakamura K, Iwai M, Zhang J, Obara M, Horimoto E,
59
60
61 396 Hasegawa S, Kurata T, Takizawa T. Detection of a novel

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
- 397 recombinant norovirus from sewage water in Toyama
398 prefecture, Japan. *J Infect Dis* 2009; 62,:394-398.
- 399 18. Chhabra P, Walimbe AM, Chitambar SD. Molecular
400 characterization of three novel intergenotype norovirus GII
401 recombinant strains from western India. *J. Vir. Res.* 2010;
402 147: 242-246.
- 403 19. Dey SK, Phan TG, Mizuquchia M, Okitsua S, Ushijima H.
404 Novel recombinant norovirus in Japan. *Virus Genes* 2010; 40:
405 362-364.
- 406 20. Ruether IG, Tsakogiannis D, Pliaka V, Kyriakopoulou Z,
407 Krikelis A, Gartzonika C, Leveidiotou-Stefanou S,
408 Markoulatos P. Molecular characterization of a new
409 intergenotype Norovirus GII recombinant. *Virus Genes* 2011;
410 44(2): 237-43.
- 411 21. Fonager J, Barzinci S, Fischer T. Emergence of a new
412 recombinant Sydney 2012 norovirus variant in Denmark, 26
413 December 2012 to 22 March 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18,
414 (25).
- 415 22. Chan MC, Chan PK. Complete Genome Sequence of a
416 Novel Recombinant Human Norovirus Genogroup II
417 Genotype 4 Strain Associated with an Epidemic during

1
2
3 418 Summer of 2012 in Hong Kong. *Genome Announc.*, 2013;
4
5
6 419 1(1).

7
8
9 420 23. Ike AC, Brockmann SO, Hartelt K, Marschang RE, Contzen
10
11 421 M, Oehme RM. Molecular epidemiology of norovirus in
12
13 422 outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany from 2001
14
15 423 to 2004. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:1262–1267.

16
17 424 24. Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi
18
19
20 425 O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with
21
22 426 acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution
23
24
25 427 of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J Clin Virol*
26
27
28 428 2013; 56: 185-193

29
30
31 429 25. Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK,
32
33
34 430 Seto, Y, Monroe SS, Glass RI. Correlation of patient immune
35
36
37 431 responses with genetically characterized small round-
38
39
40 432 structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute
41
42
43 433 gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *Med Virol*
44
45
46 434 1997; 53(4): 372-83.

47
48 435 26. Wang J, Jiang X, Madore HP, Gray J, Desselberger U, Ando
49
50
51 436 T, Seto Y, Oishi I, Lew JF, Green KY. Sequence diversity of
52
53
54 437 small, round-structured viruses in the Norwalk virus group. *J*
55
56
57 438 *Virol* 1994; 68(9):5982-90.

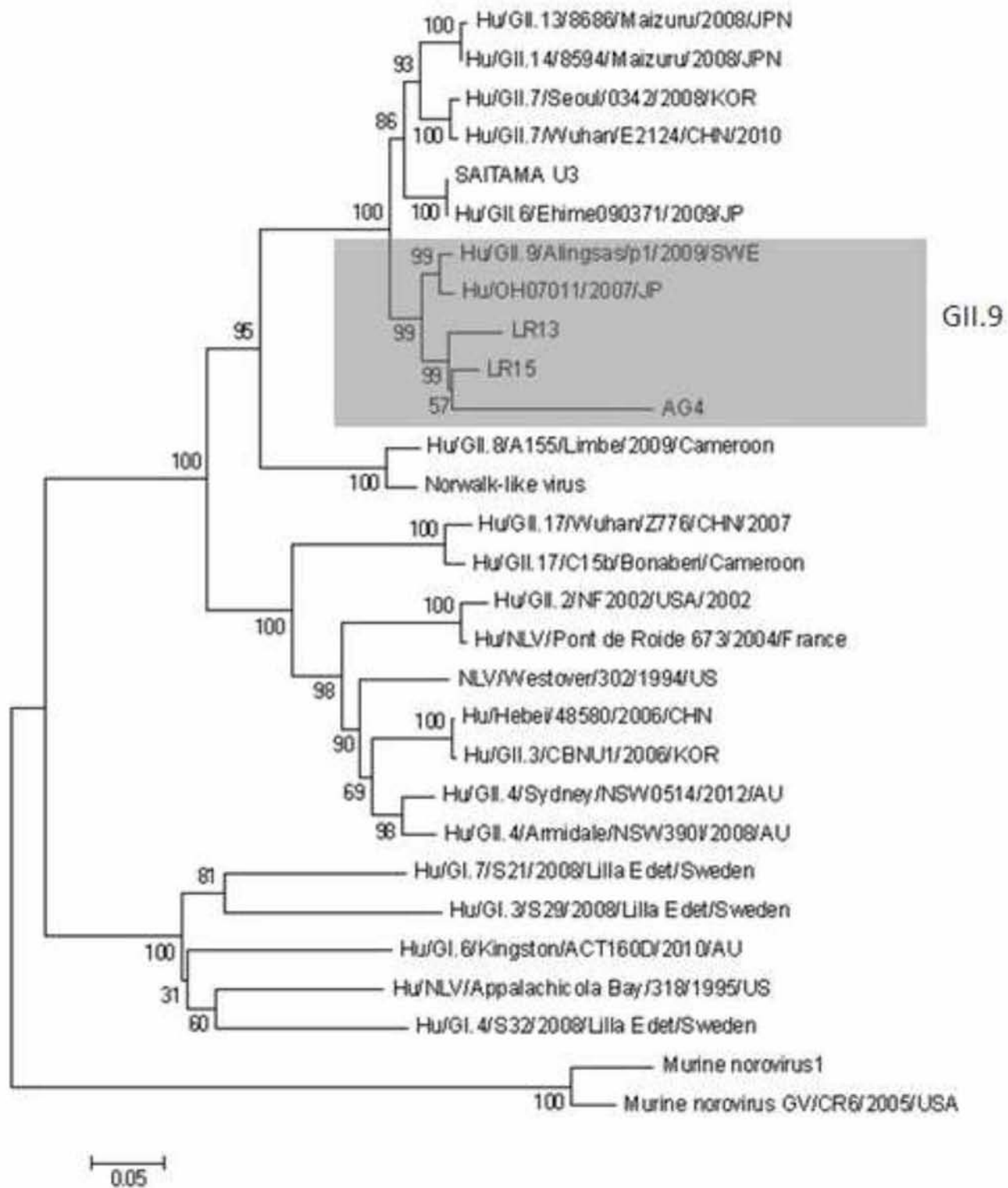
- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 439 27. Ruether IG, Tsakogiannis D, Kyriakopoulou Z, Dimitriou TG,
440 Papamichail C, Gartzonika C, Leveidiotou-Stefanou S,
441 Markoulatos P. Circulation of intergenotype recombinant
442 noroviruses GII.9/GII.6 from 2006 to 2011 in central Greece.
443 *Virus Genes* 2013; DOI 10.1007/s11262-013-0994-z.
- 444 28. Schultz AC, Vega E, Dalsgaard A, Christensen LS, Nørrung
445 B, Hoorfar J, Vinjé J Development and evaluation of novel
446 one-step TaqMan realtime RT-PCR assays for the detection
447 and direct genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J*
448 *Clin Virol* 2011;50(3):230-4.
- 449 29. Green J, Henshilwood K, Gallimore CI, Brown DW, Lees
450 DN., 1998. A nested reverse transcriptase PCR assay for
451 detection of small round-structured viruses in environmentally
452 contaminated molluscan shellfish. *Appl Environ Microbiol*
453 1998;64(3):858-63.
- 454 30. Ambert-Balay K, Bon F, Guyader FL, Pothier P, Kohli E.
455 Characterization of a new recombinant Noroviruses. *J Clin*
456 *Microbiol* 2005; 43(10): 5179-86.
- 457 31. Reuter G, Vennema H, Koopmans M, Szücs GJ. Epidemic
458 spread of recombinant noroviruses with four capsid types in
459 Hungary. *Clin Virol* 2006; 35(1): 84-8.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 460 32. Tan M, Hegde RS, Jiang X. The P domain of norovirus
461 capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group
462 antigen receptors. *J Virol* 2004;78:6233-42.
- 463 33. Gomez-Santiago F, Ribas-Aparicio RM, Garcia-Lozano H.
464 Molecular characterization of human calicivirus associated
465 with acute diarrheal disease in Mexican children. *Virol J*
466 2012;9:54.
- 467 34. Chhabra, P, Drongade RK, Kalrao VR, Bavdekar AR,
468 Chitambar SD. Epidemiological, clinical and molecular
469 features of norovirus infections in western India. *J Med Virol*
470 2009; 81:922-32.
- 471 35. Guo L, Song J, Xu X, Ren L, Li J, Zhou H. Genetic analysis
472 of norovirus in children affected with acute gastroenteritis in
473 Beijing, 2004-2007. *J Clin Virol* 2009;44:94-8.
- 474 36. Abugalia M, Cuevas L, Kirby A, Dove W, Nakagomi O,
475 Nakagomi T. Clinical features and molecular epidemiology of
476 rotavirus and norovirus infections in Libyan children. *J Med*
477 *Virol* 2011; 83:1849-56.
- 478 37. Dey SK, Nguyen TA, Phan TG, Nishio O, Salim AF, Rahman
479 M. Molecular and epidemiological trend of norovirus
480 associated gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *J Clin*
481 *Virol* 2007;40:218-23.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 482 38. Kaplan NM, Kirby A, Abd-Eldayem SA, Dove W, Nakagomi
483 T, Nakagomi O. Detection and molecular characterization of
484 rotavirus and norovirus infections in Jordanian children with
485 acute gastroenteritis. *Arch Virol* 2011;156: 1477-80.
- 486 39. Zhang S, Chen T-H, Wang J, Dong C, Pan J, Moe C.
487 Symptomatic and asymptomatic infections of rotavirus,
488 norovirus and adenovirus among hospitalized children in Xi'
489 an, China. *J Med Virol* 2011;83: 1476-84.
- 490 40. Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der
491 Veer B, Siezen RJ. Epochal evolution of GGII.4 norovirus
492 capsid proteins from 1995-2006. *J Virol* 2007;81(18): 9932-
493 41.
494

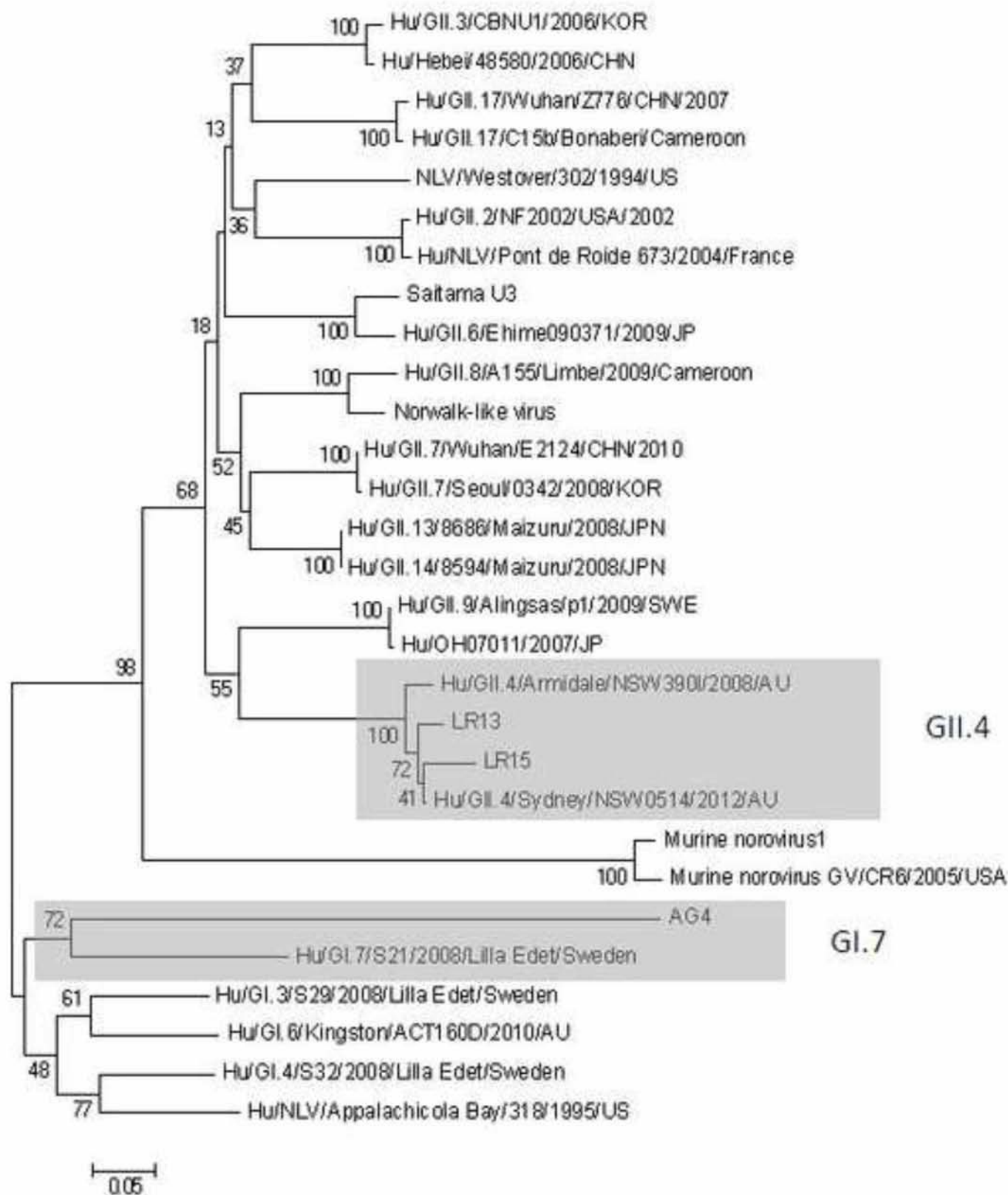
Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Figure

[Click here to download high resolution image](#)

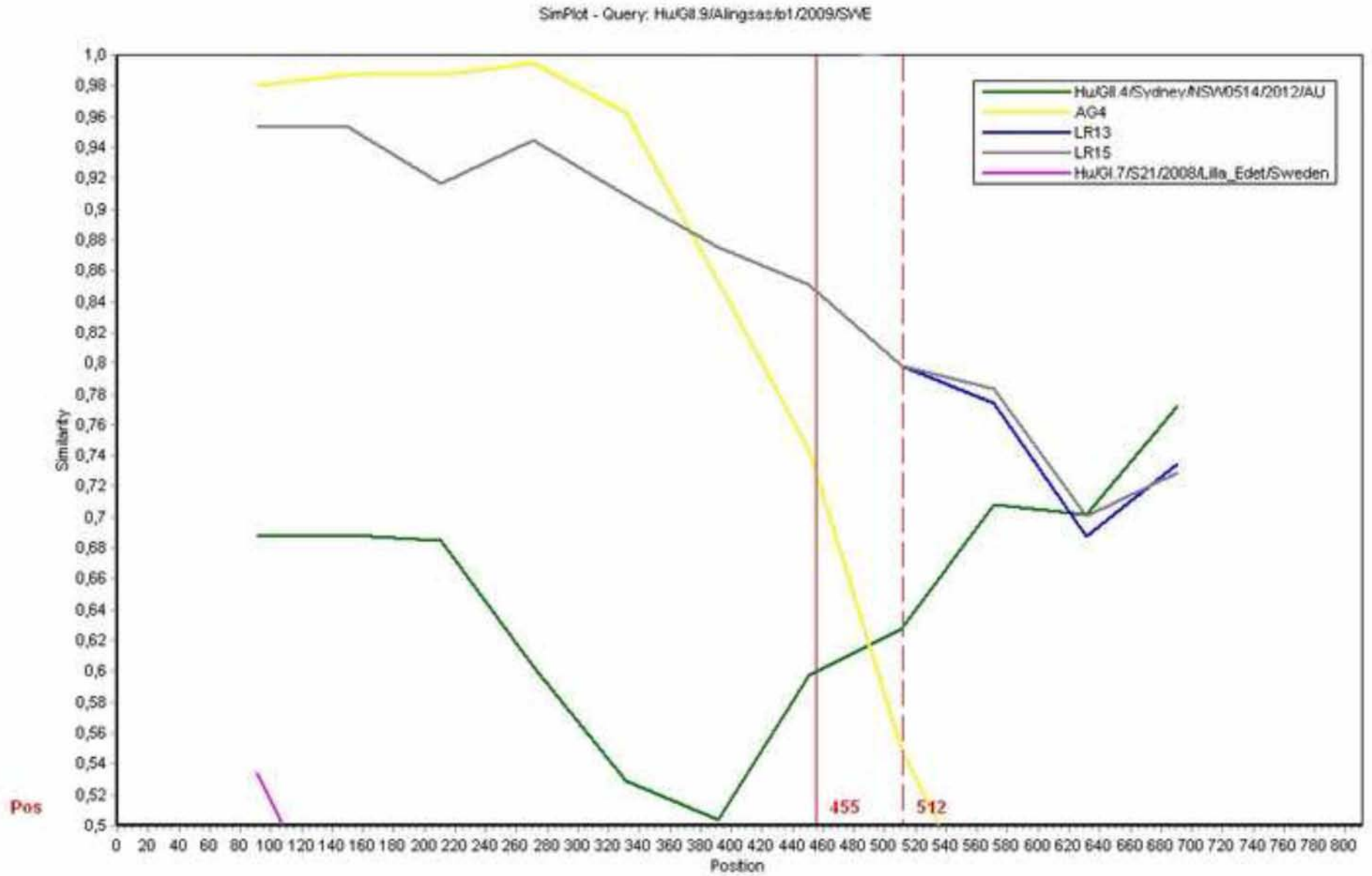


Fig. 1 Phylogenetic tree construct based on partial sequences of the ORF1 open reading frame of NoVs. The analysis was performed using MegAlign, version 5.1 (BETA3). The distance was calculated by the neighbor-joining method. Numbers at each branch indicate bootstrap values for the clusters supported by that branch.

Fig. 2 Phylogenetic tree construct based on partial sequences of the ORF2 open reading frame of NoVs. The analysis was performed using MegAlign, version 5.1 (BETA3). The distance was calculated by the neighbor-joining method. Numbers at each branch indicate bootstrap values for the clusters supported by that branch.

Fig. 3 SimPlot analysis for partial RdRp and capsid sequences. First vertical red line indicates the crossover point at position 4982 in the ORF1/ORF2 junction for strain AG4; the second vertical red line indicates the crossover point at position 5039 in the ORF1/ORF2 junction for strains LR13 and LR15. The window size was 180 bp with a step size of 60bp. The vertical axis indicates the nucleotide identities between the query sequences (AG4, LR13 and LR15) and the strains (listed on the window on the right of the figure), expressed as percentages. The horizontal axis indicates the nucleotide positions of the investigated genome region.

1 Emergence of a novel norovirus genotype II.4 variant associated with viral
2 gastroenteritis in Greece

3
4
5
6
7
8 5 I.G.A. Ruether¹, Z. Kyriakopoulou¹, T.G. Dimitriou¹, D. Tsakogiannis¹, V. Soukia¹,
9 6 C.Gartzonika², S.Leveidiotou-Stefanou², P. Markoulatos^{1*}.

10
11
12
13
14
15
16 9 1) University of Thessaly, School of Health Sciences, Department of Biochemistry
17 10 & Biotechnology, Microbiology-Virology Laboratory, Larissa , Greece

18
19 11 2) University of Ioannina, Medical School, Department of Microbiology, Ioannina,
20 12 Greece

21
22
23
24
25
26
27
28
29 16 *Corresponding Author: Professor P. Markoulatos

30
31 17 University of Thessaly, School of Health Sciences

32
33 18 Department of Biochemistry & Biotechnology

34
35 19 Ploutonos 26 & Aiolou

36
37 20 41221 Larissa, Greece

38
39 21 Tel.: +302410 565274, Fax: +302410 565294

40
41 22 E-Mail: markoulatos@bio.uth.gr

30 **Abstract**

31

32 Noroviruses are considered as the major cause of epidemic and sporadic
33 non-bacterial acute gastroenteritis. In this report a novel strain was detected
34 in clinical sample AK1 belonging to GII.4 genocluster. Phylogenetic analysis
35 classified AK1 strain as GII.4 genotype, forming clearly a new cluster at the
36 nucleotide level, according to BLAST clustering.

37

38

39 **Keywords:** Noroviruses; GII.4-2013; Gastroenteritis; Greece.

40

41

42

43

44

45

46

47 Noroviruses constitute a large group of small round structured viruses
48 belonging to the *Calicivirus* family with a positive sense single-stranded RNA
49 genome, of 7.5–7.7kb, consisting of three open reading frames (ORFs),
50 ORF1, ORF2 (Siebenga, 2007) and ORF3, (Bertolotti-Ciarlet, 2003). NoVs
51 are genetically diverse, containing six genogroups GI to GVI (Martella, 2009).
52 Each genogroup is further subdivided into different genotypes including eight
53 genotypes of GI, nineteen genotypes of GII, of which GII.4 is the predominant
54 one causing the majority of outbreaks and sporadic infections worldwide (Hoa

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55 Tran, 2013), two genotypes of GIII and one genotype each for GIV, GV and
56 GVI, (Martella, 2009).

57 Over the past 25 years GII.4 cluster was implicated in many Noroviral
58 outbreaks worldwide, (Donaldson, 2008). Analyses of the phylogenetic trees
59 for GII.4 NoVs revealed that GII.4 NoVs evolved via epochal evolution,
60 followed by bursts of evolution alternated by more stasis, (Siebenga, 2007;
61 Lindesmith, 2008). Interestingly, modern clusters appear to be evolving more
62 rapidly, giving rise to antigenically novel clusters every 2–3 years,
63 (Donaldson, 2008).

64 In this report a nucleotide sequence (AK1) of a novel strain was detected in
65 clinical sample, belonging to GII.4 genocluster. Stool specimen was collected
66 in January 2013 in the University Hospital of Ioannina, Greece from a 2-year-
67 old female child suffering from typical clinical symptoms of viral
68 gastroenteritis. The stool specimen was diluted into 10ml of complete solution
69 of phosphate-buffered saline PBS and homogenized by vortexing. Viral RNA
70 was extracted from 140µl of the supernatant using the QIAamp®Viral RNA
71 MiniKit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Germany).Five
72 µl of RNA were subjected to cDNA synthesis by Reverse Transcriptase M-
73 MLV (200units/µl, Invitrogen, UK), according to the manufacturer's
74 instructions, using random primers (dN9), (Takara Biomedical group, Shiga,
75 Japan), (50nmol/µl).Three µl of each cDNA were used in subsequent PCR
76 assays.

77 Initially PCR was carried out using the published primer pair MON381-383
78 for GII genogroup (Noel, 1997) and P78-P80 for GI genogroup (Wang, 1994).
79 The sample was positive for GII genogroup.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

80 To screen for recombinant NoVs, already published specific primers P290-
81 G2SKR (Schultz, 2011) were used. This primer pair was located in highly
82 conserved regions of the viral genome and covers the usual recombination
83 point ORF1/ORF2, (Ambert-Balay, 2005), (from nucleotides 4295 to 5389,
84 strain Hu/NLV/GII/MD145-12/1987/US, accession no [AY032605](#)).

85 Three μl of the reverse transcription product were used for subsequent
86 PCR assays in a total volume of $50\mu\text{l}$ containing 10x PCR buffer, 2mM MgCl_2 ,
87 10mM dNTPs, 0.5 μl of Paq DNA polymerase (Stratagene), (5U/ μl) and
88 50pmol of each primer pair. After an initial denaturation step at 95°C for 2min,
89 25 amplification cycles (denaturation at 95°C for 30s, annealing temperature
90 60°C for 20s and extension at 72°C for 30s) were performed followed by a
91 final extension step at 72°C for 5min. Auto Nested PCR was performed for 40
92 cycles, in the same conditions, to further increase the sensitivity of the assay,
93 (Green, 1998). The amplification of a single PCR fragment from polymerase
94 to capsid eliminates the risk of co-infection with different NoV genogroups and
95 covers the usual recombination point (ORF1/ORF2).

96 PCR amplicons were purified using the QIAquick[®]Gel Extraction Kit
97 (Qiagen, Germany) and amplicons from two distinct PCR assays were cloned
98 into the TOPO[®]TA Cloning Kit (Invitrogen, USA), according to the
99 manufacturer's instructions. Three clones from each individual amplicon were
100 sequenced bidirectionally at CEMIA (Larissa, Greece). Sequence identity was
101 determined through BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>). The sequence was
102 submitted to GenBank under the accession number KF890177.

103 Initially the nucleotide sequence of the 3' end of the RdRp gene and the
104 5' part of the capsid gene of the Noroviral strain were separately applied for

105 the construction of the phylogenetic trees in order to screen for recombinants.
106 Multiple alignments of NoVs were generated by ClustalW
107 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) and the phylogenetic trees were
108 constructed by the neighbor-joining method with 1000 bootstrap replicates in
109 the multiple alignment program MEGA 4.1. Since no recombination was
110 found, the entire nucleotide sequence was used, with the same alignments,
111 for the construction of the phylogenetic tree with all GII.4 available sequences
112 of which GII.4 genotype was the most genetically close according to BLAST
113 clustering. Genotyping was also confirmed using the NoV genotyping tool
114 (version 1.0),(Kroneman, 2011), which revealed similar results.

115 BLAST results using the AK1 nucleotide sequence as query showed that
116 the top three sequences with highest similarity were
117 Hu/GII.4/C00007952/2011/UK, Hu/GII.4/C00007905/2011/UK and
118 Hu/GII.4/C00007893/2011/UK (query coverage=98% and maximum
119 identity=97%). Two ORFs were included spanning nucleotides 4295–5104
120 and 5085–5370, respectively. ORF1 and ORF2 had an overlap of more than
121 15 nucleotides (nt 5,085–5,104).

122 Phylogenetic analysis based on the partial genome, was performed, (Fig.1)
123 and AK1 strain was classified as GII.4 genotype most closely related to
124 Hu/GII.4/C00007952/2011/UK, but forming a new cluster. Thus, the novel
125 cluster was named AK1/GII.4-2013.

126 GII.4 genotype was initially recognized in the mid-1990s, (Noel, 1999).
127 During 1996, strain US95/96 was responsible for 85% of the Noroviral
128 outbreaks in the Netherlands and approximately in 60% of the outbreaks in
129 United States, (Vinjé, 1997). Between 2000 and 2004, US95/96 was replaced

130 by two new GII.4 variants. In United States, Farmington Hills strain
131 (Widdowson, 2004) was associated with approximately 80% of acute
132 gastroenteritis outbreaks of Noroviral origine and at the same time in Europe,
133 a new GII.4 variant, GII.4b, emerged and caused outbreaks, (Lopman, 2004).
134 In 2004, the Hunter GII.4 variant was detected in Australia, Europe, and Asia,
135 (Bull, 2006). This strain was replaced in early 2006 by two new cocirculating
136 GII.4 variants in United States, Europe, and Asia and from 2006 and onwards
137 became the predominant circulating strain in many countries including China,
138 India, Japan, Korea, Vietnam, Egypt, Turkey and Italy,(Rimoldi, 2011).

139 In this report a novel strain was detected in clinical sample AK1 belonging
140 to GII.4 genocluster. Phylogenetic analysis, classified AK1 strain as GII.4
141 genotype but forming clearly a new cluster with the most genetically close
142 viral strains (Hu/GII.4/C00007952/2011/UK,Hu/GII.4/C00007905/2011/UK and
143 Hu/GII.4/C00007893/2011/UK, query coverage=98% and maximum
144 identity=97%), according to BLAST clustering, at the nucleotide level.

145 The results of the present report put forward that AK1/GII.4-2013 is the first
146 NoV variant characterized in Greece and may be used further for phylogenetic
147 studies on NoVs circulation.

148
149 Fig. 1 Phylogenetic tree construct based on partial sequences of the
150 ORF1and ORF2 open reading frames of NoVs. The analysis was performed
151 using MegAlign, version 5.1 (BETA3). The distance was calculated by the
152 neighbor-joining method. Numbers at each branch indicate bootstrap values
153 for the clusters supported by that branch.

154

155 **Acknowledgments.** This work was supported by research Grants of the
156 Postgraduate Programmes “Applications of Molecular Biology- Genetics. Diagnostic
157 Biomarkers,” code 3817 and “Biotechnology,” code 3439, of the University of
158 Thessaly, School of Health Sciences, Department of Biochemistry & Biotechnology.

159
160

161 **Conflict of interest.** All authors declare that they have no conflicting or dual
162 interests.

163

164 **References**

165

166 Ambert-Balay K, Bon F, Le Guyader F, Pothier P, Kohli E. Characterization of
167 new recombinant noroviruses. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):5179-86.

168 Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' end of
169 Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression
170 and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2
171 protein. *J Virol.* 2003;77(21):11603-15.

172 Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new
173 norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of
174 gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):327-33.

175 Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Norovirus pathogenesis:
176 mechanisms of persistence and immune evasion in human populations.
177 *Immunol Rev.* 2008;225:190-211.

178 Green J, Henshilwood K, Gallimore CI, Brown DW, Lees DN. A nested
179 reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured
180 viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl Environ*
181 *Microbiol.* 1998;64(3):858-63.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

182 Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O. Molecular
183 epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis
184 in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants.
185 J Clin Virol. 2013;56(3):185-93.

186 Kroneman A, Vennema H, Deforche K, v d Avoort H, Peñaranda S, Oberste
187 MS, Vinjé J, Koopmans M. An automated genotyping tool for enteroviruses
188 and noroviruses. J Clin Virol. 2011;51(2):121-5.

189 Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J,
190 Baric RS. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human
191 populations. PLoS Med. 2008 ;5(2):e31.

192 Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. Clinical
193 manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. Clin Infect
194 Dis. 2004;39(3):318-24.

195 Martella V, Decaro N, Lorusso E, Radogna A, Moschidou P, Amorisco F,
196 Lucente MS, Desario C, Mari V, Elia G, Banyai K, Carmichael LE,
197 Buonavoglia C. Genetic heterogeneity and recombination in canine
198 noroviruses. J Virol. 2009;83(21):11391-6.

199 Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK, Seto Y, Monroe
200 SS, Glass RI. Correlation of patient immune responses with genetically
201 characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of
202 nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. J Med
203 Virol. 1997;53(4):372-83.

204 Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. Identification of a
205 distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution.
206 J Infect Dis. 1999;179(6):1334-44.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

207 Rimoldi SG, Stefani F, Pagani C, Chenal LL, Zanchetta N, Di Bartolo I,
208 Lombardi A, Ruggeri FM, Di Lillo D, Zuccotti GV, Gismondo MR.
209 Epidemiological and clinical characteristics of pediatric gastroenteritis
210 associated with new viral agents. *Arch Virol.* 2011;156(9):1583-9.

211 Schultz AC, Vega E, Dalsgaard A, Christensen LS, Nørrung B, Hoorfar J,
212 Vinjé J. Development and evaluation of novel one-step TaqMan realtime
213 RT-PCR assays for the detection and direct genotyping of genogroup I and
214 II noroviruses. *J Clin Virol.* 2011;50(3):230-4.

215 Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen
216 RJ, Koopmans M. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins
217 from 1995 to 2006. *J Virol.* 2007;81(18):9932-41.

218 Vinjé J, Altena SA, Koopmans MP. The incidence and genetic variability of
219 small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The
220 Netherlands. *J Infect Dis.* 1997;176(5):1374-8.

221 Wang J, Jiang X, Madore HP, Gray J, Desselberger U, Ando T, Seto Y, Oishi
222 I, Lew JF, Green KY, et al. Sequence diversity of small, round-structured
223 viruses in the Norwalk virus group. *J Virol.* 1994;68(9):5982-90.

224 Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, Bulens SN,
225 Charles M, Chege W, Isakbaeva E, Wright JG, Mintz E, Forney D, Massey
226 J, Glass RI, Monroe SS. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships
227 and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus--
228 United States, 2002. *J Infect Dis.* 2004;190(1):27-36.

229

