

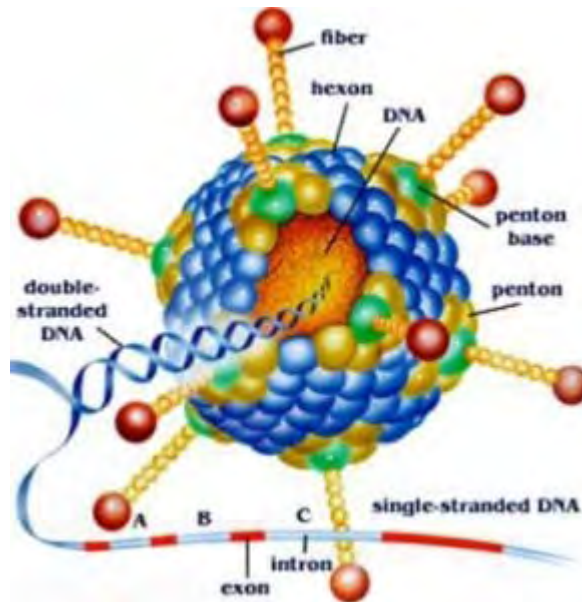
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΤΣΑΤΣΟΥ

Μεταπτυχιακή διατριβή

“ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΙΚΩΝ ΑΔΕΝΟΙΩΝ ΣΤΟ ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ”



ΛΑΡΙΣΑ 2011

«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΙΚΩΝ ΑΔΕΝΟΙΩΝ ΣΤΟ ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ»

ΛΑΡΙΣΑ 2011

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

κ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

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

κ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΟΣΙΑΛΟΣ

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

κ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ

Επίκουρος καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

*Στον παππού μου Κωνσταντίνο,
και στους γονείς μου
Βασίλειο και Μαρία*

Νοιώθω υποχρέωση μου να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή μου κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την ανάθεση σε εμένα αυτού του πρωτότυπου θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου, Ειρήνη Ρούτερ και Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα, για την απεριόριστη υπομονή που έδειξαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα αλλά και τις χρήσιμες συμβουλές που μου έδωσαν. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Βασίλειο και Μαρία Τσάτσου, αλλά και τον αδερφό μου Αλέξανδρο Τσάτσο για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και κατανόηση, που μου έδειξαν όλο αυτό τον καιρό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

1.1 Ιστορικό.....	8
1.2 Πόσιμο νερό.....	8
1.2.1 Εκτίμηση Ποιότητας νερού.....	10
1.2.2 Κατανομή νερού και βοθρολύματα.....	11
1.3 Αδενοιοί.....	13
1.3.1 Ταξινόμηση των αδενοϊών.....	14
1.3.2 Δομή καψιδίου.....	17
1.3.3 Δομή γενώματος.....	20
1.4 Κύκλος ζωής των αδενοϊών.....	21
1.5 Παθογένεια & Κλινικά συμπτώματα.....	24
1.6 Επιδημιολογία.....	25
1.7 Ανίχνευση.....	26
1.7.1 Η κινητική της PCR.....	30
1.7.1.1 Οι πρώιμοι κύκλοι.....	30
1.7.1.2 Mispriming.....	30
1.7.1.3 Κύκλοι M.....	31
1.7.1.4 Κύκλοι L και η φάση Plateau.....	32
1.7.2 Είδη PCR.....	33
1.7.2.1 Multiplex PCR.....	33
1.7.2.2 Nested PCR.....	34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

2.1 Πρότυπα στελέχη – Θετικοί μάρτυρες.....	35
2.2 Περιβαλλοντικά δείγματα.....	35
2.3 Συγκέντρωση δειγμάτων πόσιμου νερού.....	37
2.3.1 Μέθοδος προσρόφησης – έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα.....	37
2.4. Εκχύλιση ιικού DNA.....	38

2.5 Εκκινητικά μόρια.....	39
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR.....	40
2.7 Nested PCR & Autonested PCR.....	41
2.8 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR.....	42
2.9 Καθαρισμός των προϊόντων.....	43
2.10 Κλωνοποίηση.....	44
2.10.1 Autonested GoTaq PCR.....	44
2.10.1.1 Αντίδραση λιγάσης – Κλωνοποίηση σε φορέα.....	44
2.10.1.2 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων με χρήση.....	46
2.10.1.3 Μετασχηματισμός.....	46
2.10.1.4 Πέψη με EcoRI.....	48
2.10.1.5 Επεξεργασία νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

3.1 Προσρόφηση από ηλεκτραρνητικά φίλτρα.....	50
3.2 Ανίχνευση.....	50

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

4.1 Συζήτηση.....	53
Βιβλιογραφία.....	55

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Το νερό στις μέρες μας θεωρείται πολύτιμο. Εξίσου πολύτιμοι είναι και οι άνθρωποι που το καταναλώνουν. Για τον λόγο αυτό πρέπει η κατανάλωση του να είναι ασφαλής δηλαδή να έχει ελαχιστοποιήσει τις πιθανότητες ύπαρξης παθογόνων μικροοργανισμών. Οι κυριότερες ασθένειες προέρχονται από παθογόνους μικροοργανισμούς οι οποίοι μεταφέρθηκαν στον ανθρώπινο οργανισμό από την κατανάλωση του νερού. Μολυσμένο νερό το οποίο χρησιμοποιείται στην προετοιμασία φαγητού, μπορεί να είναι μια μολυσματική πηγή για τον οργανισμό μας. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, προβλήματα διάρροιας αριθμούνται στο 4,1% του παγκόσμιου καθημερινού φορτίου φαγητού και ευθύνονται για θανάτους που ανέρχονται στο 1,8 εκ. ανθρώπων τον χρόνο. Έχει εκτιμηθεί ότι το 88% αυτού του φορτίου αποδίδεται στη μη ασφαλή προμήθεια νερού. Το εντονότερο πρόβλημα επικεντρώνεται στα παιδιά των αναπτυσσόμενων χωρών. Οι ασθένειες αυτές μπορεί να προκαλούνται από πρωτόζωα, ιούς και βακτήρια.

1.2 ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ.

Η ποιότητα του πόσιμου νερού είναι ένας καθοριστικός παράγων σε ότι αφορά την ανθρώπινη υγεία. Σημαντικό ρόλο καταλαμβάνει η ποιοτική διαχείριση του πόσιμου νερού που είναι και ο στυλοβάτης της πρόληψης για περισσότερο από ενάμιση αιώνα και συνεχίζει να είναι η βάση για την πρόληψη και τον έλεγχο των προερχομένων από το νερό ασθενειών. Το νερό είναι μείζονος σημασίας για τη ζωή αλλά και η ύπαρξη του με τη σειρά του το καθιστά ικανό να επιφέρει μεγάλους κινδύνους καθώς μπορεί να μεταδώσει ασθένειες από χώρα σε χώρα, σε όλες τις ηπείρους και από τον φτωχότερο στον πλουσιότερο χωρίς διακρίσεις (Feijadi et al.2010). Η πιο διαδεδομένη ασθένεια που προέρχεται από το νερό είναι η διάρροια και εκτιμάται να έχει μια ετήσια επίπτωση της τάξεως των 4,6 δισεκατομμυρίων επεισοδίων και προκαλεί 2,2 εκατομμύρια θανάτους σε ετήσια βάση. Η έκθεση εκατομμυρίων ανθρώπων σε ασφαλή επίπεδα χημικών μολυσματικών παραγόντων στο πόσιμο νερό τους μπορεί να συνδεθεί με έλλειψη σωστής διαχείρισης των αστικών και

βιομηχανικών λυμάτων. Επίσης η χρήση του νερού στη γεωργία ενδεχομένως να δίνει την αφορμή για μια μακροχρόνια έκθεση στους ρύπους οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν μια σειρά από σοβαρές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Τέλος μπορεί το νερό να είναι συνδεδεμένο με αρσενικό και φθόριο με αποτέλεσμα να δύναται να προκαλέσει στον άνθρωπο καρκινογένεση καθώς και καταστροφή των δοντιών αλλά και των οστών αντιστοίχως.

Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας ιδρύθηκε το 1948 με απώτερο σκοπό την προώθηση της επίτευξης του υψηλότερου ποιοτικού επιπέδου ζωής για όλους τους ανθρώπους. Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας έχει ένα μεγάλο εύρος λειτουργιών που περιλαμβάνει την βελτίωση της διατροφής, της κατοικίας, τις συνθήκες εργασίας και άλλους παράγοντες του υγιεινού περιβάλλοντος. Ένας από τους κύριους ρόλους είναι να εγκαθιδρύσει κανόνες για την προστασία της ανθρώπινης υγείας. Από το 1958 η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας σαν μέρος των δραστηριοτήτων της αναφορικά με το πόσιμο νερό και την ανθρώπινη υγεία δημοσίευσε - μια μελέτη 10 ετών περίπου - με Διεθνή Πρότυπα για το πόσιμο νερό και στη συνέχεια εξέδωσε οδηγίες για το Πόσιμο νερό-Ποιότητα Νερού. Η ικανότητα των μέτρων της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας να εξαλείψουν τις ασθένειες στοχεύουν στο να απομακρύνουν το μικροβιακό φορτίο για την καταλληλότητα του πόσιμου νερού. Η πρωταρχική προτεραιότητα της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας είναι ένας μεγάλος αριθμός νοικοκυριών με χαμηλό εισόδημα να φτάσει σε ένα αναπτυγμένο και βιώσιμο επίπεδο καταλληλότητας πόσιμου νερού.

Σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης όταν τα συμβατικά συστήματα επεξεργασίας νερού δεν μπορούν να απομακρύνουν τα παθογόνα μικρόβια από το νερό τότε επιβάλλεται ο βρασμός ώστε να θανατωθούν τα παθογόνα μικρόβια. Αυτό είναι κάτι που χρειάζεται μεγάλες ποσότητες καυσίμου και θεωρείται ζημιογόνο για τους καταναλωτές. Η αποθήκευση βρασμένου νερού σε ασηπτικές συνθήκες θεωρείται ως ο πιο δύσκολος τρόπος διατήρησης νερού και δεν θεωρείται ο ιδανικότερος και αποτελεσματικότερος τρόπος για την θανάτωση μικροβίων όπως *Cryptosporidium* και *Clostridium*.

Άλλες τεχνικές όπως φιλτράρισμα, χημική απολύμανση, χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) έχουν χρησιμοποιηθεί ώστε να μειώσουν σημαντικά το βακτηριακό φορτίο του νερού.

Οι έλεγχοι που γίνονται μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες: τις χημικές /φυσικές και τις μικροβιολογικές. Στις χημικές/ φυσικές αναλύσεις εντάσσονται οι ανιχνεύσεις βαρέων μετάλλων, οργανικών ενώσεων, το σύνολο των οργανικών υπολειμμάτων και η μέτρηση της θολερότητας. Στις μικροβιολογικές αναλύσεις εντάσσονται η ανίχνευση κολοβακτηριδίων,

Escherichia coli , εντερικοί ιοί , πρωτόζωα και παράσιτα. Συγκεντρώσεις περιττωμάτων εντοπίζονται από την παρουσία κολοβακτηρίων, τα οποία θεωρούνται ως κατάλληλος δείκτης επιβλαβών παθογόνων στο πόσιμο νερό. Η παρουσία κολοβακτηρίων στα ανθρώπινα περιττώματα λειτουργεί σαν δείκτης περιεκτικότητας παθογόνων μικροβίων . Επιπροσθέτως ανιχνεύονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις πρωτόζωα όπως *Cryptosporidium* sp., *Giardia* *Lambli*a, *Legionella* και εντερικοί ιοί. Οι παράμετροι μικροβιακών παθογόνων αποτελούν θέμα μεγάλου ενδιαφέροντος λόγω του άμεσου κινδύνου της ανθρώπινης υγείας.

Εκτιμάται ότι στις Η.Π.Α το 67% των εντερικών ασθενειών προέρχεται από μολυσμένα τρόφιμα με αδενοϊούς , το 40% από Νοροϊούς , το 1% από αστροϊούς, το 1% από ροταιούς και το 5% από ιούς της ηπατίτιδας Α (HAV) (Mead et al.1999). Είναι προφανές ότι οι άνθρωποι του αναπτυσσόμενου κόσμου πρέπει να έχουν πρόσβαση στην καλή ποιότητα νερού , σε ικανοποιητική ποσότητα και καθαρότητα , καλή διαθεσιμότητα και κατάλληλα συστήματα διανομής του νερού. Σε πάρα πολλά μέρη του κόσμου οι μόνες πηγές παροχής νερού προέρχονται από μικρούς ποταμούς με μεγάλη πιθανότητα να περιέχονται και ανθρώπινα λύματα. Οι περισσότερες παροχές νερού χρειάζονται επεξεργασία πριν την χρήση του, ειδικά όταν το νερό προέρχεται από βαθιά φρεάτια ή από πηγές.

1.2.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ.

Η εκτίμηση της καταλληλότητας του νερού ελέγχεται κάτω από αυστηρές διαδικασίες ελέγχου. Ξεκινάει πρώτα με μία επιτόπια υγειονομική εξέταση από εξειδικευμένο άτομο στην περιοχή της υδροληψίας. Κατά την επίσκεψη αυτή ελέγχεται και η γύρω περιοχή για τυχόν ύπαρξη εστιών μόλυνσης. Έπειτα ακολουθεί ο έλεγχος των οργανοληπτικών παραμέτρων όπως θολερότητα, γεύση, οσμή και χρώμα όπου ακόμα και αν το νερό από μικροβιολογική άποψη είναι καθαρό ο καταναλωτής θα έχει πρόβλημα στην κατανάλωση του. Το πόσιμο νερό όμως πρέπει να έχει και κάποια φυσικά χαρακτηριστικά ,ασχέτως της μικροβιολογικής πλευράς ή της χημικής. Πρέπει να έχει θερμοκρασία 5-15 °C .Η χημική του εξέταση πρέπει να είναι σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία που είναι εναρμονισμένη με την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στις χημικές εξετάσεις κατατάσσονται περίπου 50 χημικές παράμετροι ως εξής: Απλές χημικές παράμετροι, ανεπιθύμητες χημικές παράμετροι και τοξικές χημικοί παράμετροι. Η βιολογική του έρευνα έγκειται σε αναζήτηση πρωτόζωων και αλγών κυρίως σε νερά ποταμών ,ενώ η μικροβιολογική του εξέταση σε παθογόνα μικρόβια

που έχουν προέλευση την κοπρανώδη μόλυνση του νερού και μπορούν να προκαλέσουν υδατογενείς επιδημίες.

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί γενικότερα μπορούν να είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς σε άτομα ακόμα και σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι ιοί εντερικής προέλευσης μπορεί να είναι μολυσματικοί σε συγκεντρώσεις από 1 έως 10 σωματίδια ενώ ένα μολυσμένο άτομο από ιούς μπορεί να αποβάλλει από 10^3 έως 10^9 σωματίδια ιών ανά γραμμάριο κοπράνων. Τα νιτρικά, φωσφορικά μπορούν να δημιουργήσουν αύξηση αλγών και το φαινόμενο του ευτροφισμού στα νερά που καταλήγουν.

1.2.2 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΒΟΘΡΟΛΥΜΑΤΑ.

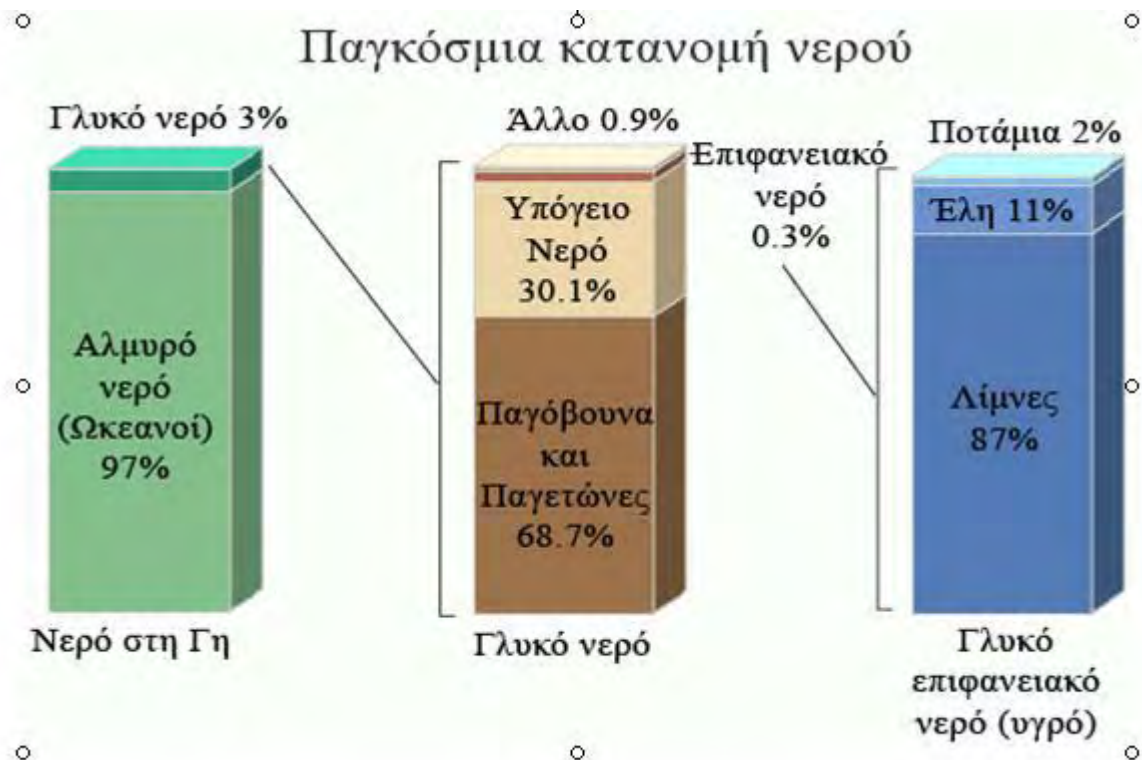
Σαν βοθρολύματα εννοούμε τα ακατέργαστα αστικά λύματα που συλλέγονται από την αποχέτευση και απορρίπτονται χωρίς επεξεργασία σε διάφορους αποδέκτες (Εικόνα 1). Περιέχουν μικροοργανισμούς όπως βακτήρια (π.χ. Σαλμονέλλα), πρωτόζωα (π.χ. γιάρδια, κρυπτοσπορίδιο), ιούς (π.χ. ηπατίτιδα Α, εντεροϊούς) και αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για την δημόσια υγεία. (Grabtree et al. 1997)



(Εικόνα 1)

(<http://www.solon.org.gr/index.php/2008-07-15-19-05-31/52-2008-07-15-14-18-38/1150-night-soil-public-health.html>, 2009 Βανταράκης)

Ως αποθέματα νερού εννοούμε τις πηγές του νερού οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως από τον άνθρωπο μετά από την κατάλληλη επεξεργασία. Οι χρήσεις του νερού έγκεινται στην καλλιέργεια, στα νοικοκυριά, στην βιομηχανία, στον ψυχαγωγικό τομέα και στις περιβαλλοντικές δραστηριότητες. Στην πραγματικότητα όλες οι λειτουργίες χρειάζονται καλής ποιότητας νερό. Το 97% της γης είναι αλμυρό νερό δηλαδή θαλασσινό και το 3% είναι φρέσκο νερό εκ του οποίου τα 2/3 είναι δεσμευμένο σε παγόβουνα και παγετώνες. Το υπόλοιπο φρέσκο νερό βρίσκεται κυρίως στο υπέδαφος και ένα μικρό ποσοστό πάνω στο έδαφος και στον αέρα. Το φρέσκο νερό θεωρείται ανανεώσιμη πηγή, ωστόσο τα παγκόσμια αποθέματα του καθαρού φρέσκου νερού μειώνονται. Η απαίτηση νερού υπερβαίνει τα υπάρχοντα αποθέματα σε πάρα πολλά μέρη του κόσμου και όσο ο πληθυσμός της γης αυξάνεται τόσο ανεβαίνουν και οι απαιτήσεις του σε πόσιμο νερό. Σημαντική θεωρείται η παγκόσμια ανησυχία σχετικά με το πώς να συντηρούμε το νερό για τις απαραίτητες λειτουργίες του οικοσυστήματος, χωρίς να έρχεται σε κίνδυνο η ανθρώπινη υγεία.(Enriquez et al.1995). Η βιοκοινότητα του νερού έχει μια κάθετη πτωτική τάση σε σχέση με την βιοκοινότητα του εδάφους. Το πλαίσιο διάθεσης πηγής νερού στον ανθρώπινο πληθυσμό είναι παγκοσμίως γνωστό σαν <<ΔΙΚΑΙΩΜΑ ΝΕΡΟΥ>>. (Εικόνα 2)



(Εικόνα 2). Κατανομή νερού στη γη http://4.bp.blogspot.com/_Hepfiuj7uUQ/S86crEqPYgI

1.3 ΑΔΕΝΟΙΟΙ.

Απομώθηκαν την δεκαετία του '50, σαν ιοί των αμυγδαλών από παιδιά αλλά και από νεοσύλλεκτους στρατιωτικούς με πυρετώδεις ασθένειες. Επίσης πολλές φορές ανιχνεύθηκαν και στο αναπνευστικό σύστημα. Υπάρχουν 51 είδη που έχουν ανακαλυφθεί στον άνθρωπο, τα οποία ευθύνονται για περισσότερο από 5-20% των αναπνευστικών παθήσεων στα παιδιά καθώς επίσης και πολλών μολύνσεων στους ενήλικες (Brandt et al.1985, Albert et al.1986, Unhoo et al.1986).

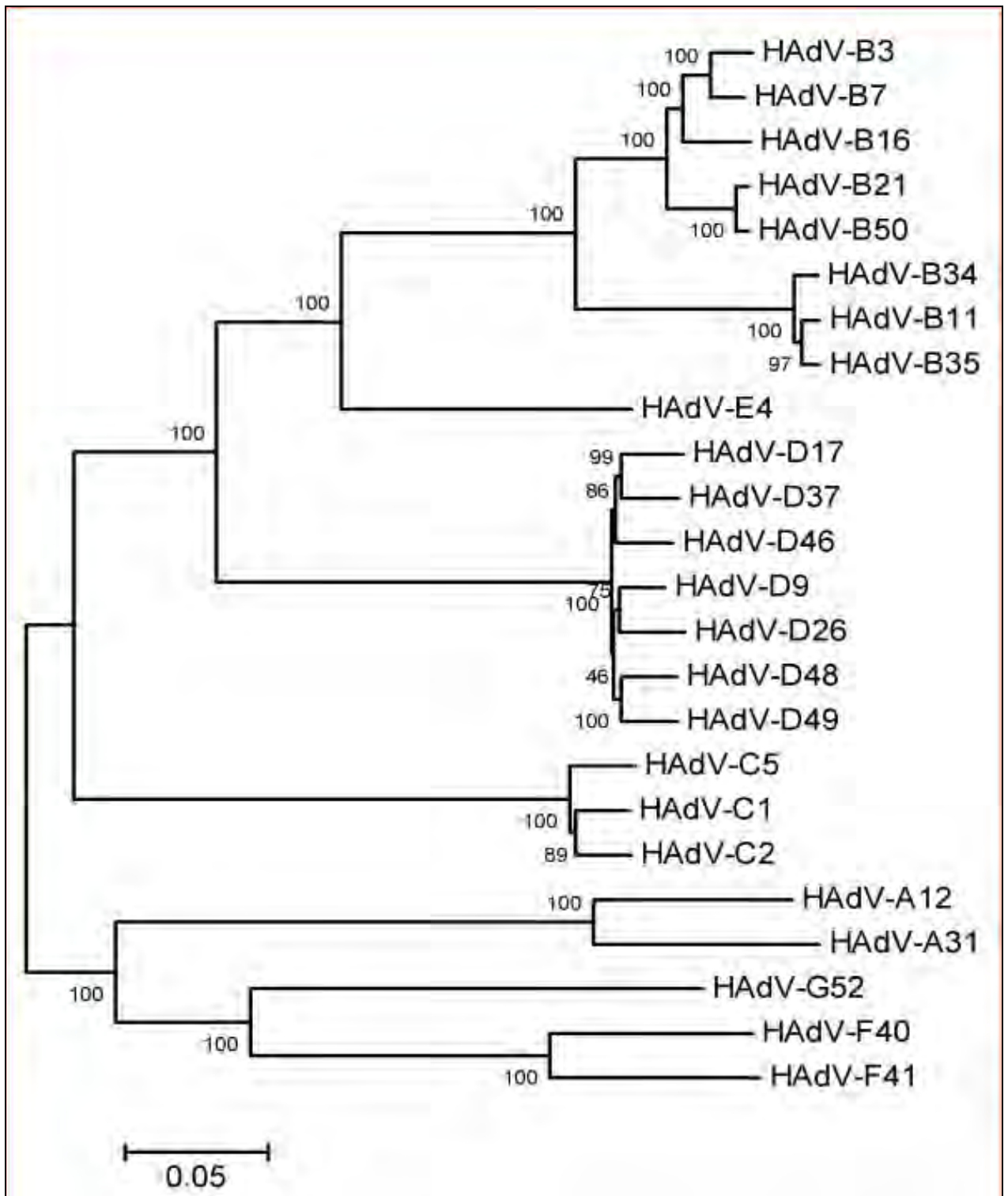
Οι ιοί της οικογένειας Adenoviridae μολύνουν πολλά είδη σπονδυλωτών συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων (Benko et al.2003).

Σαν κύρια χαρακτηριστικά των αδενοϊών θεωρούνται:

- Ευρεία εξάπλωση στη φύση
- Μόλυνση πτηνών και θηλαστικών
- Ύπαρξη 2 γενών: Aviadenovirus και Mastadenovirus
- Ικανότητα πρόκλησης ασθένειας από μη εμφανή λοίμωξη στον λεμφοειδή ιστό.
- Πολλοί τύποι μπορούν ενδεχομένως να προκαλέσουν καρκινογένεση.

1.3.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΔΕΝΟΪΩΝ

Υπάρχουν τουλάχιστον 51 είδη ανθρώπινων αδενοϊών (Mastadenovirus) τα οποία χωρίζονται σε 6 υποκατηγορίες (A-F)(Brandt et al.1969, Shenk et al.2001, Benko et al.1999). Οι ιοί που ανήκουν στην υποκατηγορία A έχουν την τάση να δημιουργούν όγκους με μεγάλη συχνότητα ενώ οι ιοί που ανήκουν στην υποκατηγορία B είναι εξαιρετικά αδύναμοι στην δημιουργία όγκων. Επίσης μη-καρκινογόνοι θεωρούνται και οι υπόλοιπες υποκατηγορίες C, D, E και F. (Εικόνα 3)



(Εικόνα 3). Φυλογενετικό δένδρο ταξινόμησης των αδενοϊών

(<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/557>)

Ανθρώπινοι εντερικοί αδενιοί μπορούν να ανιχνεύονται για παρατεταμένες περιόδους στο περιβάλλον και πολλοί μπορούν να επιβιώσουν στο νερό και στην επεξεργασία του ύδατος (Fields et al.1996). Περισσότεροι από 110 τύποι ανθρώπινων εντερικών ιών έχουν ταυτοποιηθεί, συμπεριλαμβανομένων των εντεροϊών, του ιού της ηπατίτιδας Α, των Νοροϊών, των Rotaiών και των αδενιοών. Οι εντερικοί αδενιοί μπορούν να επιζήσουν σε επιφανειακά ύδατα, ενώ η πιο συχνή καταγεγραμμένη πηγή μόλυνσεων συμπεριλαμβάνει τα υπόγεια ύδατα τα οποία βρίσκονται υπερχειλισμένα με λύματα. Η ανάπτυξη των εργαστηριακών μεθόδων συγκέντρωσης ήταν ο κύριος παράγοντας της αύξησης απομόνωσης των εντερικών ιών από το πόσιμο νερό (Flewett et al.1975). Εάν υποθέσουμε πως όλες οι μη-βακτηριακές γαστρεντερικές ασθένειες που έχουν καταγραφεί είναι ιογενούς προέλευσης τότε αναλογικά το 64% σχετίζεται άμεσα με την παρουσία ιών στο νερό. (Πίνακας 1)

<i>ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ</i>	<i>ΠΙΚΗ</i>	<i>ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ</i>	<i>ΚΛΙΝΙΚΑ</i>	<i>ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ</i>
	<i>ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ</i>		<i>ΣΥΝΔΡΟΜΑ</i>	<i>ΚΑΨΙΔΙΟΥ</i>
Aichivirus	Picornaviridae (kobuvirus)	Ναι	Οξεία γαστρεντερίτιδα	28nm ssRNA
Adenovirus group F, types 40 & 41	Adenoviridae	Ναι	Οξεία γαστρεντερίτιδα	100nm dsDNA
Enterο-ιοί (Polio-ιοί, Coxsackie, Echo-ιοί)	Picornaviridae (enterovirus)	Ναι	Παράλυση, μηνιγγίτιδα, μυοκαρδιοπάθεια,	28nm ssRNA
HAV	Picornaviridae (hepatovirus)	Ναι	Ηπατίτιδα, ίκτερος, κοιλιακοί πόνοι, ανορεξία, ναυτία	28nm ssRNA
HEV	Αδιαευκρίνιστη	Ναι	Ηπατίτιδα..Επικίνδυνη στην εγκυμοσύνη	34nm ssRNA
Norovirus	Calicivirus	Ναι	Οξεία γαστρεντερίτιδα,	34nm ssRNA

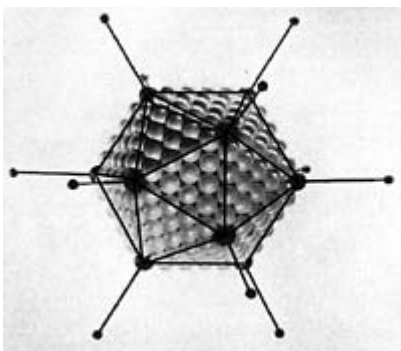
			ναυτία, έμετοι	
Rotavirus	Reoviridae	Ναι	Διάρροια	70nm dsRNA
Sapovirus	Caliciviridae	Ναι	Γαστρεντερίτιδα ,κοινή στα παιδιά	34nm ssRNA

Πίνακας 1. Εντερικοί ιοί.

(Carter M.J.,2004)

1.3.2 ΔΟΜΗ ΚΑΨΙΔΙΟΥ

Με την χρήση της κρυσταλλογραφίας, η δομή των αδενοϊών γίνεται περισσότερο αντιληπτή, έχοντας διαθέσιμα στοιχεία που παλαιότερα δεν υπήρχαν (Fabry A. 1987 and Saban N. 2006). Οι αδενοϊοί αποτελούνται από ένα εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο το οποίο περιέχει στο εσωτερικό του ένα γραμμικό διπλοειδές γένωμα DNA. Το ιικό σωματίο έχει διάμετρο 70-100 nm και αποτελείται από 252 καψομερή. Οι 12 κορυφές του εικοσαεδρικού πρωτεϊνικού περιβλήματος καταλαμβάνονται από πρωτεϊνικές μονάδες που αποκαλούνται pentons, καθεμιά από τις οποίες έχει λεπτή προεξοχή που αποκαλείται ακίδα (Fibre) (Εικόνα 4). Τα 240 καψομερή τα οποία διαμορφώνουν τις 20 πλευρές και τις άκρες του εικοσαεδρικού καψιδίου, καλούνται Hexons επειδή σχηματίζουν εξαγωνικές σειρές.



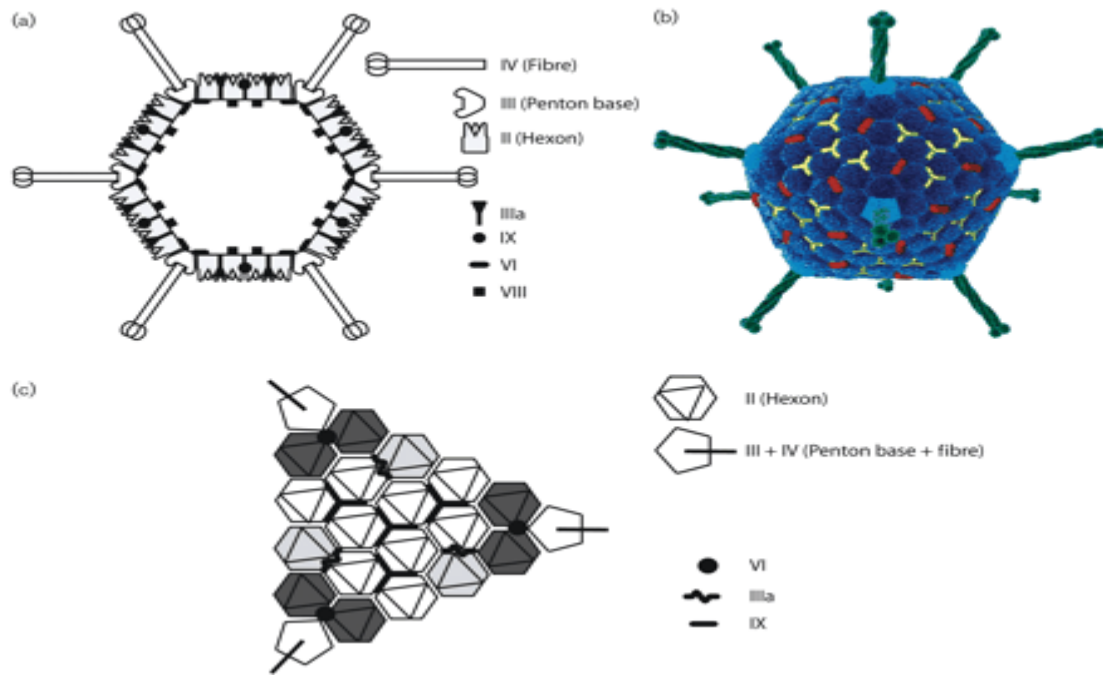
(Εικόνα 4). Εμφάνιση της δομής του αδενοϊού. (Lurier et al.1978).

Το ικό καψίδιο αποτελείται από τουλάχιστον 9 πρωτεΐνες εκ των οποίων οι κυρίες είναι: hexon (II), penton (III) και fibre (IV) ενώ δευτερεύουσες είναι: IIIa, VIII, VI, IX. Υπάρχουν επίσης άλλες 4 πρωτεΐνες που βρίσκονται μαζί με το γενωμικό DNA του πυρήνα του ιού και είναι οι V, VII, μ και TP. (Everitt et al.1973, Chatterjee et al. 1985, Van Oostrum et al. 1985). (Πίνακας 2)

Αριθμός πρωτεΐνης	Όνομα πρωτεΐνης	Μοριακή μάζα	Αριθμός Αντιγράφων	Ανίχνευση (Western blot)
II	Hexon	107.996	720	Δυνατή
III	Penton base	63.642	60	Δυνατή
IIIa		63.900	60	Δυνατή
V	Core	41.523	157	Δυνατή
VI		22.103	360	Αδύνατη
VII	core	19.422	833	Δυνατή
IX		14.268	240	Αδύνατη

Πίνακας 2. Απεικόνιση των πρωτεϊνών του καψιδίου ενός αδενοϊού (Stewart et al, 1993)

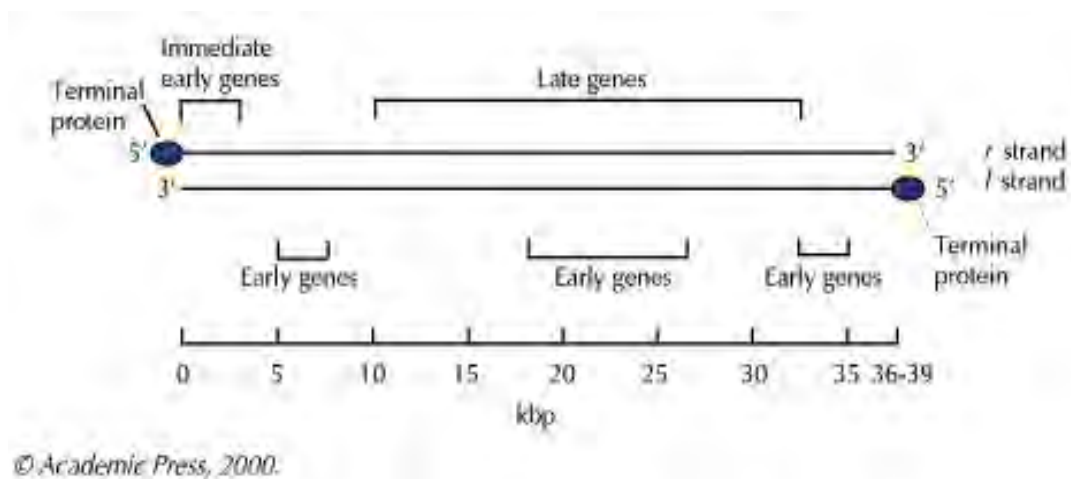
Η τοποθεσία της δευτερεύουσας πρωτεΐνης του καψιδίου IIIa έχει χωροθετηθεί στο εικοσάεδρο και βρίσκεται κάτω από την θέση της πρωτεΐνης Penton. Η πρωτεΐνη VI αντιδρά με την πυρηνική πρωτεΐνη V, η οποία βρίσκεται εσωτερικά δίπλα στην βάση της penton στην περιοχή της κορυφής του ικού σωματιδίου. Μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπικής ανάλυσης προσδιορίζεται η θέση της μικρότερης εκ των δευτερευόντων πρωτεϊνών, της πρωτεΐνης IX, σε σχέση με μια ομάδα 9 Hexons, αποκαλούμενη ως GON. Δεν υπάρχει καμία απόδειξη για την παρουσία της δευτερεύουσας πρωτεΐνης VIII στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και για τον λόγο αυτό η θέση της προσδιορίζεται κάπου εσωτερικά του καψιδίου (Εικόνα 5).



(Εικόνα 5) . Σχηματική απεικόνιση του καψιδίου HdAV. α) Επισκόπηση όλων των πρωτεϊνών του καψιδίου, απεικονίζοντας την θέση τους μέσα στο καψίδιο β) Τρισδιάστατη απεικόνιση του ιικού σωματιδίου, δείχνοντας τις κύριες και δευτερεύουσες πρωτεΐνες του καψιδίου. Οι τρεις κύριες πρωτεΐνες είναι: Hexon, Penton και Fibre και απεικονίζονται με μπλε, γαλάζιο και πράσινο χρώμα αντίστοιχα. Οι δυο δευτερεύουσες πρωτεΐνες είναι: πρωτεΐνη IX και IIIa οι οποίες απεικονίζονται με κίτρινο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα. γ) Το διάγραμμα απεικονίζει μια πλευρά του καψιδίου, επεξηγώντας την διανομή των δευτερευόντων πρωτεϊνών, IIIa, VI και IX. Οι Hexons που σχηματίζουν GON απεικονίζονται με λευκό χρώμα (Vellinga et al.2005)

1.3.3 ΔΟΜΗ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

Το γένωμα των αδενοϊών αποτελείται από ένα γραμμικό, δίκλωνο DNA, μήκους 30-38 kbp, το ακριβές μέγεθος του οποίου διαφέρει μεταξύ των διαφόρων τύπων του γένους. Τα γενώματα των Αδενοϊών περιέχουν 30-40 γονίδια (Εικόνα 6).

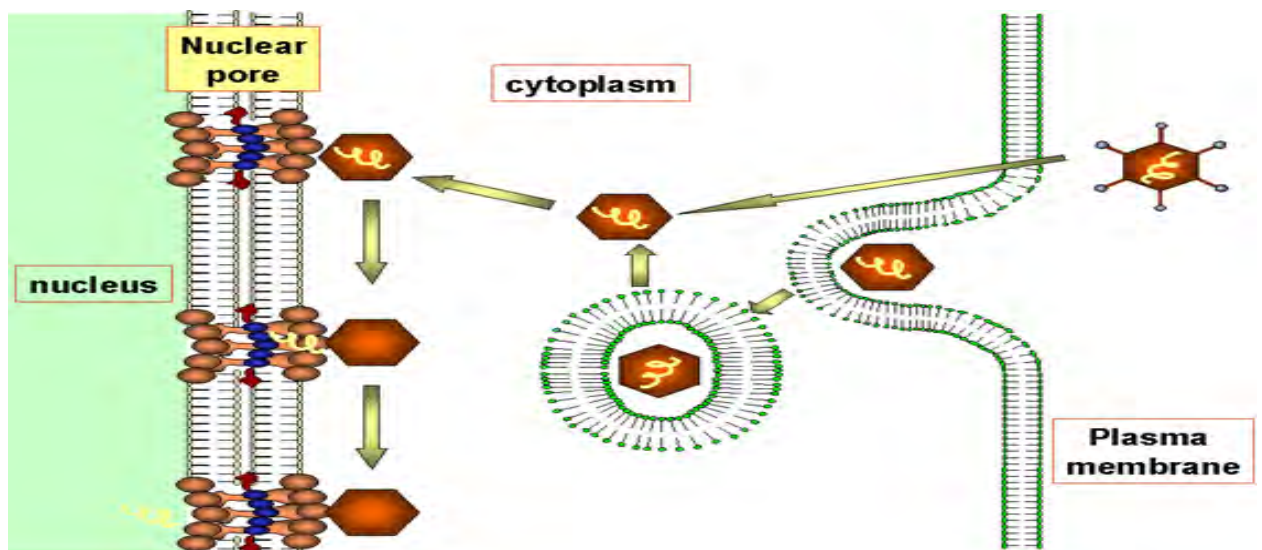


(Εικόνα 6) Οργάνωση του γενώματος των Αδενοϊών

Η τελική αλληλουχία του κάθε κλώνου DNA είναι μια ανεστραμμένη επανάληψη από 100-140 bp. Αυτές οι δομές είναι σημαντικές για την αντιγραφή του DNA, καθώς η πρωτεΐνη 55 kDa, γνωστή ως τελική πρωτεΐνη, προσδένεται στα 5' τελικά άκρα του κάθε κλώνου. Κατά την διάρκεια της αντιγραφής του γενώματος, αυτή η πρωτεΐνη λειτουργεί ως εκκινητής, αρχίζοντας την σύνθεση των νέων κλώνων DNA. Παρόλο που τα γενώματα των αδενοϊών είναι κατά πολύ μικρότερα από αυτά των ερπητοϊών (herpesviruses), η έκφραση της γενετικής πληροφορίας είναι πολύ πιο σύνθετη. Ομάδες γονιδίων εκφράζονται από έναν περιορισμένο αριθμό κοινών επαγωγέων και μέσω εναλλακτικού ματίσματος τα mRNAs εκφράζουν μια ποικιλία πολυπεπτιδίων από κάθε επαγωγή.

1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΑΔΕΝΟΙΩΝ

Ο Αδενοϊός εισέρχεται στο κύτταρο ξενιστή μέσω ενδοκύττωσης, απελευθερώνεται από τα ενδοσώματα και το νουκλεοκαψίδιο του μεταφέρεται προς τον πυρήνα του κυττάρου στους πόρους του οποίου συμβαίνει η απέκδυση (uncoating) και το DNA του ιού περνά τελικά στον πυρήνα.



(Εικόνα 7). Είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή
(<http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/adeno-uncoat.jpg>)

Η αντιγραφή είναι εξ' ολοκλήρου πυρηνική. Η αντιγραφή αυτών των ιών είναι σχετικά εξαρτημένη από τους κυτταρικούς παράγοντες.

Εφαρμόζουν ποικίλους μηχανισμούς για την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων τους. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν trans-acting μεταγραφικούς ενεργοποιητές όπως την πρωτεΐνη E1A, και μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης, η οποία επιτυγχάνεται από εναλλακτικό μάτισμα των mRNAs και των κωδικοποιημένων από τον ιό VA (virus-associated) RNAs.

Η μόλυνση των κυττάρων από τον αδενοϊό διαιρείται σε δύο στάδια, στην πρόιμη και την όψιμη φάση. Η τελευταία φάση συμβαδίζει με την αντιγραφή του γενόματος του ιού.

Τα πρώιμα γονίδια κωδικοποιούν trans-acting ρυθμιστικές πρωτεΐνες που εκφράζονται αμέσως μετά την μόλυνση. Οι πρώτες πρωτεΐνες που εκφράζονται E1A και E1B, κωδικοποιούνται από μια μεταγραφική μονάδα στο r-strand στο αριστερό άκρο του γενώματος του αδενοϊού .

Αυτές οι πρωτεΐνες είναι trans - ρυθμιστικές πρωτεΐνες , αλλά εμπλέκονται επίσης και στον μετασχηματισμό των κυττάρων που έχουν μολυνθεί από αδενοϊό.

Παράγονται πέντε ματισμένα mRNAs που φέρουν polyA ουρά (13S, 12S, 11S, 10S, 9S) τα οποία κωδικοποιούν πέντε E1A πολυπεπίδια (των 289, 243, 217, 171 και 55 αμινοξέων αντίστοιχα).

Όλες αυτές οι πρωτεΐνες μεταφράζονται από το ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο και έχουν τα ίδια αμινο- και καρβοξύ - τελικά άκρα.

Οι διαφορές μεταξύ τους είναι λόγω του εναλλακτικού ματίσματος της E1A μεταγραφικής μονάδας και οι οποίες καταλήγουν σε βασικές διαφορές στις λειτουργίες τους. Τα πεπίδια των 289 και 243 αμινοξέων είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές. Παρόλο που αυτές οι πρωτεΐνες ενεργοποιούν την μεταγραφή σε όλους τους πρώιμους επαγωγείς του αδενοϊού, δεν υπάρχουν σαφείς αποδείξεις ότι τα πεπίδια αυτά προσδένονται απευθείας στο DNA.

Η E1A μπορεί και να ενεργοποιήσει και να καταστείλει την μεταγραφή. Η σύνθεση της E1A ενεργοποιεί ένα καταρράκτη μεταγραφικής ενεργοποίησης μέσω της ενεργοποίησης της μεταγραφής των άλλων πρώιμων γονιδίων του αδενοϊού, E1B, E2, E3 και E4 .

Η μεταγραφή της E1A από μόνη της είναι ένα ισορροπημένο, αυτορυθμιζόμενο σύστημα.

Τα άμεσα πρώιμα γονίδια των DNA ιών τυπικά έχουν ισχυρά στοιχεία επαύξησης των επαγωγέων τους και αυτό γιατί σε ένα προσφάτως μολυσμένο κύτταρο, δεν υπάρχουν πρωτεΐνες του ιού και ο επαυξητής απαιτείται για την αρχική έκφραση του γενώματος του ιού. Οι άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες που συνθέτονται είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές που ενεργοποιούν την έκφραση και των άλλων γονιδίων του ιού, και η E1A λειτουργεί ακριβώς κατά αυτόν τον τρόπο.

Ωστόσο, παρόλο που η E1A trans - ενεργοποιεί τον επαγωγέα της , η πρωτεΐνη καταστέλει επίσης την λειτουργία του επαυξητή της και έτσι σε μεγάλες συγκεντρώσεις, αυτορυθμίζει την έκφρασή της.

Το επόμενο στάδιο στο οποίο η έκφραση μπορεί να ρυθμιστεί είναι κατά την διάρκεια της εξαγωγής του mRNA από τον πυρήνα και κατά την διάρκεια της μετάφρασης που γίνεται στο κυτταρόπλασμα.

Τα VA (virus-associated genes) γονίδια κωδικοποιούν δυο μικρά (~160 nt) RNAs που μεταγράφονται από το r-strand του γενόματος από την RNA πολυμεράση III (της οποίας η φυσιολογική λειτουργία είναι να μεταγράφει παρόμοια μικρά RNAs όπως τα 5S ριβοσωμικά RNA και τα tRNAs).

Ο ευκαρυωτικός πυρήνας περιέχει τρία τέτοια ένζυμα: την RNA πολυμεράση I, την RNA πολυμεράση II, και την RNA πολυμεράση III.

Η RNA πολυμεράση I συνθέτει τους περισσότερους τύπους του rRNA.

Η RNA πολυμεράση II συνθέτει όλα τα mRNA και

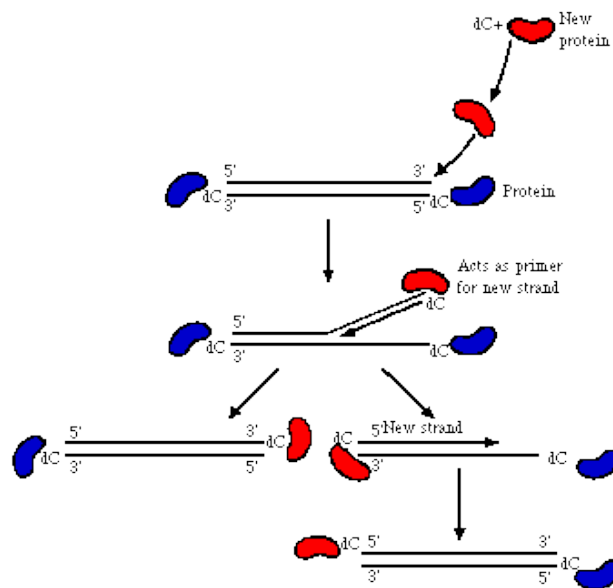
η RNA πολυμεράση III συνθέτει tRNA και 5S rRNA.

Αιτία αυτής της εξειδίκευσης είναι ότι κάθε τύπος RNA πολυμεράσης αναγνωρίζει μόνον εκείνους τους υποκινητές που εμφανίζονται με την ειδική τάξη γονιδίων.

Αμφότερα τα VA RNA I και τα VA RNA II παρουσιάζουν έντονη δευτεροταγή δομή και κανένα μόριο δεν κωδικοποιεί για κάποιο πολυπεπίτιδιο ενώ υψηλά επίπεδα αυτών των VA συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων με αδενοϊό κυττάρων .

Η μόλυνση των κυττάρων από κάποιο ιό ενεργοποιεί την παραγωγή ιντερφερόνης. Μια από τις δράσεις των ιντερφερονών είναι να ενεργοποιήσουν μια κυτταρική πρωτεϊνική κινάση , γνωστή ως PKR , η οποία εμποδίζει την έναρξη της μετάφρασης των ιικών mRNAs. Τα αποτελέσματα των ιντερφερονών στα μολυσμένα κύτταρα είναι η παρεμπόδιση της μετάφρασης των κυτταρικών και ιικών mRNAs.

Το VA RNA I προσδένεται στην κινάση , αποτρέποντας την ενεργοποίησή της και έτσι δεν καταστέλλει την μετάφραση των ιικών mRNAs . Τα VA RNAs προωθούν επιλεκτικά την μετάφραση των mRNAs του αδενοϊού εις βάρος των κυτταρικών mRNAs των οποίων η μετάφραση συνεχίζει να παρεμποδίζεται. (Εικόνα 7)



(Εικόνα 8) . Αντιγραφή των αδενοϊών
(<http://www.microbiologybites.com/virology>)

1.5 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ & ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Οι εντερικοί αδενοϊοί θεωρούνται μείζονος σημασίας για την δημόσια υγεία δεδομένου ότι σχετίζονται με επιδημίες γαστρεντερίτιδας οι οποίες προέρχονται από κατανάλωση μολυσμένου νερού (Fields et al.1996) .Οι αδενοϊοί είναι παθογόνοι και η ύπαρξη τους μπορεί να προκαλέσει σημαντικές μολύνσεις. Μπορούν να μολύνουν τα περισσότερα είδη ζώων καθώς βρίσκονται σχεδόν παντού(Hierholzer et al. 1988).Οι εντερικοί Αδενοϊοί είναι ιοί ανθρώπινης εντερικής προέλευσης. Μετά τον διπλασιασμό του γενετικού τους υλικού μέσα στον γαστρεντερικό σωλήνα, οι ιοί αυτοί μπορούν να διασκορπιστούν στο νερό και στο περιβάλλον. Η εξαιρετική σταθερότητα τους και η ανθεκτικότητα τους στις φυσικοχημικές διαδικασίες εξυγίανσης συντελούν στην άμεση εξάπλωσή τους (Estes et al.1979). Επίμονες μολύνσεις συμβαίνουν στις αμυγδαλές. Πολλοί τύποι αδενοϊών είναι συνδεδεμένοι με κοινά κλινικά σύνδρομα.(Πίνακας 3)

<u>ΑΣΘΕΝΕΙΑ</u>	<u>ΕΥΠΑΘΕΙΣ ΟΜΑΔΕΣ</u>
Οξείες αναπνευστικές ασθένειες	Νεοσύλλεκτοι στρατού, οικοτροφεία
Φαρυγγίτιδα	Νεογνά
Γαστρεντερίτιδα	Νεογνά
Επιπεφυκίτιδας	Όλοι
Πνευμονία	Νεοσύλλεκτοι στρατού, νεογνά
Παθήσεις του κερατοειδούς χιτώνα	Όλοι
Οξεία αιμορραγική κυστίτιδα	Νεογνά

(Πίνακας 3). Ασθένειες στις οποίες εμπλέκονται οι Αδενοιοί

Κάποιες από αυτές τις ασθένειες είναι συνηθισμένες και άλλες αρκετά σπάνιες. Οι περισσότερες όμως επηρεάζουν είτε το γαστρεντερικό σύστημα , είτε το αναπνευστικό σύστημα είτε τα μάτια. Μολύνσεις που προέρχονται από αδενοϊούς πολλές φορές εμφανίζονται και ως ασυμπτωματικές. Οι περισσότεροι άνθρωποι έχουν μολυνθεί μ ένα τύπο ιού μέχρι τα 15 τους χρόνια.

1.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των αδενοϊών ποικίλουν από τύπο σε τύπο , όλοι όμως έχουν το κοινό γνώρισμα ότι μεταδίδονται με σταγονίδια και σε περιπτώσεις μετάδοσης εντερικών ιών και με το νερό. Μερικοί τύποι αδενοϊών μπορεί να είναι ενδημικοί σε διάφορα μέρη του κόσμου και η μόλυνση επέρχεται κατά την διάρκεια της παιδικής ηλικίας. Άλλοι ιοί παρουσιάζουν σποραδικές εξάρσεις ιώσεων όπως π.χ. επιπεφυκίτιδα του κερατοειδούς η οποία σχετίζεται με τους ορότυπους 8,19 και 37.Επιδημίες επιπεφυκίτιδας είναι δυνατόν να μεταδοθούν μέσω του νερού, χαρακτηριζόμενες ως υδατογενείς λοιμώξεις, και οφείλονται εν μέρει σε ανεπαρκείς χλωριώσεις πισινών και τεχνητών λιμνών αναψυχής. Οι εντερικοί αδενοιοί τύπου 40 και 41 προκαλούν γαστρεντερίτιδα (Adrian et al.1989, Brown et al.1990) . Η τυπική χρονική περίοδος επώασης στην περίπτωση της γαστρεντερίτιδας είναι

3-10 μέρες, ενώ για τις λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος 2-14 μέρες. Εξάρσεις λομώξεων από αδενοϊούς συμβαίνουν συνήθως τον χειμώνα, την άνοιξη και νωρίς το καλοκαίρι, ωστόσο μπορούν να συμβούν καθ' όλη την διάρκεια του έτους.

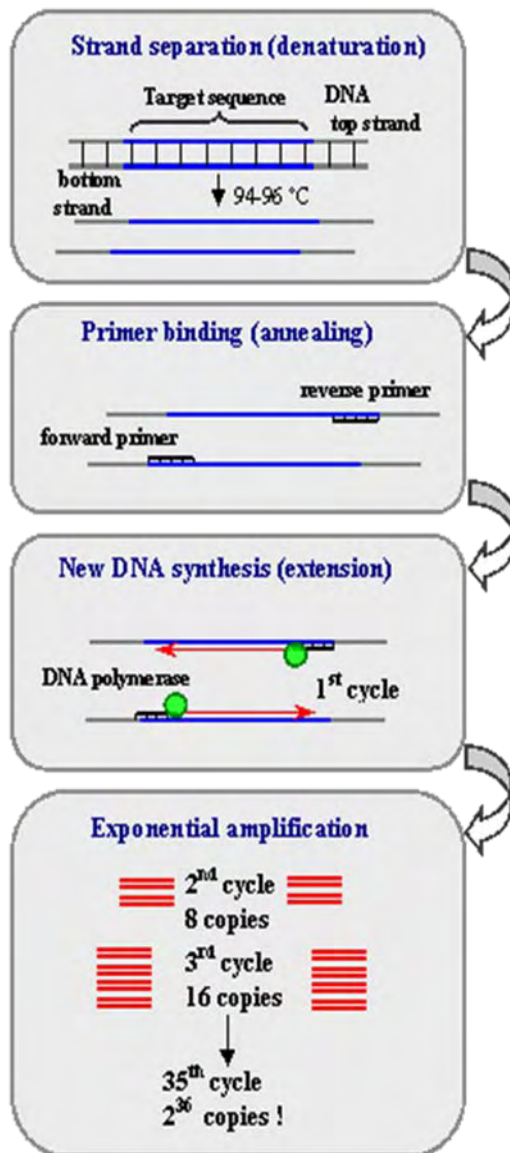
1.7 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Αποτελεί πρόκληση στην ιολογία περιβάλλοντος, η πολλή μικρή συγκέντρωση ιών στα προς εξέταση δείγματα η οποία πρέπει να ανιχνευθεί (Griffin et al.2003, Lipp et al.2001).Οι μέχρι πρόσφατα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι κυτταροκαλλιιεργειών έχουν αντικατασταθεί με μοριακές τεχνικές ιδιαίτερα για τους ιούς οι οποίοι αναπτύσσονται δύσκολα ή καθόλου σε κυτταροκαλλιιεργείες όπως οι ιοί της Ηπατίτιδα Α και Ε, οι Caliciviruses, οι Rotaviruses , οι Νοροϊοί και οι Astroviruses. Η ενίσχυση του ιικού νουκλεϊκού οξέος γίνεται με την χρήση της PCR καθώς είναι εξαιρετικά γρήγορη, ευαίσθητη και ειδική (Dubrou J,C.,et al 1999, Goswami B.B., et al 1993, Graff J.,et al 1993, Tsai Y.L., et al 1993, Laykus L.A., et al 1996, Schwab K.J., et al 1996). Ωστόσο το μειονέκτημα της PCR είναι ότι δεν διαφοροποιεί μεταξύ βιώσιμων και μη-βιώσιμων ιών, (Timessen C.T., et al 1996) . Η PCR είναι μια εξαιρετικά γρήγορη τεχνική που χρησιμοποιείται για να πολλαπλασιάσει με ακρίβεια τμήματα του DNA. Θεωρείται ως μια απαραίτητη αρχική διαδικασία για την μελέτη του ιικού γενώματος (Puig M., et al 1994, Pina S.,et al 1993).

Η τεχνική της PCR ανακοινώθηκε στην επιστημονική κοινότητα για πρώτη φορά το 1985. Σήμερα όμως αντιμετωπίζεται σαν μια από τις πιο σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις και έχει αλλάξει, με δραστικό τρόπο, τη μελέτη του DNA.

Ο εφευρέτης της μεθόδου (Karry Mullis) τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993. Μέχρι το 1993, η PCR είχε χρησιμοποιηθεί σε περισσότερες από 7.000 επιστημονικές εργασίες (Paabo 1989). Από τότε που δημιουργήθηκε αρχικώς, πριν από 25 χρόνια περίπου, έχει γίνει το πιο σημαντικό εργαλείο, για να εργασθεί κάποιος σε επίπεδο DNA . Πριν την ανακάλυψη της PCR, οι μοριακές μέθοδοι ήταν πολύπλοκες , επίπονες και εξαιρετικά χρονοβόρες.

Η αντίδραση της PCR απαιτεί τα παρακάτω συστατικά (Εικόνα 8):



ΠΡΟΤΥΠΟ DNA:

το δείγμα DNA που περιέχει την αλληλουχία στόχο. Στην αρχή της αντίδρασης, υψηλή θερμοκρασία απαιτείται στο αρχικό διπλοειδές STRANDED DNA μόριο για να διαχωριστούν οι αλυσίδες ή μια από την άλλη.

DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ:

ένας τύπος ενζύμου που συνθέτει νέες συμπληρωματικές της αλληλουχίας στόχου. Η πρώτη και πιο ευρέως κοινή πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι η TaqDNA πολυμεράση (από *Thermis aquaticus*) ενώ PfuDNA πολυμεράση (από *Pycococcus Furiosus*) χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της υψηλής πίστης όταν αντιγράφεται το DNA. Ωστόσο τα συγκεκριμένα ένζυμα είναι ελαφρώς διαφορετικά, έχουν και τα δύο ικανότητες που τα καθιστούν ικανά για την PCR:

1. Μπορούν να παράγουν καινούριες αλυσίδες DNA χρησιμοποιώντας πρότυπο DNA και εκκινητές.
2. Και οι δύο είναι ανθεκτικές στην θερμότητα.

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ : μικρά κομμάτια απλοειδούς DNA τα οποία είναι συμπληρωματικά προς την αλληλουχία στόχο. Η πολυμεράση αρχίζει να συνθέτει DNA από το τέλος του εκκινητή.

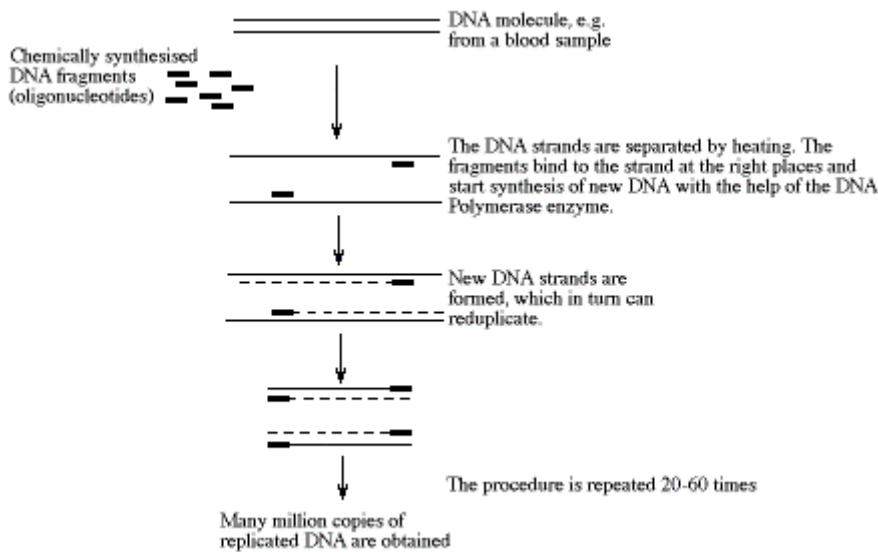
ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ (dNTPs) : απλές μονάδες βάσεων (A, T, C, G) τα οποία είναι ουσιαστικά «δομικές μονάδες» για τις νέες αλυσίδες.

(Εικόνα 9) . Διαδικασία της PCR

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>)

Η διαδικασία της PCR χρησιμοποιεί επαναλαμβανόμενους κύκλους υβριδισμού των εκκινητών, επιμήκυνση των εκκινητών και μετουσίωσης του προϊόντος της PCR για την παραγωγή εκθετικής αύξησης αντιγράφων του DNA στόχου. Χρησιμοποιούνται δυο εκκινητικά μόρια όπου πλαισιώνουν την περιοχή στόχο που μας ενδιαφέρει. Το DNA στόχος μετουσιώνεται στους 95 °C, τα εκκινητικά μόρια υβριδίζονται μεταξύ 50 °C και 60 °C και τέλος η Taq πολυμεράση παράγει νέα αντίγραφα στους 72 °C. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται

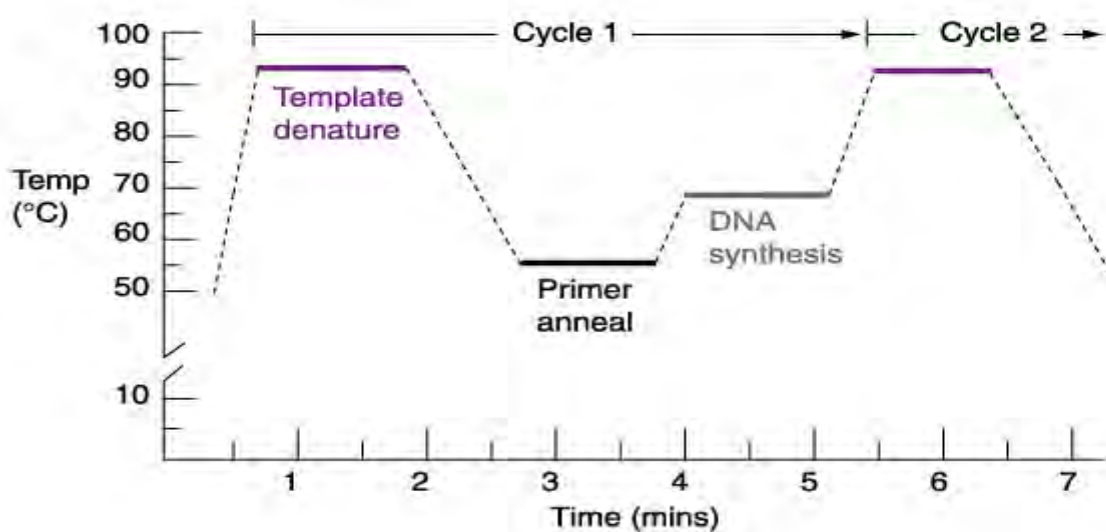
για n κύκλους και παράγονται 2^n PCR προϊόντα. Σε μια απλή εφαρμογή χρειάζονται 30 κύκλοι, από όπου παράγονται $2^{30}=1 \times 10^9$ αντίγραφα από ένα πρωτότυπο.



(Εικόνα 10) . Σχηματική απεικόνιση διαγράμματος PCR

http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/b2.gif&imgrefurl

Έτσι σε κάθε επόμενο κύκλο υπάρχει ένας θεωρητικός διπλασιασμός του αριθμού των αντιγράφων της περιοχής στόχου DNA. Εάν η PCR παρείχε 100% αποτελεσματικότητα , τότε 20 κύκλοι θα μπορούσαν να παράγουν 1.000.000 ενισχυμένα τμήματα του DNA στόχου.



Εικόνα 11. Διάγραμμα ροής θερμοκρασιών T_m κατά την διαδικασία της PCR (Roger_Miesfeld 2001) (<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture12/Lecture12.html>)

- 94°C μετουσίωση των δίκλωνων αλυσίδων.
- 40-72°C (συχνά έναρξη 55°C) υβριδισμός των εκκινητών
- 72°C η βέλτιστη θερμοκρασία για πολλές DNA πολυμεράσες , επέκταση των εκκινητών.
- Επανάληψη των πρώτων τριών βημάτων για 25-40 φορές

Τα προϊόντα της PCR μπορούν να αναλυθούν ακολούθως με διάφορες μεθόδους όπως η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος.

Η εξαιρετική ευαισθησία των τεχνικών που βασίζονται στην PCR δημιουργεί και το μεγάλο μειονέκτημα της, δηλ. την επιμόλυνση των δειγμάτων από προϊόν προηγούμενης αντίδρασης PCR με τους ίδιους εκκινητές. Η μοναδική ευαισθησία της τεχνικής και η δυνατότητα μικρού μήκους προϊόντος (μπορεί να είναι μόνο 40-50 βάσεις) επιτρέπει εύκολα τη χρήση της ακόμη και σε μερικά κλασματοποιημένο DNA, όπως αυτό που λαμβάνεται από ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εμπεδωμένους σε παραφίνη (Καπράνος Ν. ,Κόκκα Ε.,2001,Αμαλία Φλέμιγκ).

1.7.1 Η ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΗΣ PCR

Η διαδικασία της PCR έχει 3 ευδιάκριτες φάσεις:

- **E** – Οι αρχικοί κύκλοι κατά την διάρκεια των οποίων οι εκκινητές υβριδίζονται στο DNA στόχο μέσω της συμπληρωματικής αλληλουχίας.
- **M**- Οι μεσαίοι κύκλοι όπου η διαδικασία της ενίσχυσης είναι σε εξέλιξη με τα ζεύγη των εκκινητών ώστε να δημιουργηθεί μια εκθετική συσσώρευση προϊόντος.
- **L**- Οι μεταγενέστεροι κύκλοι, μερικές φορές αποκαλούνται και plateau, όταν η ενίσχυση δεν είναι πλέον εκθετική λόγω εξάντλησης των αντιδρώντων ή λόγω της παρεμπόδισης της αντίδρασης λόγω υψηλής συσσώρευσης του προϊόντος.

1.7.1.1 ΟΙ ΠΡΩΙΜΟΙ ΚΥΚΛΟΙ E

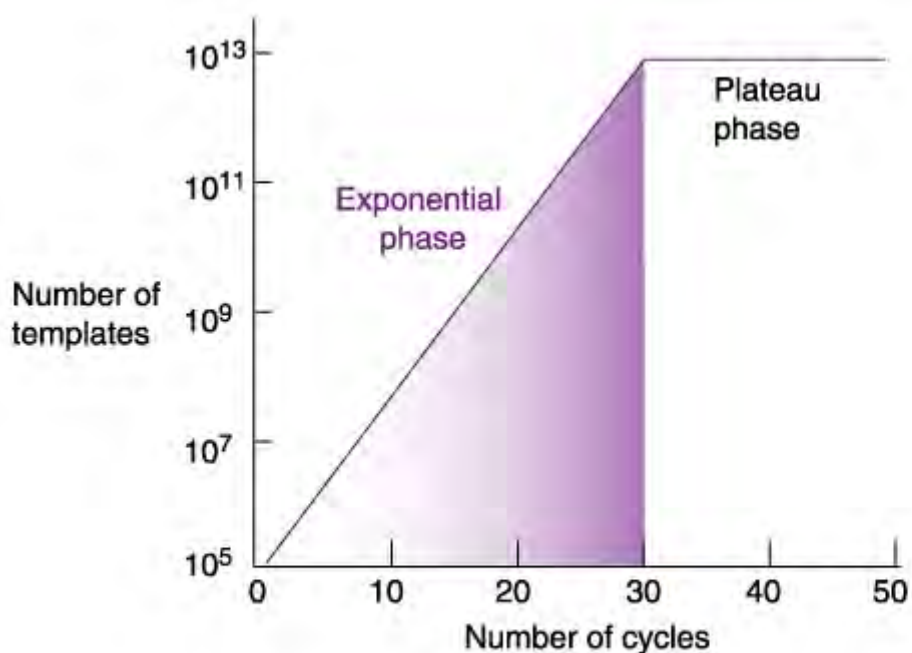
Εάν αυτός ο στόχος αντιπροσωπεύει ένα μοναδικό γονίδιο, τότε για κάθε αντίγραφο του απλοειδούς γενώματος θα υπάρχει μόνο ένα ειδικό σημείο πρόσδεσης για κάθε εκκινητή, περίπου 20 νουκλεοτίδια σε μήκος, ψάχνοντάς τα σε μια ποσότητα 6×10^9 νουκλεοτιδίων. Ο πρώτος στόχος των εκκινητικών μορίων είναι να βρουν την συμπληρωματική αλυσίδα τους, ελέγχοντας όλο το γένωμα DNA για το συμπληρωματικό τους τμήμα. Κατά την διάρκεια αυτής της φάσης ο εκκινητής θα βρει την συμπληρωματική αλληλουχία και θα παραμείνει συνδεδεμένος με το DNA στόχο για περαιτέρω αλληλεπίδραση με την DNA πολυμεράση. Όταν η DNA πολυμεράση ενεργοποιηθεί (σε θερμοκρασία περίπου 72°C) θα αρχίσει την σύνθεση DNA από τους δύο εκκινητές.

1.7.1.2 MISPRIMING

Οι εκκινητές μπορούν να βρουν εναλλακτικές τοποθεσίες στο DNA στόχο όπου μπορεί να είναι εν μέρει συμπληρωματικοί και μπορούν να προσδεθούν έτσι ώστε η DNA πολυμεράση να αλληλεπιδράσει και να αρχίσει τη σύνθεση του DNA. Η πολυμεράση δεν μπορεί να κάνει διακρίσεις μεταξύ μιας τέλει αντιστοιχίας εκκινητή/DNA στόχου και μεταξύ κάποιου εκκινητή που έχει κάποιες μη-αντιστοιχίες, με εξαίρεση το 3'-άκρο του εκκινητή. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα προϊόντα mispriming προκαλούν προβλήματα στην PCR επειδή τα προϊόντα παρεμβάλλονται με την αποδοτικότητα της PCR του σωστού προϊόντος.

1.7.1.3 ΚΥΚΛΟΙ Μ

Ακολουθώντας την πρώτη φάση της PCR, η φάση ενίσχυσης της PCR αρχίζει και περιλαμβάνει την εκθετική ενίσχυση, με τον διπλασιασμό του αριθμού των αντιγράφων τα οποία παρήχθησαν κατά την διάρκεια των πρώιμων κύκλων. Ταυτόχρονα η σχετική συγκέντρωση του γενωμικού DNA μειώνεται καθώς η συγκέντρωση των ενισχυμένων προϊόντων αυξάνεται και τελικώς έρχεται η φάση του PLATEAU .



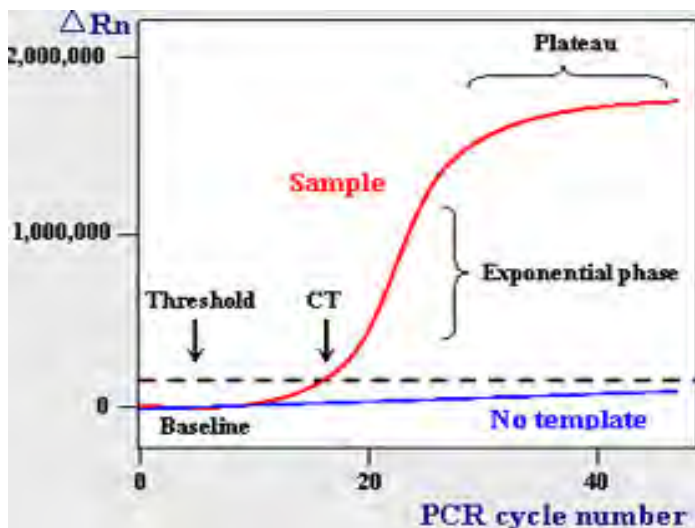
Εικόνα 12.PCR, Η εκθετική φάση και η φάση του Plateau

(<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture12/Lecture12.html>)

1.7.1.4 ΚΥΚΛΟΙ L ΚΑΙ Η ΦΑΣΗ PLATEAU

Η φάση του Plateau επέρχεται σαν συνέπεια των αλλαγών στις συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης. Συνεπώς όλα τα μόρια της πολυμεράσης, περίπου 3×10^{10} , θα εμπλακούν στην σύνθεση του DNA στόχου. Μετά από αυτό δεν μπορούν να πολλαπλασιάζονται όλα τα αντίγραφα κατά την διάρκεια κάθε κύκλου και για αυτό η εκθετική ενίσχυση δεν μπορεί να συνεχιστεί. Επιπροσθέτως, καθώς συσσωρεύετε το προϊόν της PCR και η αναλογία εκκινήτη/ προϊόντος μειώνεται, υπάρχει μεγάλη τάση για μη περαιτέρω εκθετική αύξηση του προϊόντος της PCR..

Γενικά είναι προτιμότερο να σταματάμε την PCR στους 30-35 κύκλους. Εάν αυτό είναι ανεπαρκές για να παραχθεί η επιθυμητή ποσότητα προϊόντος, τότε ένα υποπολλαπλάσιο της πρώτης PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μήτρα για την εκκίνηση μιας νέας PCR (nested PCR).



Εικόνα 13. Η κινητική συσσώρευση του προϊόντος στόχου κατά την διαδικασία της REAL TIME PCR. (Wilson K.E., et al 2004)

1.7.2 ΕΙΔΗ PCR

Οι διαδικασίες της PCR , όπως και πάρα πολλές άλλες τεχνικές που βασίζονται στο γένομα, καταγράφουν μόνο την παρουσία γενετικού υλικού χωρίς να προσφέρουν κάποια άλλη πληροφορία σχετικά με τη μολυσματικότητα του οργανισμού. Πολλές διαμάχες ξεσήκωσε και η άποψη ότι τα θετικά αποτελέσματα της PCR, έχουν μικρή ή και καθόλου ισχύ για την δημόσια υγεία σε επίπεδο μικροβιολογικής ποιότητας νερού, επειδή οι ιοί αδρανοποιούνται με την χρήση χλωρίου αλλά πάλι ανιχνεύονται από την PCR (Sobsey M.D., et al 1998).

Θεωρώντας σαν βάση την ύπαρξη της τεχνικής PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) δημιουργούνται νέες μέθοδοι οι οποίες είναι ‘θυγατρικές’ της αρχικής.

Μέσα από αυτές τις μεθόδους επέρχεται η προσπάθεια για βελτίωση των τεχνικών, ελαχιστοποίηση λάθους και μεγιστοποίηση της ευαισθησίας .

1.7.2.1 MULTIPLEX PCR

Η Multiplex PCR είναι μια παραλλαγή της PCR στην οποία δυο ή περισσότερα τμήματα DNA μπορούν ταυτόχρονα να αντιγραφούν με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών στην ίδια αντίδραση. Από την πρώτη της εμφάνιση το 1988 η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς σε πάρα πολλές περιοχές, συμπεριλαμβάνοντας αναλύσεις μεταλλάξεων και πολυμορφισμών (Henegariu O., et al 1997).

Επίσης μια επιπλέον εφαρμογή της παραπάνω τεχνικής είναι οι ταυτοποιήσεις παθογόνων, και διαγνώσεις γενετικών ασθενειών. Μπορεί να πολλαπλασιάσει θεωρητικά μέχρι και 13 στόχους DNA. Τα βήματα ανάπτυξης και ολοκλήρωσης μιας τέτοιας τεχνικής είναι κοινά σε κάθε σύστημα. (Mary C., et al).

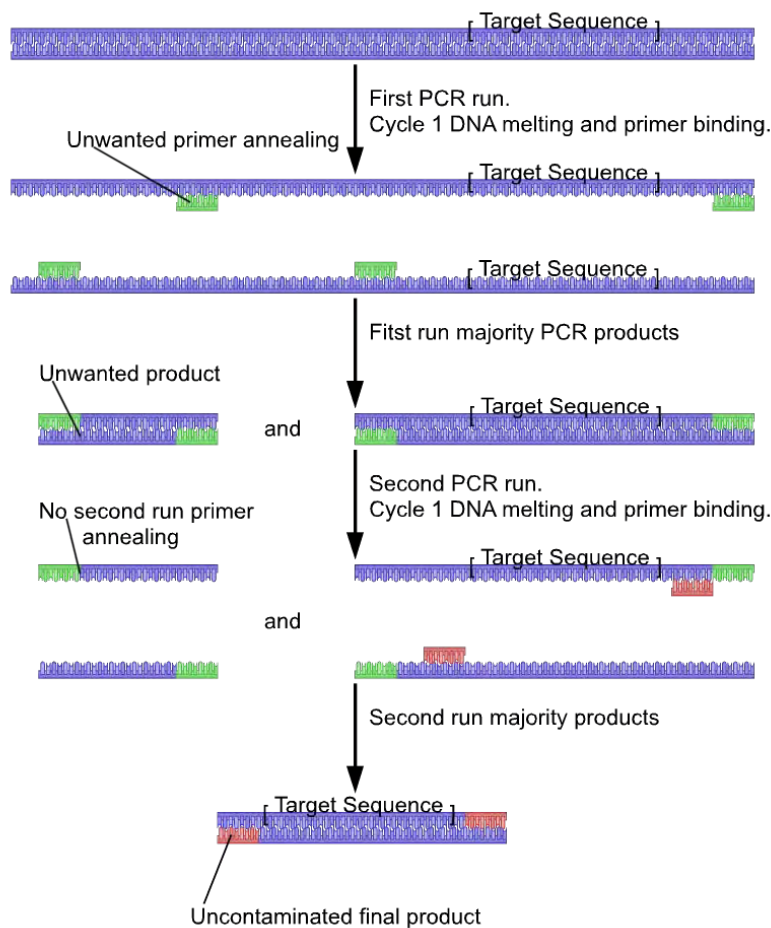
1.7.2.2 NESTED PCR

Με την χρήση της Nested PCR μπορούμε να αυξήσουμε ουσιαστικά την ευαισθησία της μεθόδου του προς εξέταση δείγματος (Van Heerden J., et al 2003 , Avellon 2001).

Πρόκειται για δυο διαδοχικές PCR (Allard A., et al 2001, Μιχαλάτος Μ.)

Η πρώτη PCR χρησιμοποιεί ένα εξωτερικό ζευγάρι εκκινητών (outer primers) ενώ η δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιεί δυο εσωτερικούς εκκινητές (inner primers) (Avellon A., et al 2001.).

Το προϊόν της 1^{ης} PCR αντίδρασης χρησιμοποιείται ως δείγμα στην δεύτερη PCR . Η δεύτερη PCR εμφανίζεται περίπου 1000 φορές πιο ευαίσθητη από την πρώτη (Αναστασιάδου Α , 2001).



Εικόνα 14. Διαδικασία nestedPCR

(<http://reference.findtarget.com/search/nested%2520primer/&usg?>)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ - ΘΕΤΙΚΟΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη αδενοϊών AD40 Dugan και AD41 ΤΑΚτα οποία προέρχονται από τον οργανισμό ATCC (Rockville, Maryland, USA). Τα συγκεκριμένα στελέχη AD40 και AD41 χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικοί μάρτυρες σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες καθώς επίσης και στον υπολογισμό της ευαισθησίας των μοριακών τεχνικών.

2.2 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στην συγκεκριμένη διατριβή εξετάστηκαν 24 δείγματα πόσιμου νερού για την ανίχνευση στελεχών εντερικών αδενοϊών. Συγκεκριμένα 15 δείγματα από την Κεντρική Ελλάδα, 4 δείγματα από την Βόρεια Ελλάδα, 1 δείγμα από την Ήπειρο και 4 δείγματα εμφιαλωμένου μεταλλικού νερού (Πίνακας 2.1).

ΤΟΠΟΣ	ΝΟΜΟΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
ΤΥΡΝΑΒΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	NTR 1	Ε.Τ
ΠΑΛΑΜΑΣ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	PL 2	Δ.Υ
ΑΓΙΟΚΑΜΠΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	ΑΓΚ 3	Δ.Υ
ΑΓΙΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	ΑΓ 4	Δ.Υ

ΑΡΜΕΝΙΟ	ΛΑΡΙΣΑΣ	ARM 5	Δ.Υ
ΘΕΡΜΗ	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	THES 26	Δ.Υ
ΛΑΡΙΣΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	SX 7	Ψ
ΒΡΥΟΤΟΠΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	BRT 8	Δ.Υ
ΣΕΡΡΕΣ	ΣΕΡΡΩΝ	SER 9	Δ.Υ
ΚΑΤΕΡΙΝΗ	ΠΙΕΡΙΑΣ	KAT 10	Δ.Υ
ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	ΤΡΙΚΑΛΩΝ	KAL11	Δ.Υ
ΙΤΕΑ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	ΙΤΕΑ 12	Δ.Υ
ΟΜΟΡΦΟΧΩΡΙ	ΛΑΡΙΣΑΣ	OMRF 13	Δ.Υ
ΓΙΑΝΟΥΛΗ	ΛΑΡΙΣΑΣ	GIAN 14	Δ.Υ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	ΙΟΑΝ 15	Δ.Υ
ΒΙΠΕ	ΛΑΡΙΣΑΣ	ΒΙΠΕ 16	Ε.Τ
ΕΜΦΙΑΛ. ΑΥΡΑ		ΑΥΡΑ 17	ΕΜ
ΕΜΦ. ΣΑΜΑΡΙΝΑ		SAM 18	ΕΜ
ΕΜΦ. ΖΑΓΟΡΙ		ZAG 19	ΕΜ
ΚΕΝΤΡΟ ΛΑΡΙΣΑΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	LAR 20	Δ.Υ
ΕΜΦ. ΛΟΥΤΡΑΚΙ		LOUT 21	ΕΜ
ΒΟΛΟΣ	ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	BOL 22	Δ.Υ
ΚΟΖΑΝΗ	ΚΟΖΑΝΗΣ	KOZ 23	Δ.Υ
ΣΚΑΛΟΧΩΡΙ	ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	SKAL 24	Δ.Υ

Πίνακας 2.1. Περιβαλλοντικά δείγματα πόσιμου νερού, τα οποία συλλέχτηκαν από διάφορα μέρη της Ελλάδας

2.3 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ

Εξαιτίας του μεγάλου όγκου των δειγμάτων, κατά την προσκόμιση τους στο εργαστήριο και λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των ιόν μέσα σε αυτά, πραγματοποιούνται πρώτα μέθοδοι συγκέντρωσης τους πριν την απομόνωση των ιόν. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή είναι η μέθοδος της προσρόφησης – εκλούσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα.

Η επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων πόσιμου νερού πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο βιολογικής προστασίας επιπέδου 2 (Biological Safety Level, BSL 2).

2.3.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ – ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΑΠΟ ΗΛΕΚΤΡΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΙΛΤΡΑ

Σε 4 λίτρα δείγματος νερού ρυθμίστηκε το PH στο 3,8 με την προσθήκη HCl 3N. Στη συνέχεια τα ικκά σωμάτια φορτίζονται θετικά παρουσία Mg^{2+} , με τη προσθήκη $Mg_2Cl_2 \cdot 6H_2O$ (Merck, Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,05M και ακολούθησε αργή ανάδευση μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση .

Ακολούθως χρησιμοποιήθηκε μια συσκευή φιλτραρίσματος (εικόνα 7) όπου τοποθετήθηκε ηλεκτραρνητικά φορτισμένο φίλτρο (MF-Millipore) διαμέτρου 47 mm και μέγεθος πόρου 3 μm και από όπου φιλτραρίστηκε ξεχωριστά το κάθε δείγμα με στόχο να προσροφηθούν στην επιφάνεια του φίλτρου τα ικκά σωμάτια. Ο χρόνος που χρειάστηκε για να ολοκληρωθεί το φιλτράρισμα του κάθε δείγματος ήταν διαφορετικός .

Το φίλτρο στη συνέχεια αφαιρέθηκε από τη συσκευή και τοποθετήθηκε σε τριβλίο petri όπου και υποβλήθηκε δυο φορές σε έκλυση με 10 ml διαλύματος που αποτελούνταν από: Tris 0.05M με PH=9 , εμπλουτισμένου με 3% BSA. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε με αργή ανάδευση για 10 λεπτά. Κατόπιν , το φίλτρο αφαιρέθηκε και φυλάχτηκε στους 4 °C ενώ το διάλυμα που προέκυψε με την ολοκλήρωση των παραπάνω διαδικασιών ρυθμίστηκε σε PH 7 με τη βοήθεια 3N HCl .

Στο διάλυμα που προέκυψε μετά την έκλυση προστέθηκε 10% PEG6000 (w/v) και NaCl (Sigma, USA) σε τελική συγκέντρωση 0,5M. Μετά από επώαση 18 ωρών με ανάδευση

στους 4 °C ακολούθησε φυγοκέντρωση για 1 ώρα στους 4 °C στις 11.000 rpm. Το ίζημα διαλύθηκε σε θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας MEM και τελικά προέκυψε ένα διάλυμα 2ml από κάθε δείγμα νερού. Το συγκεντρωμένο δείγμα φυλάσσεται στους - 20 °C.

2.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΚΟΥ DNA

Η εκχύλιση του ιικού DNA πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο του Casas (Casas et al., 1995). Όλη η διαδικασία λαμβάνει χώρα μέσα σε αποστειρωμένο χώρο (Συσκευή Καθέτου Νηματικής Ροής Βιολογικής ασφάλειας II) για να περιορίσουμε τις πιθανότητες μόλυνσης του δείγματος μας. Ακολουθώντας το πρωτόκολλο, τοποθετούμε σε ένα πλαστικό σωληνάριο των 2ml, 10μl glycogen μαζί με 100μl δείγματος και 300μl Lysis Buffer (4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol, 25 mM sodium citrate Merck, Germany). Έπειτα από καλή ανάδευση με vortex για ομογενοποίηση του μίγματος ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά σε συνθήκες δωματίου. Έπειτα προστίθενται 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης προκαλώντας την κατακρήμνιση του DNA, ακολουθεί ομογενοποίηση του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Στην συνέχεια φυγοκεντρείται στις 14000 rcf για 10λεπτά, στους (4°C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξεπλένεται με 500μl παγωμένης αιθανόλης 70%. Ύστερα από καλή ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 14000 rcf για 10λεπτά, στους (4°C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100μl ddH₂O.

2.5 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αδενοϊών παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2.

<i>PRIMER</i>	<i>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 5'→3'</i>
<i>ADHEX1F</i>	AACACCTAYGASTACATGAAC
<i>ADHEX2R</i>	KATGGGGTARAGCATGTT
<i>ADHEX2F</i>	CCCMTTYAACACCACCG
<i>ADHEX1R</i>	ACATCCTTBCKGAAGTTCCA
<i>HEXAA1885</i>	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC
<i>HEXAA1913</i>	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT
<i>NEHEXAA1893</i>	GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG
<i>NEHEXAA1905</i>	TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC
<i>VA3a</i>	CGCTG/CAGGCGT/CGCGCAGTC
<i>VA6</i>	CGCAGCACC/G/T/AGGATGCATCT
<i>VA3b</i>	CGGTAAGACGGGCGCAAT

(Πίνακας 2.2). Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή

2.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν PCR με τα εξής ζεύγη εκκινητών HEXAA1885/ HEXAA1913, ADHEX1F/ ADHEX2R και VA6/ VA3a, VA3b.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μ l/ tube δείγματος που περιέχει:

Ρυθμιστικό διάλυμα (Paq reaction Buffer 10x)	5 μ l/ tube
dNTPs 10mM, Invitrogen, UK	5 μ l/ tube
Primers	50 pmol
Paq5000 πολυμεράση 5u/ μ l, Strategene/USA	0.5 μ l/ tube
Δείγμα DNA	3 μ l/ tube
ddH ₂ O	έως τελικού όγκου 50 μ l

Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA μορίου στόχου στους 95^oC για 2 min και ακολουθεί η εφαρμογή διαφορετικών, για κάθε ζεύγος εκκινητών, συνθηκών αποδιάταξης υβριδοποίησης και επιμήκυνσης (πίνακας 2.3). Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 10 min στους 72 ^oC για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

PRIMERS	ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR	ΚΥΚΛΟΙ
ADHEX1F ACHEX2R	Αποδιάταξη : 95 ^o C για 30sec Υβριδοποίηση: 48 ^o C για 30sec Επιμήκυνση : 72 ^o C για 30sec	30 κύκλοι
VA3a VA6 VA3b	Αποδιάταξη : 95 ^o C για 30sec Υβριδοποίηση: 56 ^o C για 30sec Επιμήκυνση : 72 ^o C για 30sec	40 κύκλοι
HEXAA 1885 HEXAA 1913	Αποδιάταξη : 95 ^o C για 30sec Υβριδοποίηση: 64 ^o C για 30sec Επιμήκυνση : 72 ^o C για 30sec	30 κύκλοι

Πίνακας 2.3.: Συνθήκες PCR για τα ζεύγη εκκινητών της πρώτης PCR.

2.7 NESTED PCR ΚΑΙ AUTONESTED PCR

Θέλοντας να αυξήσουμε την ευαισθησία της αντίδρασης προβήκαμε και στην χρήση της nested και auto nested PCR.

Η αντίδραση των nested και autonested PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 μ l/ tube δείγματος που περιέχει:

Ρυθμιστικό διάλυμα (Paq reaction Buffer 10x)	5 μ l/ tube
dNTPs 10mM, Invitrogen, UK	5 μ l/ tube
Primers	50 pmol
Paq5000 πολυμεράση 5u/ μ l, Strategene/USA	0.5 μ l/ tube
Δείγμα DNA	5 μ l/ tube
ddH ₂ O	έως τελικού όγκου 50 μ l

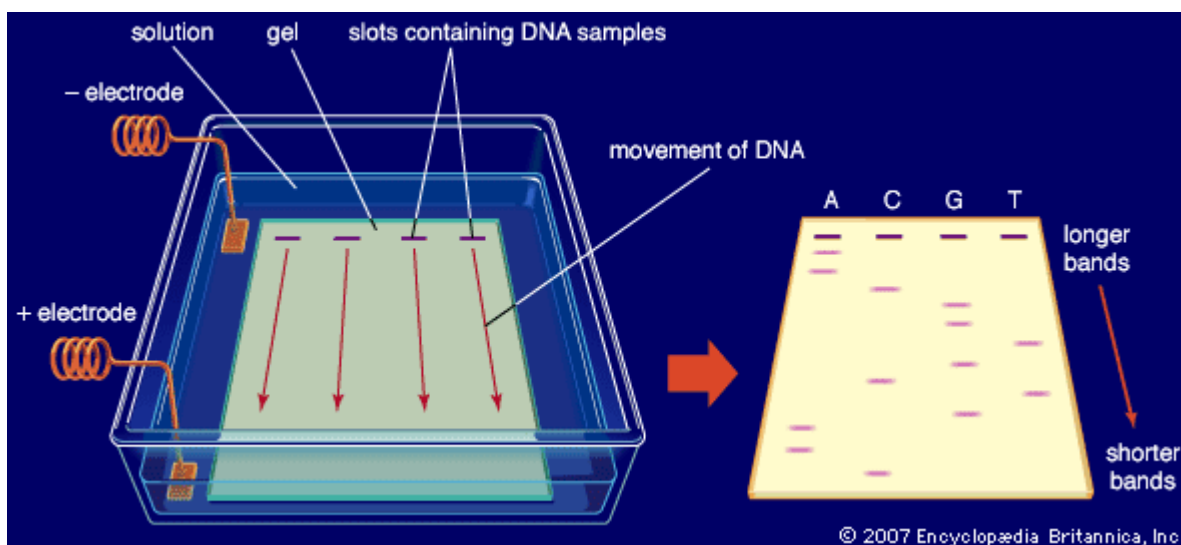
Οι συνθήκες των nested και autonested PCR παρουσιάζονται στον πίνακα 2.4.

PRIMERS	ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR	ΚΥΚΛΟΙ
ADHEX2F ACHEX1R	Αποδιάταξη : 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 52°C για 30sec Επιμήκυνση : 72°C για 30sec	40 κύκλοι
HEXAA 1893 HEXAA 1905	Αποδιάταξη : 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 64°C για 30sec Επιμήκυνση : 72°C για 30sec	40 κύκλοι
VA3a VA6 VA3b	Αποδιάταξη : 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 56°C για 30sec Επιμήκυνση : 72°C για 30sec	30 κύκλοι

(Πίνακας 2.4). Συνθήκες nested και autonested PCR .

2.8 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 2.1) των προϊόντων των nested και autonested PCR σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Pairsley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml . Από το εκάστοτε προϊόν της PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 5 μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης), μεταφέρονται στο πήκτωμα αγαρόζης . Για τον προσδιορισμό του μήκους των RT-PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους, στη συγκεκριμένη περίπτωση ο ΦΧ174 HaeIII (Invitrogen, UK) και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 120V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne).



Εικόνα 2.1. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης προϊόντων *pcr* σε πήκτωμα αγαρόζης

<http://www.britannica.com/EBchecked/media/40224/>

2.9 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Κατά την διάρκεια του καθαρισμού των προϊόντων της PCR , ηλεκτροφορούνται 40μl σε πήκτωμα αγαρόζης 2% όπου περιέχεται βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Οι αντίστοιχες ζώνες των προϊόντων της PCR αποκόπτονται από το πήκτωμα αγαρόζης και διοχετεύονται σε αποστειρωμένους σωλήνες 1,5ml. Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR από το πήκτωμα αγαρόζης, πραγματοποιήθηκε με το PCR clean up Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

2.10 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

2.10.1 AUTONESTED GOTAQ PCR

Τα καθαρισμένα προϊόντα των παραπάνω PCR ενισχύθηκαν περαιτέρω με τη χρήση του ενζύμου Go Taq PCR (Promega) για την παραγωγή μονόκλωνων polyA άκρων, απαραίτητων για την αντίδραση σύνδεσης με τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης.

Η αντίδραση της autonested GoTaq PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 µl/ tube δείγματος που περιέχει:

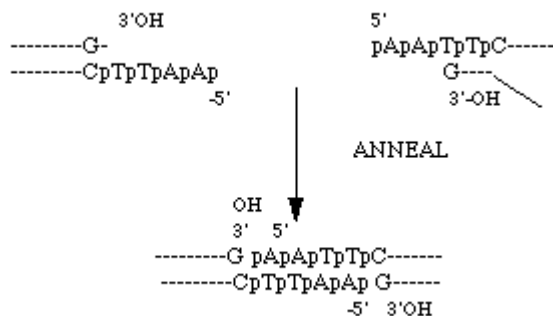
Ρυθμιστικό διάλυμα (Colorless GoTaq Flexi Buffer 5x)	10 µl/ tube
dNTPs 10mM, Invitrogen, UK	5 µl/ tube
Primers	50 pmol
MgCl ₂ (25mM)	4µl
GoTaq (5u/µl)	0.25 µl/ tube
Δείγμα DNA	2 µl/ tube
ddH ₂ O	έως τελικού όγκου 50µl

Η αντίδραση της autonested Go Taq PCR ξεκινά με αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2min. Ακολουθούν 20 κύκλοι αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμύκνωσης, στις συνθήκες που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2. Το τελικό στάδιο της αντίδρασης περιλαμβάνει την επώαση των δειγμάτων για 5min στους 72°C. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και η ανάκτησή τους με τη χρήση του προαναφερθέντος ΚΙΤ.

2.10.1.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ – ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΦΟΡΕΑ

Με την αντίδραση της λιγάσης, επιτυγχάνουμε την ενσωμάτωση του ενισχυμένου γενωμικού τμήματος, σε ένα φορέα κλωνοποίησης, το πλασμίδιο. Στην συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκε ως φορέας ο pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA) (εικόνα 2.2).

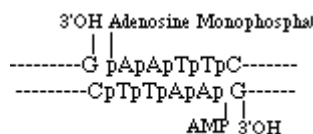
Το πλασμίδιο διαθέτει μια πολυσύνδετη περιοχή που περιέχει μονόκλωνες polyT ουρές. Τα προϊόντα που έχουμε ήδη από την αντίδραση της Autonested Go Taq PCR έχουν αποκτήσει μονόκλωνες polyA ουρές, οι οποίες είναι συμπληρωματικές αυτών του πλασμιδίου.



(Εικόνα 2.2). Σύνδεση των δυο κλώνων από την T4 λιγάση.

http://www.gatewaycoalition.org/files/Hidden/molec/ch3/3_3f.htm

Την σύνδεση αυτών των δυο μονόκλωνων άκρων πραγματοποιεί η T4 λιγάση, η οποία ενώνει με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς την 3' υδροξυλιομάδα με την 5' φωσφορική ομάδα, προκαλώντας την ένθεση του προϊόντος στο πλασμίδιο (Εικόνα 2.3).



(Εικόνα 2.3). Η DNA λιγάση παρουσία ATP και πραγματοποιεί φωσφοδιεστερικούς δεσμούς

http://www.gatewaycoalition.org/files/Hidden/molec/ch3/3_3f.htm

Η διαδικασία σύνδεσης με T4 λιγάση πραγματοποιήθηκε στους 25°C για 2h. Το μίγμα μας περιείχε pGEM[®]-T Easy Vector 50ng, προϊόν autonested GoTaq PCR, T4 DNA Ligase (3u/μl) και 1x Rapid Ligation Buffer.

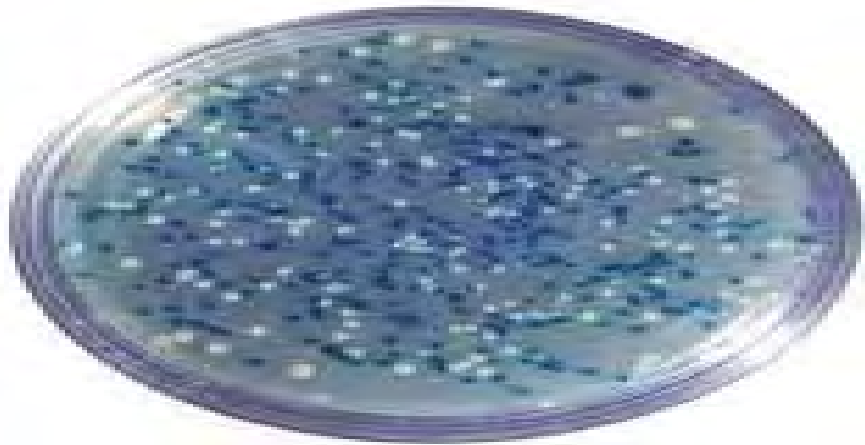
2.10.1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ με χρήση CaCl_2

Η διαδικασία ξεκινά με την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων DH5a , σε θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth (Sigma, USA). Η επώαση πραγματοποιείται στους 37°C , για 16 ώρες στις 210 στροφές/λεπτό. Μετράμε την απορρόφηση τους σε OD_{600} έως ότου φτάσει σε τιμή περίπου 400 όπου και σταματάμε την ανάπτυξή τους. Έπειτα από φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10λεπτά επαναδιαλύουμε το ίζημα σε παγωμένο CaCl_2 (Sigma, USA) συγκέντρωσης 0,1M και όγκου 1/5 της αρχικής καλλιέργειας. Ύστερα από ήπια ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10λεπτά. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε CaCl_2 συγκέντρωσης 0,1M και όγκου 1/25 της αρχικής καλλιέργειας. Τα δεκτικά κύτταρα μοιράζονται σε aliquots των 200μl.

2.10.1.3 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ

Για τον μετασχηματισμό των δεκτικών κυττάρων μεταφέρονται 5μl από την αντίδραση λιγάσης στα 200μl δεκτικών κυττάρων. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Το θερμικό σοκ των κυττάρων πραγματοποιείται στους 40°C για 90sec και μεταφορά τους στον πάγο για 2 λεπτά. Τα μετασχηματισμένα πλέον κύτταρα μεταφέρονται σε υπόστρωμα LB Broth και επωάζονται στους 37°C για 1ωρα στις 180 στροφές/λεπτό. Από τις υγρές καλλιέργειες 200μl επιστρώνονται σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα LB Agar (Scharlau, Spain) με αμπικιλίνη (100μg/ml). Κατά την επίστρωση προστίθενται 12μl X-gal (50mg/ml, Promega, USA). Επακολουθεί επώαση στους 37°C για 16 ώρες.

Ο ρόλος της αμπικιλίνης είναι να παρεμβαίνει στην σύνδεση μονάδων πεπτιδογλυκάνης αναστέλλοντας την δημιουργία κυτταρικού τοιχώματος. Με τον τρόπο αυτό επιτρέπεται μόνο η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί με το φορέα κλωνοποίησης. Ωστόσο τα βακτήρια που φέρουν το κλωνοποιημένο φορέα όταν βρίσκονται σε θρεπτικό υλικό με X-gal, παράγουν λευκές αποικίες και έτσι διακρίνονται από αυτά που δεν φέρουν τον κλωνοποιημένο φορέα. Λόγω της χρώσης του Xgal, περιμένουμε οι αποικίες με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο να είναι λευκές ενώ οι άλλες μπλε. (Εικόνα 2.4)

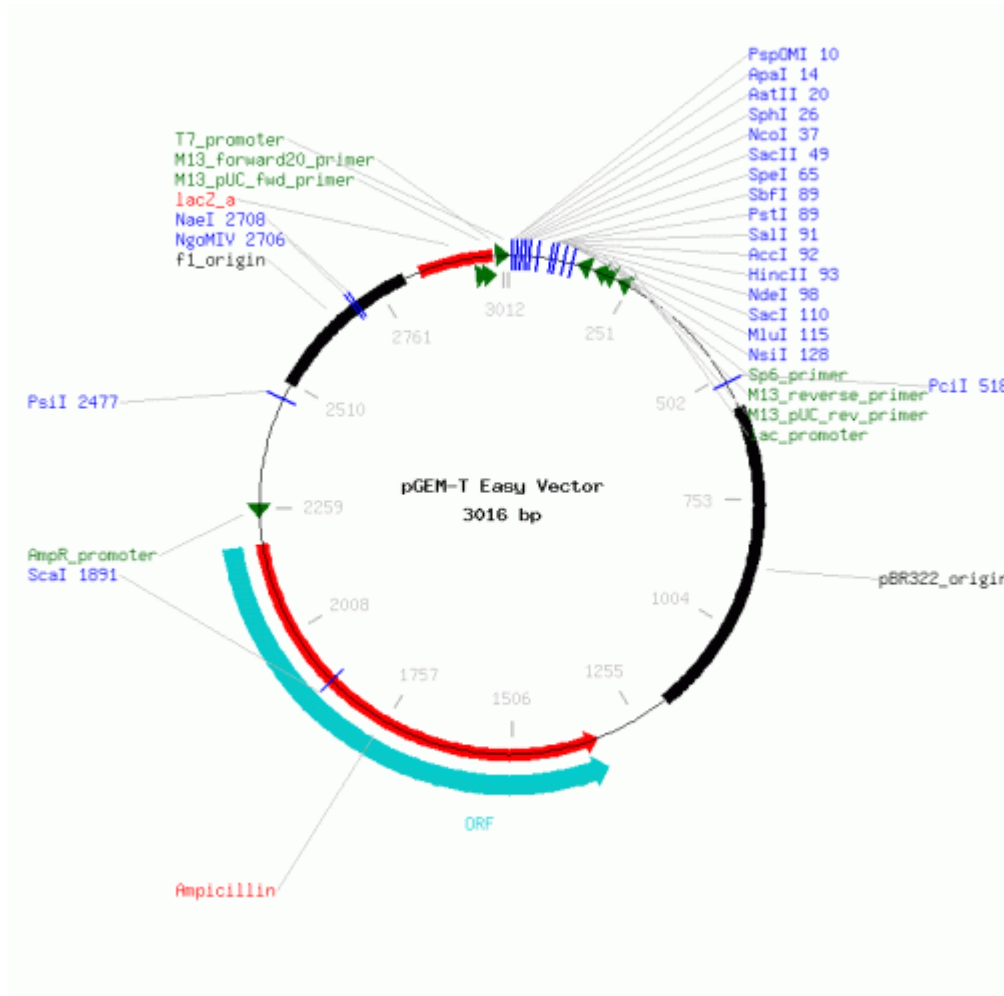


(Εικόνα 2.4). Τρυβλίο Petri με χρήση Xgal για επιλογή των βακτηρίων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (<http://www.edvotek.com/300?category=1794>)

Έπειτα από τη συλλογή των λευκών αποικιών ακολουθεί ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών σε LB Broth, το οποίο περιέχει αμπικιλίνη 100μg/ml. Τέλος, πραγματοποιείται εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, για να απομονωθεί ο ανασυνδυασμένος φορέας από τις λευκές αποικίες .

2.10.1.4 ΠΕΨΗ ΜΕ EcoRI

Με την ολοκλήρωση αυτής της αντίδρασης επιβεβαιώνεται η ένθεση ολόκληρου του ενθέματος στον φορέα κλωνοποίησης πραγματοποιώντας πέψη του φορέα με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI.



(Εικόνα 2.5). Φορέας κλωνοποίησης *p GEM – T Easy Vector*

<http://www.promega.com/catalog/search.asp?IsAd=0&SOption=Catalog&keyword=A1360>

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%.

Τα πλασμίδια στα οποία επιβεβαιώθηκε η παρουσία του ενθέματος εστάλησαν για αλληλούχιση στην Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

2.10.1.5 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των περιβαλλοντικών δειγμάτων πόσιμου νερού που προέκυψαν, μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους και την εξελικτική τους σχέση, συγκριτικά με άλλες αλληλουχίες εντερικών αδενίων που βρίσκονται καταχωρημένες στην παγκόσμια γονιδιακή τράπεζα δεδομένων (GenBank). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με χρήση συστημάτων βιοπληροφορικής που διατίθενται ελεύθερα στο διαδίκτυο.

```
Query 13 CCACTGTGGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTCACAGCGACTGACGCTGCGAT 72
          |||
Sbjct 98 CCACTGTGGCTCCGACCCACGATGTAACCACAGACAGGTCACAGCGACTGACGCTGCGAT 157

Query 73 TCGTGCCAGTCGACCGCGAGGATACCGCGTACTCGTACAA 112
          |||
Sbjct 158 TCGTGCCAGTCGACCGCGAGGACACCGCTTATTCTTACAA 197
```

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΑΠΟ ΗΛΕΚΤΡΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΙΛΤΡΑ

Η διαδικασία του φιλτραρίσματος των δειγμάτων πόσιμου νερού πραγματοποιήθηκε εντός 12 ωρών από την λήψη τους. Το κάθε δείγμα αντιστοιχούσε σε ποσότητα 4 λίτρων και απαιτήθηκε χρονική διάρκεια 30 λεπτών έως 6 ώρες για την ολοκλήρωση του φιλτραρίσματος του κάθε δείγματος. Ο διαφορετικός χρόνος φιλτραρίσματος του κάθε δείγματος έγκειται στην διαφορετική συγκέντρωση σωματιδίων που εμπεριέχονται μέσα στο δείγμα και εμποδίζουν την ροή του νερού διάμεσο των φίλτρων.

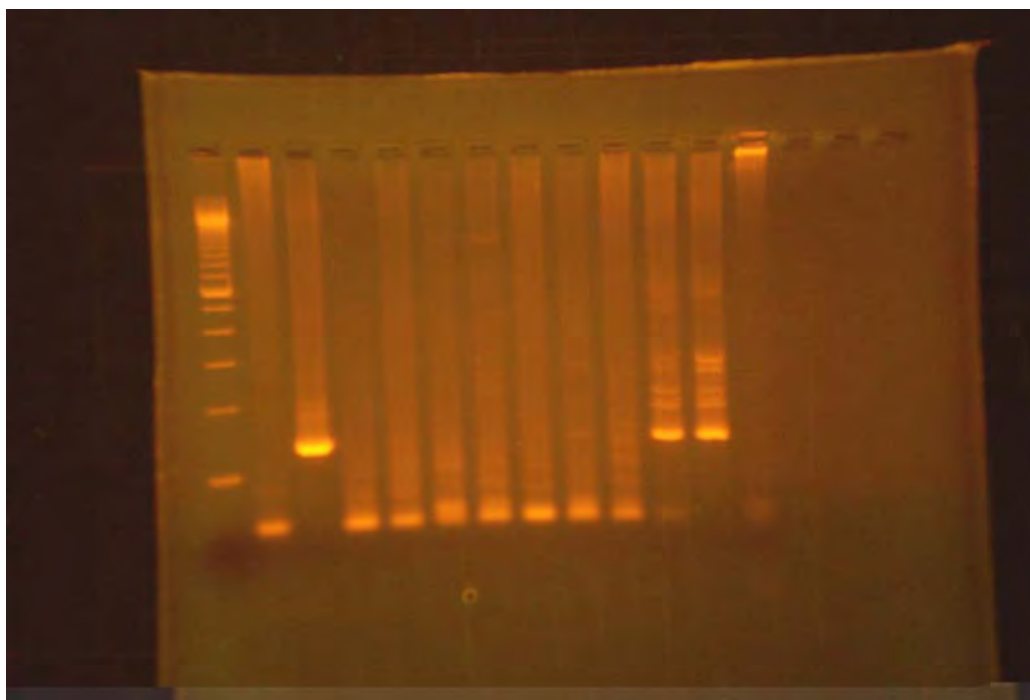
3.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Μετά την ολοκλήρωση των διαδικασιών φιλτραρίσματος και έχοντας σαν τελικό όγκο δείγματος 2ml ακολούθησαν μια σειρά μοριακών τεχνικών με σκοπό την ανίχνευση των εντερικών αδενιοίων, περιλαμβάνοντας την εκχύλιση, την PCR, την nested-PCR, την autonested-PCR και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων τους.

Συνολικά εξετάστηκαν 24 περιβαλλοντικά δείγματα, για ανίχνευση εντερικού αδενιοίου.

Με χρήση των εκκινητικών μορίων *HEXAA1885 – HEXAA1913* ανιχνεύθηκε αδενιοίος στελέχους 41 στο περιβαλλοντικό δείγμα KOZ23 το οποίο προήρχετο από το δίκτυο ύδρευσης της Κοζάνης (Εικόνα 3.1). Το αποτέλεσμα της αλληλούχισης των 140bp συγκρίθηκε με αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες στην τράπεζα GenBank με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (Εικόνα 3.2). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.2 το στέλεχος που ανιχνεύτηκε στο δείγμα KOZ23 ταυτοποιείται ως Αδενιοίος τύπου 41, με ποσοστό νουκλεοτιδικής ομοιότητας 96%.

Συμπερασματικά στην παρούσα διατριβή βρέθηκε θετικό μόνο ένα δείγμα, από όλα τα υπόλοιπα που χρησιμοποιήθηκαν . Η συγκεκριμένη μελέτη δημιουργήθηκε για την ελαχιστοποίηση ύπαρξης εντερικών αδενοϊών στο πόσιμο νερό.



*(Εικόνα 3.1), Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων μετά από εκχύλιση
(εκκινητικά μόρια HEXAA1885 – HEXAA1913, 25/05/2010)*

▼ Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [B](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HM565136.2	Human adenovirus 41 isolate NIVD103, complete genome	163	163	90%	2e-37	96%	
HQ005289.1	Human adenovirus 41 strain 503214/KOL/2009 hexon gene, partial cd	163	163	90%	2e-37	96%	
HQ005286.1	Human adenovirus 41 strain 500746/KOL/2008 hexon gene, partial cd	163	163	90%	2e-37	96%	
HQ005285.1	Human adenovirus 41 strain 503631/KOL/2009 hexon gene, partial cd	163	163	90%	2e-37	96%	
HQ005283.1	Human adenovirus 41 strain 503605/KOL/2009 hexon gene, partial cd	163	163	90%	2e-37	96%	
HQ005282.1	Human adenovirus 41 strain 503030/KOL/2009 hexon gene, partial cd	163	163	90%	2e-37	96%	
HQ005281.1	Human adenovirus 41 strain 500860/KOL/2008 hexon gene, partial cd	163	163	90%	2e-37	96%	
GQ925267.1	Human adenovirus 41 isolate ADV41/US/270607 hexon gene, partial c	163	163	90%	2e-37	96%	
GQ925266.1	Human adenovirus 41 isolate ADV41/KS/270607 hexon gene, partial c	163	163	90%	2e-37	96%	
GQ925265.1	Human adenovirus 41 isolate ADV41/BS/270607 hexon gene, partial c	163	163	90%	2e-37	96%	
GQ925264.1	Human adenovirus 41 isolate ADV41/KS/290507 hexon gene, partial c	163	163	90%	2e-37	96%	
GQ925263.1	Human adenovirus 41 isolate ADV41/US/290507 hexon gene, partial c	163	163	90%	2e-37	96%	
GQ925262.1	Human adenovirus 41 isolate ADV41/BS/290507 hexon gene, partial c	163	163	90%	2e-37	96%	
GQ925261.1	Human adenovirus 41 isolate ADV41/US/200307 hexon gene, partial c	163	163	90%	2e-37	96%	
GQ925260.1	Human adenovirus 41 isolate ADV41/BS/200307 hexon gene, partial c	163	163	90%	2e-37	96%	
GQ925259.1	Human adenovirus 41 isolate ADV41/US/230107 hexon gene, partial c	163	163	90%	2e-37	96%	
GQ925258.1	Human adenovirus 41 isolate ADV41/BS/230107 hexon gene, partial c	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905453.1	Human adenovirus 41 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905451.1	Human adenovirus 41 isolate 27388 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905450.1	Human adenovirus 41 isolate 26988 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905449.1	Human adenovirus 41 isolate 26050 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905448.1	Human adenovirus 41 isolate 25055 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905447.1	Human adenovirus 41 isolate 11058 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905446.1	Human adenovirus 41 isolate 9718 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905445.1	Human adenovirus 41 isolate 8881 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905444.1	Human adenovirus 41 isolate 994 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905443.1	Human adenovirus 41 isolate 909 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905442.1	Human adenovirus 41 isolate 742 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905441.1	Human adenovirus 41 isolate 593 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905440.1	Human adenovirus 41 isolate 569 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905439.1	Human adenovirus 41 isolate 345 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905438.1	Human adenovirus 41 isolate 277 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	
FJ905437.1	Human adenovirus 41 isolate 274 hexon protein gene, partial cds	163	163	90%	2e-37	96%	

(Εικόνα 3.2) Αποτελέσματα αλληλούχισης νουκλεοτιδικής αλυσίδας μέσω του BLAST, εν μέσω του οποίου αποδεικνύεται η ύπαρξη αδενοϊού 41 σε ποσοστό ομοιότητας 96%

4.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το νερό θεωρείται η περισσότερο διαδεδομένη χημική ένωση και είναι απαραίτητη σε όλες τις μορφές ζωής του πλανήτη μας. Η περιεκτικότητα νερού στους οργανισμούς ανέρχεται σύμφωνα με μελέτες στο 60% - 70% . Για τον λόγο αυτό θα πρέπει να είναι αβλαβές και να μην προκαλεί μολύνσεις και παρενέργειες στους οργανισμούς.

Το πόσιμο νερό ειδικότερα ,σύμφωνα με τις οδηγίες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO), θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από διαύγεια , να είναι άχρωμο και άοσμο. Απαραίτητο κρίνεται να εξετάζεται φυσικώς (θερμοκρασία, διαύγεια, γεύση και οσμή) , χημικώς (ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός ουσιών), μικροσκοπικώς (πιθανότατη ανίχνευση μικροοργανισμών) και τέλος τοπογραφικώς (έλεγχος της διαδρομής του νερού).

Η μόλυνση του πόσιμου νερού μπορεί να προέλθει από πάρα πολλούς μικροοργανισμούς είτε σαπροφυτικούς είτε παθογόνους, οι οποίοι μετά την είσοδο τους στο νερό εισέρχονται στον άνθρωπο. Υπάρχουν πάρα πολλά είδη εντερικών ιών που μπορούν να προσβάλουν τον ανθρώπινο οργανισμό (Carter M.J. 2004) και μια από τις ομάδες αυτές είναι των εντερικών αδενοϊών 40 και 41 (Grabtree et al.1997).

Το γένος των αδενοϊών ανήκει στην οικογένεια Adenoviridae (Benko et al.2003). Στην οικογένεια ταξινομούνται 51 είδη ιών και μεταξύ αυτών οι εντερικοί ιοί είναι δυνατόν να ανευρίσκονται στο πόσιμο νερό σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (Brandt et al.1985, Albert et al.1986, Unhoo et al.1986).

Οι μολύνσεις από εντερικούς αδενοϊούς συχνά σχετίζονται με σοβαρές επιδημίες γαστρεντερίτιδας (Fields et al.1996). Είναι εξαιρετικά σταθεροί και ανθεκτικοί στις φυσικοχημικές διαδικασίες καθαρισμού των υδάτων (Estes et al.1979). Σαν επιδημιολογικά χαρακτηριστικά έχουν το κοινό γνώρισμα ότι μεταδίδονται με τα σταγονίδια και με το νερό , (Adrian et al.1989, Brown et al.1990).

Η ανίχνευση τους αποτελεί πρόκληση λόγω της μικρής συγκέντρωσης τους στο πόσιμο νερό (Griffin et al.2003, Lipp et al.2001) .

Η επιτυχής ανίχνευση των αδενοϊών ξεκινά από την συγκέντρωση των ιών και την μετέπειτα ανίχνευση και ταυτοποίηση τους μέσω μοριακών τεχνικών .

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 24 δείγματα πόσιμου νερού από διαφορετικά μέρη της Ελλάδας. Ο αρχικός όγκος συλλογής των δειγμάτων ήταν 4lt και μετά την συγκέντρωση ο

τελικός όγκος ήταν 2ml. Ακολουθήθηκε η διαδικασία της PCR και της nested PCR παρέχοντας επιπλέον ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του γενόματος των αδενοϊών. Η όλη διαδικασία ολοκληρώθηκε με την κλωνοποίηση και εν συνεχεία την αλληλούχιση του μοναδικού θετικού δείγματος. Από το δείγμα αυτό ταυτοποιήθηκε ο αδενοϊός 41. Το δείγμα αυτό με το κωδικό KOZ23 προήρχετο από το δίκτυο ύδρευσης της πόλης της Κοζάνης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Feijadi T, Tarnoczai T. Homonnay ZG 2010, Presence bacterial pathogens in a municipal drinking water supply system, Eotvos Loránd University Department of Microbiology, Pazmany Peter stny. 1/c H-1117 Budapest Hungary.
2. Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., and Tauxe, R.V.(1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607-625.
3. Grabtree, K.D., Gerba, c.p., Rosde,J.B., and Haas, C.N. (1997). Waterborne adenoviruses – a risk assessment. *Water Sci Technol* 35, 1-6.
4. Enriquez, C.E., Hurst, C.J., Gerba, C.P. (1995). Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and waste water. *Water Res.* 29 : 2548-2553.
5. Brandt, C.D., and Kim, H.W. (1985). Adenoviruses and pediatric gastroenteritis . *Infect Dis* 151, 437-443.
6. Albert, M.J. (1986). Enteric adenovirus brief review. *Arch Virol.* 88, 1-17.
7. Unhoo .I., Wadell. G., Svensson, L., Olding – Stenkvist, E. and Mobby, R. (1986). Aetiology and epidemiology of acute gastroenteritis in Swedish children. *Infect* 13, 73-89.
8. Benkö, M. and Harrach, B. (2003) Molecular evolution of adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 272, 3-35.
9. Brandt, C.D., Kim, H.W., Vargosko, A.J., Jeffries, B.C., Arrobio, J.O., Rindge, B., Parrott, R.H., Chanock, R.M. Infections in 15.000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. Adenovirus pathogenicity in relation to

- serologic type and illness syndrome. *Am. Epidemiol.* 90 (1969) p.484-&.
10. Shenk, T.,(2001) Adenoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology* ed. Knipe, D.M, and Howely, P.M. pp.2265-2300 New York: Lippincott-Raven
 11. Benko, M., Harrach. B., Russell, W.C. Family Adenoviridae In *virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Van Regenmortel, M.H.V., Bishop, C.M.F., , D.K.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McCeech, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., Eds, Academic Press Inc.: New York (1999) p.227-238.
 12. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley , P.M. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott – Raven publishers ,(1996) p. 2111-2138.
 13. Flewett , T.H., Bryden, A.S., Davies, H., Morris, C.A. (1975) . Epidemic viral enteritis in a long –stay children’s ward. *Lancet* 1: p.4-5.
 14. Carter M.J., Enterically infecting viruses: pathogenicity, trasmission and significance for food and waterborne infection (2004).
School of Biomedical and Molecular Sciences, University of Surrey , Guilford
 15. Estes, M.K., Grarham,D.Y., Smith, E.M., and Gerba, C.P. (1979). Rotavirus stability and inactivation. *Gen Virol* 43, 403-409
 16. Adrian , T. and Wigand,R. (1989) Genome type analysis of adenovirus 31, a potential causative agent of infants enteritis. *Arch. Virol* 105, 81-87
 17. Brown, M. (1990). Laboratory identification of adenoviruses associated with gastroenteritis in Canada from 1983 to 1986. *Clin. Microb.* 28, 1525-1529.

18. Rosa-Calatrava M, Moriscot C, Ruigrok RW, Boulanger P, Schoehn G.(2009)The C-terminal domains of adenovirus serotype 5 protein IX assemble into an antiparallel structure on the facets of the capsid. *J. Virol.* ,83 (2):1135-1139.
19. Goswami, B.B., Koch, W.H., and Gebula , T.A. (1993). Detection of hepatitis A virus in Mercenaria by coupled reverse transcription and polymerase chain reaction. *Appl. Environmental Microiology* 59, 2765-2770.
20. Graff, J., Ticehurst, J., and Flehmig, B. (1993). Detection of hepatitis virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiology* 59, 3165-3170.
21. Tsai, Y.L., Sobsey, M.D., Sangermano, L.R. and Palmer, C.J. (1993). Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis –A virus sewage and ocean water for rapid detection reverse transcriptase – polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3488-3491.
22. Laykus, L.A., de Leon, R., and Sobsey, M.D. (1996). A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligo-probe hybridisation. *Appl. Environ. Microbiology* 62, 2074-2080
23. Schwab, K.J., de Leon, R. and Sobsey, M.D., (1996). Immunoaffinity concentration and purification of water-borne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2086-2094
24. Puig, M., Jofre, J., Luccena, f., Allard, A., Wadell, G. and Girones, R. (1994). Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted water by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol* 60, 2963-2970.
25. Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J. and Girones, R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol* 64, 3376-3382.

26. WHO.(2010). Guidelines for Drinking Quality Water, 2nd edition. Health Criteria and other Supporting Information. Geneva : World Health Organization
27. Lipp, E.K., Lukasik, J., Rose, J.B. (2001). Human enteric viruses and parasites in the marine environment. *Method. Microbiol.* 30: 559-588
28. Griffin, D.W., Donaldson, K.A., Paul, J.H., Rose, J.B. (2003) .Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin . Microbiol.Rev.*,16 :129-143
29. Hierholzer, J.C., Wigand R, Anderson, L.J., Adrian, T, Gold, J.W.M.(1988) . Adenoviruses from patients with AIDS : a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (type 43-47). *Journal of Infections Diseases* 158 : 804-813
30. Tiemessen ,C.T.,and Nel, M.J.(1996). Detection and typing of subgroup F adenoviruses using the polymerase chain reaction. *Viol. Methods* 59, 73-82
31. Susan D. Saban,¹ Mariena Silvestry,¹ Glen R. Nemerow,² and Phoebe L. Stewart^{1*}*Department of Molecular Physiology and Biophysics, Department of Immunology, The structure of adenovirus was determined to a resolution of 6 Å by cryoelectron microscopy (cryoEM)*
32. Lurier, S.E., Darnell Jr., J. E., Baltimore, D. and Campbell, A., *General Virology* 1978, p. 36.
33. Everitt, E., B. Sundquist, U. Pettersson, and L. Philipson.(1973). Structural proteins of adenoviruses. Isolation and topography of low molecular weightantigens from the virion of adenovirus type 2. *Virology* 52:130-147.
34. Chatterjee, M.E. Vayda,T. and Flint S. J. (1985). Interactions Among the Three Adenovirus Core Proteins.*J Virol.* 55, 379-386

35. Van Oostrum, J. & Burnett, R. M. (1985). Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J Virol* 56, 439–448.
36. Stewart, P. L., S. D. Fuller, and R. M. Burnett. 1993. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J.* 12:2589-2599.
37. Vellinga J., Stephanie Van den Heijdt, Rob C. Hoeben. (2005) . The adenovirus capsid: major progress in minor proteins *J. Gen. Virol.* 86, 1581-1588..
38. Stewart, P.L., Burnett R.M., Gurklaff M. and Fuller S.D. (1991). Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell*, 67, 145-154.
39. Αναστασιάδου Κ., Καπράνος Ν. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και οι κλινικές της εφαρμογές. (1998), 12(3) : 100-108.
40. I. Casas, L. Powell, P. E. Klapper and G. M. Cleator. *Journal of Virological methods*, volume 53,(1) 1995, 25-36.
41. Mullis K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. 1990: 48(8): 579-582.

ΒΙΒΛΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

- Knipe, Howley, Griffin, "Fields Virology" 5th edition
- Albert Bosch,(2007) Human Viruses in Water, Barcelona, Spain p.27-28
- Recombinant DNA , James Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski , Alan Zoller . Second Edition , Scientific American Books , 1983. (4) p.100-111, (6) p.171-183