



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**Εργαστήριο Μικροβιολογίας**  
**Διευθύντρια Ευθυμία Πετεινάκη**

**Διδακτορική Διατριβή**

**«ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ  
ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ, ΑΔΕΝΟΪΩΝ, ΡΟΤΑΪΩΝ, ΑΣΤΡΟΪΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΜΕ  
ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ»**

υπό

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ ΒΟΝΤΑ**

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος  
Λάρισα, 2019

© 2019 Αλέξανδρος Βόντας

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (1<sup>η</sup>/18/9/2019 ΓΣΕΣ):

- |   |   |
|---|---|
| <b>1<sup>ος</sup> Εξεταστής<br/>(Επιβλέπουσα)</b> | <b>Ευθυμία Πετεινάκη</b><br>Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας,<br>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας      |
| <b>2<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                   | <b>Χριστάκης Χατζηχριστοδούλου</b><br>Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,<br>Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας                  |
| <b>3<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                   | <b>Βασίλειος Κρικέλης</b><br>Καθηγητής Μικροβιολογίας - Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικών<br>Εργαστηρίων, ΤΕΙ Θεσσαλίας                          |
| <b>4<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                   | <b>Γεώργιος Ραχιώτης</b><br>Αναπληρωτής Καθηγητής Επιδημιολογίας και Επαγγελματικής<br>Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας |
| <b>5<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                   | <b>Κωνσταντίνος Μακαρίτης</b><br>Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής,<br>Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας                            |
| <b>6<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                   | <b>Κωνσταντίνος Παπαγιαννίσης</b><br>Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,<br>Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας             |
| <b>7<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>                   | <b>Χρήστος Ζηλίδης</b><br>Καθηγητής Κοινωνικής Ιατρικής και Επιδημιολογίας, Γενικό Τμήμα,<br>Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας                     |

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστώ την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κα. Ευθυμία Πετεινάκη καθώς και τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Καθηγητές κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου και κ. Βασίλειο Κρικέλη για την βοήθεια τους στην ολοκλήρωση της διατριβής. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Κρικέλη, όπου με την στήριξη του απέκτησα πολύτιμη εμπειρία στον τομέα της Ιολογίας.

Τέλος, ευχαριστώ την σύζυγο μου για την υπομονή και την συμπαράσταση της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

### 1. Μεταπτυχιακές σπουδές

MSc στη ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ με εξειδίκευση στον τομέα « ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ », του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Ιούλιος 2008

### 2. Προπτυχιακές σπουδές

Πτυχίο ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ του τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων της Σχολής Επιστημών Υγείας του Τ.Ε.Ι. Λάρισας, Ιούνιος 1999

### 3. ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ

#### α) Ερευνητική δραστηριότητα

Συμμετοχή σε 6 ερευνητικά προγράμματα

9 Δημοσιεύσεις σε περιοδικά με κριτές

3 ανακοινώσεις εργασιών σε διεθνή συνέδρια

2 ανακοινώσεις εργασιών σε πανευρωπαϊκά συνέδρια

18 ανακοινώσεις εργασιών σε πανελλήνια συνέδρια

#### β) Εκπαιδευτική εμπειρία

9/2000 - 12/2018 εργαστηριακός συνεργάτης και ακαδημαϊκός υπότροφος με αυτοδύναμο διδακτικό έργο στα εργαστήρια Βακτηριολογίας και Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων ΤΕΙ Θεσσαλίας

1/2019 - 6/2019 ακαδημαϊκός υπότροφος με αυτοδύναμο διδακτικό έργο στα εργαστήρια Βακτηριολογίας και Ιολογίας του Προγράμματος Σπουδών Ιατρικών Εργαστηρίων του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**«ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ  
ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ, ΑΔΕΝΟΪΩΝ, ΡΟΤΑΪΩΝ, ΑΣΤΡΟΪΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΜΕ  
ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ»**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΒΟΝΤΑΣ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2019

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Ευθυμία Πετεινάκη**, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (**Επιβλέπουσα**)
2. **Χριστάκης Χατζηχριστοδούλου**, Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Βασίλειος Κρικέλης**, Καθηγητής Μικροβιολογίας - Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, ΤΕΙ Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Νόροϊοι, Ρόταϊοι, Αδένοϊοι και Άστροϊοι αποτελούν σημαντικά παθογόνα του ανθρώπου που σχετίζονται με την πρόκληση γαστρεντερίτιδας. Οι Νόροϊοι, Ρόταϊοι και Άστροϊοι είναι RNA ιοί γεγονός που τους καθιστά ευμετάβλητους ενώ οι Αδένοϊοι έχοντας γονιδίωμα DNA είναι λιγότερο επιρρεπείς στις γενετικές αναδιατάξεις. Οι γενετικές ομάδες που έχουν συσχετισθεί με πρόκληση γαστρεντερίτιδας στον άνθρωπο είναι για τους Νόροϊους GI, GII και GIV, για τους Ρόταϊους της ομάδας A οι G1, G2, G3, G4, G9 και G12, για τους Αδένοϊους οι ορότυποι 40 και 41, για τους Άστροϊούς οι ορότυποι HastV 1-8.

Τα επιδημιολογικά δεδομένα για την Ελλάδα όσον αφορά τις γαστρεντερίτιδες ιογενούς αιτιολογίας οφειλόμενες στους Νόροϊους, Ρόταϊους, Αδένοϊους και Άστροϊους είναι λιγότερα συγκριτικά με τα αντίστοιχα των αναπτυγμένων χωρών. Στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκε έρευνα σε μοριακό επίπεδο για την ταυτοποίηση και γονιδιακή ανάλυση των ιικών στελεχών που προκαλούν γαστρεντερίτιδα στον άνθρωπο με στόχο να αναγνωρισθεί το γενοτυπικό προφίλ τους και τυχόν μεταβολές αυτού. Παράλληλα, επιδιώκεται και μία εκτίμηση των διαγνωστικών προσεγγίσεων που χρησιμοποιούνται στο κλινικό εργαστήριο για την ανίχνευση τους. Για την επίτευξη των στόχων συλλέχθηκαν 640 διαρροϊκά δείγματα κοπράνων από νοσηλευόμενους ασθενείς κατά τη χρονική περίοδο 2008-2013 που είχαν αποσταλεί από τις κλινικές του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας στο εργαστήριο μικροβιολογίας για την αναζήτηση εντεροπαθογόνων. Μέρος του δείγματος, συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-80 °C). Καταγράφηκαν στοιχεία σχετικά με φύλο, ηλικία και ημερομηνία. Στο σύνολο των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε screening με real time PCR όπου ανιχνεύθηκαν 105 δείγματα θετικά σε Ρόταϊους, 51 δείγματα θετικά σε Νόροϊους, 23 θετικά σε Αδένοϊους και 2 θετικά δείγματα σε Άστροϊους. Το υψηλό ποσοστό θετικών δειγμάτων σε Ρόταϊους αιτιολογείται από τη μικρή μολυσματική δόση, το μεγάλο ιικό φορτίο που αποβάλλεται στα κόπρανα και την αυξημένη ανθεκτικότητα που παρουσιάζει ο ιός στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Στα θετικά δείγματα ακολούθησε συμβατική PCR για τον καθορισμό των γονιδιακών τύπων. Στους Ρόταϊους, ο πιο συχνός τύπος που ανιχνεύθηκε ήταν ο G4P[8] και ο αμέσως επόμενος ήταν ο

G1P[8]. Κατά τη μελέτη μας πραγματοποιήθηκε και η τυποποίηση ενός σημαντικού αριθμού θετικών δειγμάτων Ροταϊών με τη χρήση multiplex PCR. Στους Νόροϊους τα 47 εξ' αυτών τυποποιήθηκαν ως GII και τα 4 ως GI. Σε ενδεικτική περαιτέρω μοριακή τυποποίηση θετικών με τη Real Time PCR δειγμάτων, έξι δείγματα τύπου GII βρέθηκε ότι ανήκουν στο γενότυπο GII.4 ενώ ένα δείγμα του τύπου GI ανήκε επίσης στο γενότυπο GI.2. Η φυλογενετική ανάλυση επέδειξε ότι όλα τα στελέχη των οποίων οι αλληλουχίες αναγνώστηκαν είναι όμοια σε μεγάλο βαθμό με στέλεχη που κυκλοφορούν παγκοσμίως. Στην εκτίμηση των διαγνωστικών προσεγγίσεων που χρησιμοποιούνται στο κλινικό εργαστήριο για την ανίχνευση της παρουσίας ροταϊών πραγματοποιήθηκε σύγκριση ανοσοχρωματογραφικού τεστ ICT, συμβατικής PCR, και real time RT-PCR όπου διαπιστώθηκε ότι η ευαισθησία του ανοσοχρωματογρα-φικού τεστ (ICT) και της συμβατικής cPCR είναι σχεδόν παρόμοια με τιμές 75,24% και 77,14% αντίστοιχα.



## Summary

Noroviruses, Rotaviruses, Adenoviruses and Astroviruses constitute important human pathogens which cause gastroenteritis illness. Noroviruses, Rotaviruses and Astroviruses contain RNA genome therefore manifesting increased genetic variability, while Adenoviruses which are DNA viruses, are less prone to genetic variation. The genetic groups correlated to gastroenteritis illness in humans are Norovirus GI, GII and GIV, Rotaviruses group A G1, G2, G3, G4, G9 and G12, and for Astroviruses serotypes \*HastV 1-8.

Epidemiological data for Greece concerning viral gastroenteritis due to Noroviruses, Rotaviruses, Adenoviruses and Astroviruses are less compared to relative data from developed countries. In the present dissertation, research was performed at the molecular level for the identification and genetic analysis of viral strains which cause gastroenteritis in humans with the aim to recognize their genotypic profile and genetic variation. In parallel, an attempt was made to evaluate diagnostic methods used for their detection in the clinical laboratory. A total of 640 diarrheal stool samples were collected from hospitalized patients during the period 2008-2013 and sent by clinics of University hospital in Larissa to the microbiology laboratory for the detection of enteropathogens. Part of the sample was collected and stored at -80°C. Patient data were registered (sex, age, date). All samples were screened using real time PCR where there were detected 105 positive samples for Rotaviruses, 51 positive for Norovirus, 23 positive for Adenoviruses and 2 positive for Astroviruses. The high number of positive samples to Rotaviruses is explained by the low infectious dose, the increased viral load excreted in stools and increased resistance Rotaviruses exhibit in environmental conditions. Positive samples were screened by conventional PCR to determine genotypes. In Rotaviruses, type G4P[8] was mostly detected followed by G1P[8]. During our study there was performed the typing of a significant number of Rotaviruses from clinical samples by multiplex PCR. In Noroviruses, 47 were typed as GII and 4 as GI. In further molecular typing of positive samples by Real Time PCR, six type GII viruses were found to belong to genotype GII.4 while one virus of type GI to genotype GI.2. Phylogenetic analysis of

viral sequences showed that the majority of these viruses were identical to circulating viral strains, worldwide. Concerning the evaluation of diagnostic approaches to Rotavirus detection employed in the clinical laboratory, there were compared an immunochromatography assay (ICT), a conventional PCR, and a real time RT-PCR, which showed that the sensitivity of ICT and cPCR are about the same, with values of 75,24% and 77,14%, respectively.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vii
	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	xi
	ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xvii
	ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xix
	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΡΟΤΑΪΟΙ	
1.1.	ΔΟΜΗ	2
1.2.	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	3
1.3.	ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ	4
1.4.	ΚΥΚΛΟΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ	5
1.4.1.	ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ	6
1.4.2.	ΕΙΣΟΔΟΣ ΚΑΙ ΑΠΕΚΔΥΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ	7
1.4.3.	ΣΥΝΘΕΣΗ mRNA	8
1.4.4.	ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΡΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	9
1.4.5.	ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ RNA, ΣΥΝΘΕΣΗ ssRNA ΑΡΝΗΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ DLP	11
1.4.6.	ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΙΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ	11
1.4.7.	ΕΜΜΕΝΟΥΣΑ ΛΟΙΜΩΞΗ	12
1.4.8.	ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΡΟΤΑΪΩΝ	12
1.5.	ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	13
1.6.	ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΗ	15
1.6.1.	ΕΙΔΙΚΗ ΧΥΜΙΚΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΗ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΡΟΤΑΪΩΝ	15
1.6.2.	ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΗ	16
1.6.3.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ	17
1.7.	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ, ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	18
1.7.1.	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	18
1.7.2.	ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	18
1.7.3.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	19
1.7.4.	ΘΕΡΑΠΕΙΑ	23
1.8.	ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ	24
1.9.	ΠΡΟΛΗΨΗ	26
1.10.	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ	28

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.	ΝΟΡΟΪΟΙ	
2.1.	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	31
2.2.	ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΒΙΡΙΟΥ	32
2.3.	ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ	33
2.4.	ΠΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	33
2.4.1.	ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	33
2.4.2.	ΜΗ ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	34
2.5.	ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ	34
2.5.1.	ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ	34
2.5.2.	ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ ΠΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ	35
2.5.3.	ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ΠΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ	35
2.5.4.	ΑΠΕΚΔΥΣΗ	35
2.5.5.	ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ	36
2.5.6.	ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ ΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	36
2.5.7.	ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ	37
2.5.8.	ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ	37
2.6.	ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	37
2.6.1.	ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ	38
2.6.2.	ΘΕΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ	39
2.6.3.	ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΣΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ	39
2.7.	ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ	39
2.7.1.	ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ	40
2.7.2.	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ	41
2.7.3.	ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ	41
2.8.	ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ	42
2.9.	ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΥΝΑΜΗ	44
2.10.	ΕΜΜΕΝΟΥΣΑ ΛΟΙΜΩΞΗ	44
2.11.	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	45
2.11.1.	ΗΛΙΚΙΑ	45
2.11.2.	ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ - ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	45
2.11.3.	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΩΝ ΕΠΙΔΗΜΙΩΝ	46
2.11.4.	ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	47
2.12.	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΤΟΥ ΙΟΥ	48
2.13.	ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ	49
2.14.	ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	51
2.15.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	51
2.15.1.	ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	51
2.15.2.	ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ	52
2.16.	ΘΕΡΑΠΕΙΑ, ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ	52
2.16.1.	ΘΕΡΑΠΕΙΑ	52
2.16.2.	ΕΜΒΟΛΙΑ	53
2.16.3.	ΕΛΕΓΧΟΣ	54

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.</b>	<b>ΑΣΤΡΟΪΟΙ</b>	
3.1.	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	55
3.2.	ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΒΙΡΙΟΥ	56
3.3.	ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΒΙΡΙΟΥ	57
3.4.	ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ	57
3.4.1.	ORF1a ΚΑΙ ORF1b	59
3.4.2.	ORF2	59
3.5.	ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ	60
3.5.1.	ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΚΑΙ ΕΙΣΟΔΟΣ	60
3.5.2.	ΑΠΕΚΔΥΣΗ	61
3.5.3.	ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ	61
3.5.4.	ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΗ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	61
3.5.5.	ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	62
3.5.6.	ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ / ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ	64
3.5.7.	ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ	64
3.6.	ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	66
3.7.	ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ	68
3.8.	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	69
3.8.1.	ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	70
3.8.2.	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ	71
3.8.3.	ΟΡΟΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ	72
3.9.	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	72
3.10.	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	74
3.10.1.	ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ	74
3.10.2.	ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ	74
3.10.3.	ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	74
3.10.4.	ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ	75
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.</b>	<b>ΑΔΕΝΟΪΟΙ</b>	
4.1.	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	77
4.2.	ΔΟΜΗ ΒΙΡΙΟΥ	78
4.3.	ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ	80
4.4.	ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ	82
4.4.1.	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ	83
4.4.2.	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΚΑΙ ΑΠΕΚΔΥΣΗΣ	84
4.4.3.	ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ	86
4.4.4.	ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ Ε1Α	87
4.4.5.	ΟΨΙΜΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ	88
4.4.6.	ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ	89
4.4.7.	ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ DNA	89
4.4.8.	ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΡΙΩΝ	91
4.4.9.	ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΤΩΝ ΙΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	92
4.5.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	93
4.6.	ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	94

4.7.	ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ	95
4.8.	ΘΕΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ	96
4.9.	ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΚΑΙ ΤΡΟΠΙΣΜΟΣ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ	97
4.10.	ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ	98
4.11.	ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΥΝΑΜΗ	101
4.12.	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	101
4.13.	ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ	104
4.13.1.	ΔΙΑΡΡΟΙΑ	104
4.13.2.	ΕΓΚΟΛΕΑΣΜΟΣ	107
4.13.3.	ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ	107
4.13.4.	ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΝΟΣΟΚΑΤΕΣΤΑΛΜΕΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ	108
4.14.	ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	108
4.15.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	109
4.15.1.	ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	109
4.15.2.	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΙΩΝ	110
4.15.3.	ΆΜΕΣΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	113
4.16.	ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	114
4.16.1.	ΘΕΡΑΠΕΙΑ	114
4.16.2.	ΕΜΒΟΛΙΟ	118
4.17.	ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΑΔΕΝΟΪΩΝ	118

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1	ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	120
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	121
2.1.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ, ΑΣΤΡΟΪΩΝ, ΝΟΡΟΪΩΝ ΚΑΙ ΑΔΕΝΟΪΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL-TIME PCR	124
2.1.1.	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA Η΄ / ΚΑΙ RNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ RIDA XTRACT KIT	124
2.1.2.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ROTAVIRUS, ADENOVIRUS, ASTROVIRUS ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ RIDA®GENE VIRAL STOOL PANEL II	126
2.1.3.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΝΟΡΟΪΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ RIDA®GENE VIRAL STOOL PANEL II	133
2.2.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΡΟΤΑΪΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΑΧΕΙΑ ΑΝΟΣΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ RIDA®QUICK	136
2.3.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ ΜΕ IN-HOUSE ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ RT-PCR ΚΑΙ ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	137
2.3.1.	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ PURELINK® RNA MINI KIT	137
2.3.2.	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ 1-STEP RT-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ	140

2.3.3.	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	147
2.3.4.	ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	150
2.4.	ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ 2-STEP MULTIPLEX RT-PCR ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΜΙΓΜΑ ΕΙΔΙΚΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΠΟΥ ΟΔΗΓΟΥΝ ΣΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΑΝΑ ΤΥΠΟ ΡΟΤΑΪΟΥ	150
2.5.	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ ΜΕ IN-HOUSE ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ RT-PCR ΚΑΙ ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	157
2.5.1.	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ QIAAMP® VIRAL RNA MINI KIT (QIAGEN)	157
2.5.2.	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ 1-STEP RT-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ	159
2.5.3.	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	162
2.5.4.	ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	165
2.6.	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΩΝ ΡΟΤΑΪΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΠΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ	166
2.6.1.	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΨΥΞΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕΙΡΑΣ VERO(ATCC® CCL-81™) ΑΠΟ ΥΓΡΟ ΑΖΩΤΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΦΛΑΣΚΕΣ 25 CM <sup>2</sup>	166
2.6.2.	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕΙΡΑΣ VERO(ATCC® CCL-81™) ΣΕ ΦΛΑΣΚΕΣ 25 CM <sup>2</sup>	167
2.6.3	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ VERO(ATCC® CCL-81™) ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ	169
3	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
3.1.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	171
3.1.1	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013	171
3.1.1.1.	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΑΝΑ ΦΥΛΟ ΑΣΘΕΝΗ, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	172
3.1.1.2.	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΑΝΑ ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΑΣΘΕΝΗ, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	174
3.1.2.1.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ ΕΤΟΣ 2008, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	175
3.1.2.2.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ	177

	ΕΤΟΣ 2009, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	
3.1.2.3.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ ΕΤΟΣ 2010, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	178
3.1.2.4.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ ΕΤΟΣ 2011, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	180
3.1.2.5.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ ΕΤΟΣ 2012, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	181
3.1.2.6.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ ΕΤΟΣ 2013, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	183
3.2	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑ ΤΥΠΟ ΙΟΥ	186
3.2.1.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	186
3.2.2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΡΟΤΑΪΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΧΘΗΚΑΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	187
3.2.3.	ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΡΟΤΑΙΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	191
3.2.4.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	194
3.2.5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΡΟΪΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΧΘΗΚΑΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	195
3.2.6.	ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	196
3.2.7.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΔΕΝΟΪΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	201
3.2.8.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΣΤΡΟΪΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR	202
3.3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΡΟΤΑΪΩΝ	204
4.	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	
4.1.	ΠΕΡΙ ΡΟΤΑΪΩΝ	206
4.2.	ΠΕΡΙ ΝΟΡΟΪΩΝ	209
4.3.	ΠΕΡΙ ΑΔΕΝΟΪΩΝ	211
4.4.	ΠΕΡΙ ΑΣΤΡΟΪΩΝ	211
4.5.	ΕΠΙΛΟΓΟΣ	212
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	214



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

### ΑΡΙΘΜ. ΘΕΜΑ ΠΙΝΑΚΑ

- 1 ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ, ΑΝΑ ΕΤΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ, ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΚΑΙ ΦΥΛΟ ΤΟΥ ΑΣΘΕΝΗ
- 2 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ VP7 ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΡΟΤΑΪΩΝ
- 3 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ VP4 ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΡΟΤΑΪΩΝ
- 4 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ ΤΥΠΟΥ G
- 5 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ ΤΥΠΟΥ P
- 6 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΦΥΛΟ, ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013
- 7 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ, ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013
- 8 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΦΥΛΟ, ΓΙΑ ΤΟ ΕΤΟΣ 2008
- 9 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΦΥΛΟ, ΓΙΑ ΤΟ ΕΤΟΣ 2009
- 10 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΦΥΛΟ, ΓΙΑ ΤΟ ΕΤΟΣ 2010
- 11 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΦΥΛΟ, ΓΙΑ ΤΟ ΕΤΟΣ 2011
- 12 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΦΥΛΟ, ΓΙΑ ΤΟ ΕΤΟΣ 2012
- 13 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΦΥΛΟ, ΓΙΑ ΤΟ ΕΤΟΣ 2013
- 14 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΡΟΤΑΪΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΦΥΛΟ, ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013
- 15 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΝΟΡΟΪΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΦΥΛΟ, ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013
- 16 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΔΕΝΟΪΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΦΥΛΟ, ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013
- 17 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

- ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΣΤΡΟΪΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR, ΑΝΑ ΦΥΛΟ, ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013
- 18 ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΡΟΤΑΪΩΝ ΜΕ MULTIPLEX PCR ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008 - 2013
- 19 ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ (ΑΝΑ ΤΥΠΟ, ΜΕΡΙΚΩΣ ΤΥΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ) 2008 - 2013
- 20 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΡΟΪΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΜΕ REAL TIME PCR ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008 - 2013
- 21 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ
- 22 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΣ ΥΠΟΨΗ ΩΣ ΤΙΜΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ RT-PCR
- 23 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΣ ΥΠΟΨΗ ΩΣ ΑΛΗΘΩΣ ΘΕΤΙΚΟ ΚΑΘΕ ΔΕΙΓΜΑ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΕ ΘΕΤΙΚΟ ΜΕ ΤΟΥΛΑΧΙΣΤΟΝ 2 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΛΗΘΩΣ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΤΑ ΥΠΟΛΟΙΠΑ.

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

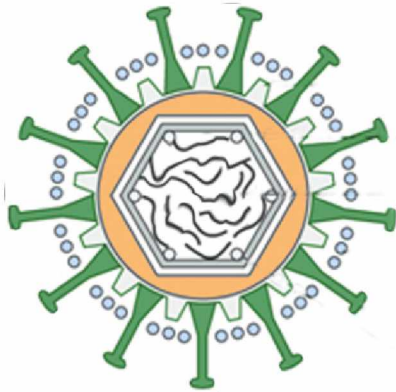
ΑΡΙΘΜ. ΕΙΚΟΝΑΣ	ΘΕΜΑ
1	ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΔΟΜΗΣ ΡΟΤΑΪΟΥ
2	ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΔΟΜΗΣ ΝΟΡΟΪΟΥ
3	ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΔΟΜΗΣ ΆΣΤΡΟΪΟΥ
4	ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΔΟΜΗΣ ΑΔΕΝΟΪΟΥ
5	ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΡΟΤΑΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΙΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΩΝ
6	ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΔΕΝΟΪΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΙΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΩΝ
7	ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΣΤΡΟΪΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΙΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΩΝ
8	ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΘΕΤΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΡΟΤΑΪΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ REAL TIME PCR
9	ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΘΕΤΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΆΣΤΡΟΪΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ REAL TIME PCR.
10	ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΘΕΤΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΆΔΕΝΟΪΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ REAL TIME PCR
11	ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΘΕΤΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΡΟΤΑΪΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ REAL TIME PCR.
12	ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΡΟΪΩΝ GI ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΙΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΩΝ
13	ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΝΟΡΟΪΩΝ GII ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΙΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΩΝ
14	ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΤΗΣ VP7 ΠΕΡΙΟΧΗΣ
15	ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΤΗΣ VP4 ΠΕΡΙΟΧΗΣ
16	ΕΙΚΟΝΑ ΓΕΛΗΣ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΤΗΣ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΡΟΤΑΪΩΝ ΚΑΤΑ Ρ
17	ΕΙΚΟΝΑ ΓΕΛΗΣ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΤΗΣ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΡΟΤΑΪΩΝ ΚΑΤΑ G
18	ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΔΕΝΤΡΑ ΓΙΑ ΘΕΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΡΟΤΑΪΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΙΣ ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ VP4 (P TYPING) ΚΑΙ VP7 (G TYPING)
19	ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΤΡΟ ΓΙΑ ΘΕΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΡΟΤΑΪΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ VP6
20	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΝΟΡΟΪΟ GII
21	ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΤΡΟ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΜΕΝΟ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΙΣ ΜΕΡΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΚΑΨΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΙΟΥ. ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΜΕ ΤΗΝ GII.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ
22	ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΤΡΟ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΜΕΝΟ ΜΕ ΒΑΣΗ ΜΕΡΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ VP1. ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΜΕ ΤΗΝ GI.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ



# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# 1. ΡΟΤΑΪΟΙ

## 1.1. ΔΟΜΗ



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση δομής Ροταΐου.

Η μορφολογία των ιικών σωματιδίων αποτελεί διακριτικό γνώρισμα των ροταϊών μετά από παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, όπου διαπιστώνονται τρεις τύποι σωματιδίων. Το βίριο των ροταϊών (Rotaviruses, RVs), δηλαδή το πλήρως μολυσματικό ιικό σωματίδιο, αποτελείται από τρεις στιβάδες πρωτεϊνών (triple-layered particle, TLP). Η εμφάνιση τύπου «τροχού» («rota» στα λατινικά) των σωματιδίων των ροταϊών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, αποτέλεσε την αιτία για να δοθεί το όνομα Rotavirus σε αυτό το γένος [1]. Τα TLPs έχουν διάμετρο 100 nm, η οποία θεωρείται σχετικά μεγάλη για έναν ιό που δεν φέρει φάκελο και έχει εικοσαεδρική συμμετρία. Το βίριο διαθέτει 132 κανάλια κατά μήκος των αξόνων πενταπλής (12 κανάλια της κατηγορίας I), τριπλής και διπλής συμμετρίας (60 κανάλια κατηγορίας II και 60 κανάλια κατηγορίας III αντίστοιχα) [2].

Τα σωματίδια δύο στιβάδων (double-layered particles, DLPs), διαθέτουν τριμερείς υπομονάδες του εσωτερικού καψιδίου οι οποίες προβάλλουν στην επιφάνεια τους. Τα DLPs καλύπτονται από 260 τριμερή της ικής πρωτεΐνης VP7 (Viral Protein 7) και 60 προεξοχές από τριμερή της VP4 (= 180 μόρια) και σχηματίζουν τα TLPs. Τα σωματίδια μονής στιβάδας (single layered particle SLP) αποτελούνται από 120 μόρια ικής πρωτεΐνης VP2 τα οποία είναι διατεταγμένα ως 60 διμερή σε συμμετρία T=1. Πέντε από τα διμερή σχηματίζουν ένα δεκαμερές γύρω από τον πενταπλό άξονα συμμετρίας και 12 δεκαμερή σχηματίζουν το στρώμα της πυρηνικής πρωτεΐνης. Η πυρηνική πρωτεΐνη παρουσιάζει ομοιομορφία με εξαίρεση των παρουσίας μικρών πόρων κατά μήκος του πενταπλού άξονα [3].

Στον πυρήνα βρίσκεται το ιικό γένωμα που αποτελείται από 11 τμήματα διπλής έλικας RNA (double stranded RNA, dsRNA), η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση

(RNA dependent RNA polymerase, RdRp), η VP1 και το ένζυμο κάλυψης VP3. Τα σύμπλοκα των ενζύμων αντιγραφής, που αποτελούνται από την VP1 και την VP3, βρίσκονται στο εσωτερικό του πυρήνα, στον άξονα της πενταπλής συμμετρίας απέναντι από τα κανάλια της κατηγορίας I [3–5] και βρίσκονται σε επαφή με ένα συγκεκριμένο τμήμα του γενώματος του ιού μέσω της VP1 [6].

Έχει προταθεί ότι τα τμήματα RNA του γενώματος του ιού σχηματίζουν κωνικούς κυλίνδρους γύρω από τα σύμπλοκα αναδιπλασιασμού [2]. Ωστόσο, μόλις πρόσφατα ξεκίνησε η διερεύνηση των λεπτομερειών που αφορούν στη δομή του dsRNA μέσα στον πυρήνα του ιικού σωματιδίου. Τα 11 τμήματα RNA του γενώματος του ιού έχουν πολύ μικρές, πλήρως συντηρημένες ακολουθίες τερματικών νουκλεοτιδίων 5' - GGC · · · ACC-3'. Οι μη μεταφρασμένες περιοχές (Untranslated Regions, UTR) των τμημάτων RNA (θετικής πολικότητας) είναι μικρές, 9-48 νουκλεοτίδια στο 5' άκρο και 17-182 νουκλεοτίδια στο 3' άκρο. Τα 5' και 3' άκρα είναι μερικής ανεστραμμένης συμπληρωματικότητας και υπόκεινται σε αλληλεπιδράσεις μεγάλου εύρους (Long Range Interactions, LRI) [7]. Αυτές στο άκρο 3' λειτουργούν ως σήματα αναγνώρισης της RdRp [8] και επίσης αλληλεπιδρούν με την NSP3 [9] η οποία εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της μετάφρασης. Η VP1 σχηματίζει μια δομή τύπου «κλουβί» που διακόπτεται από τέσσερις σήραγγες οι οποίες έχει προταθεί ότι χρησιμεύουν στα εξής: (1) την είσοδο ελεύθερων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (nucleoside triphosphates, NTPs) (2) την είσοδο του ssRNA που χρησιμεύει ως πρότυπο, (3) την έξοδο του προϊόντος (+) ssRNA και (4) την έξοδο του (-)ssRNA (μεταγραφή) ή dsRNA (αναδιπλασιασμός).

## 1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι Ροταϊοί ανήκουν στο γένος Rotavirus, ένα από τα 15 γένη της οικογένειας Reoviridae η οποία υποδιαιρείται στις υπο-οικογένειες Sedoreovirinae (γένη Cardoreovirus, Mimoreovirus, Orbivirus, Phytoreovirus, Rotavirus, Seadornavirus) και Spinareovirinae (γένη Aquareovirus, Coltivirus, Cyrovirus, Dinovernavirus, Fijivirus, Idnoreovirus, Mycoreovirus, Orthoreovirus, Oryzavirus). Με βάση την ορολογική αντίδραση και τη γενετική ποικιλομορφία της VP6, έχουν διαφοροποιηθεί τουλάχιστον οχτώ διαφορετικές ομάδες, οι οποίες καλούνται επίσης είδη (RVA-RVH) [10]. Τα είδη RVA αποτελούνται από 27 τύπους G (σύμφωνα με την αλληλουχία νουκλεοτιδίων της VP7) και 27 τύπους P (σύμφωνα με την αλληλουχία νουκλεοτιδίων της VP4 [11]. Για τους τύπους G, οι ορότυποι και οι γενότυποι είναι συνώνυμοι π.χ. G1, G2, κλπ. Για τους τύπους P, υπάρχουν πολλοί περισσότεροι γενότυποι P σε σχέση με τους ορούς αναφοράς που προσδιορίζουν τους ορότυπους P. Κατά συνέπεια, έχει εισαχθεί ένα σύστημα διπλής ονομασίας π.χ. το P1A[8] αναφέρεται στον ορότυπο P1A και στον γενότυπο P8 κλπ [12]. Για τους RVA έχει προταθεί μια πιο

ολοκληρωμένη ταξινόμηση που βασίζεται στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ολόκληρου του γονιδιώματος σύμφωνα με την οποία έχουν αναγνωρισθεί και διαφοροποιηθεί οι γενότυποι VP7–VP4–VP6–VP1–VP2–VP3–NSP1–NSP2–NSP3–NSP4–NSP5/6 [11]. Πρόσφατα, έχουν αρχίσει να παρουσιάζονται παρόμοιες διαφοροποιήσεις και στους γενότυπους των RVBs και των RVCs [13,14].

### 1.3. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Το γονιδίωμα των RVA έχει μέγεθος περίπου 18,500 bp και αποτελείται από 11 τμήματα dsRNA που κωδικοποιούν έξι δομικές (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) και έξι μη δομικές πρωτεΐνες (NSP1–NSP5/6). Το κάθε τμήμα κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με εξαίρεση το τμήμα 11 που κωδικοποιεί δύο πρωτεΐνες. Τα τμήματα του γονιδιώματος έχουν μέγεθος από 667 έως 3302 bp. Το αποπρωτεϊνωμένο γένωμα dsRNA του ροταϊού δεν είναι μολυσματικό, υποδεικνύοντας ότι τα ιικά σωματίδια περιέχουν τη δική τους RdRp για τη μεταγραφή των μεμονωμένων τμημάτων RNA σε ενεργό mRNA. Η συσκευασία των τμημάτων RNA στο καψίδιο του ροταϊού απαιτεί στενές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-RNA [15]. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες που είναι άμεσα υπεύθυνες για τη συσκευασία των τμημάτων RNA παραμένουν άγνωστες. Αν και οι δομικές πρωτεΐνες που υπάρχουν στον πυρήνα των ιικών σωματιδίων (VP1, VP2 και VP3) είναι προφανείς υποψήφιοι, οι μη δομικές πρωτεΐνες μπορεί επίσης να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο.

Οι αλληλουχίες διαφορετικών στελεχών ροταϊού παρουσιάζουν κάποια γενικά χαρακτηριστικά ως προς τη δομή κάθε τμήματος του γονιδιώματος. Κάθε τμήμα RNA θετικής πολικότητας ξεκινά με μία γουανιδίνη στο 5' άκρο, ακολουθούμενη από ένα σύνολο συντηρημένων αλληλουχιών που είναι τμήμα των μη κωδικοποιητικών περιοχών του 5' άκρου. Ακολουθεί ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) που κωδικοποιεί το πρωτεϊνικό προϊόν και τελειώνει με το κωδικόνιο λήξης. Στη συνέχεια βρίσκεται μια άλλη σειρά μη κωδικοποιητικών αλληλουχιών που περιέχει ένα υποσύνολο συντηρημένων αλληλουχιών στο 3' άκρο και τελειώνει με δύο τερματικές κυτιδίνες. Σχεδόν όλα τα mRNAs τελειώνουν με την αλληλουχία 5'-UGUGACC-3' και αυτές οι αλληλουχίες περιέχουν σημαντικά σήματα για τη γονιδιακή έκφραση και την αντιγραφή του γονιδιώματος. Τα τελευταία τέσσερα νουκλεοτίδια των mRNAs λειτουργούν ως ενισχυτές της μετάφρασης [9].

Μία από τις πιο ενδιαφέρουσες πτυχές του κύκλου αντιγραφής των ροταϊών σχετίζεται με τον μηχανισμό αντιγραφής και συσκευασίας των 11 ιικών mRNAs. Τα 11 mRNAs πρέπει να μοιράζονται κοινά cis-acting σήματα επειδή όλα αντιγράφονται με την ίδια πολυμεράση και η ακολουθία UGUG αναγνωρίζεται από την πολυμεράση με βάση την ειδικότητα των βάσεων [16]. Επιπλέον, κάθε mRNA πρέπει να περιέχει ένα



σήμα που είναι μοναδικό, προκειμένου τα 11 mRNA να διακρίνονται το ένα από το άλλο κατά τη διάρκεια της συσκευασίας. Γενικά, οι συντηρημένες τερματικές αλληλουχίες στα τμήματα του γονιδιώματος περιέχουν cis-acting σήματα που είναι σημαντικά για τη μεταγραφή, τη μετάφραση, τη μεταφορά του RNA, την αντιγραφή, τη συσκευασία ή την ενκαψιδίωση των τμημάτων του ιικού γονιδιώματος. Μερικά από τα cis-acting σήματα για την αντιγραφή και τη μετάφραση του RNA του ιού έχουν αναγνωρισθεί, αλλά τα σήματα συσκευασίας ή ενκαψιδίωσης παραμένουν άγνωστα [17].

Τα γονίδια των ροταϊών μπορούν να «αναδιατάσσονται» λόγω των μερικών επαναλήψεων ή διαγραφών των τμημάτων RNA που παράγονται από ειδικές μορφές ενδογενούς ανασυνδυασμού [12]. Οι ιοί κάθε ομάδας είναι ικανοί για γενετική αναδιάταξη, αλλά η αναδιάταξη αφορά στους ιούς που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες και έτσι οι ομάδες των RVs θεωρούνται μοναδικά είδη. Γενικά, οι ιοί που περιέχουν αναδιαταχθέντα τμήματα γονιδιώματος δεν είναι ελαττωματικοί και τα αναδιαταχθέντα τμήματα μπορούν να αναδιοργανώσουν και να αντικαταστήσουν τα κανονικά τμήματα RNA σε δομικό και λειτουργικό επίπεδο. Αυτοί οι ιοί δεν έχουν πλεονέκτημα ανάπτυξης, αλλά παρουσιάζουν ένα πλεονέκτημα επιλογής για την ενσωμάτωση σε ιικούς απογόνους [18]. Σε τέτοια σωματίδια μπορούν να συσκευαστούν μέχρι 1.800 πρόσθετα ζεύγη βάσεων χωρίς να προκαλούν ανιχνεύσιμες αλλαγές στη διάμετρο των σωματιδίων ή εμφανείς τιμές ιζηματοποίησης. Η πυκνότητα των σωματιδίων που περιέχουν αναδιαταχθέντα τμήματα γονιδιώματος μπορεί ωστόσο να αυξηθεί και είναι ανάλογη με τον αριθμό των επιπρόσθετα συσκευασμένων ζευγών βάσεων [15]. Έτσι, οι ροταϊοί μπορούν να συσκευάζουν επιπλέον γονιδιωματικό RNA, αν και το ανώτερο όριο είναι άγνωστο.

#### 1.4. ΚΥΚΛΟΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ

Οι RVs παρουσιάζουν τροπισμό προς τα διαφοροποιημένα εντεροκύτταρα του λεπτού εντέρου, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα κύτταρα εκφράζουν ειδικούς υποδοχείς για την πρόσδεση του ιού και την είσοδο του στα κύτταρα. Ωστόσο, η εξω-εντερική εξάπλωση του ροταϊού που έχει παρατηρηθεί σε ανθρώπους και σε όλα τα ζωικά μοντέλα που μελετήθηκαν [15], αποτελούν ένδειξη της ύπαρξης μεγάλου εύρους κυττάρων ξενιστών και πρόσθετων πιθανών υποδοχέων. Τα γενικά χαρακτηριστικά της αντιγραφής των ροταϊών (με βάση τις μελέτες που έχουν γίνει σε καλλιέργειες νεφρικών κυττάρων πιθήκου) είναι τα παρακάτω [12,15]:

1. Η καλλιέργεια των περισσότερων στελεχών του ιού απαιτεί την προσθήκη εξωγενών πρωτεασών στο μέσο καλλιέργειας. Αυτό εξασφαλίζει τη μολυσματικότητα

των ιικών σωματιδίων μέσω της διάσπασης της πρωτεΐνης VP4 του εξωτερικού καψιδίου.

2. Η αντιγραφή πραγματοποιείται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα.
3. Τα κύτταρα δεν περιέχουν ένζυμα για την αντιγραφή του dsRNA. Ως εκ τούτου, το ιικό σωματίδιο πρέπει να περιέχει τα απαραίτητα ένζυμα.
4. Η μεταγραφή λειτουργεί τόσο για την παραγωγή πρωτεϊνών όσο και για την παραγωγή αρνητικού κλώνου RNA. Μόλις ο συμπληρωματικός ο κλώνος αρνητικής πολικότητας συντεθεί, παραμένει συνδεδεμένος με τον κλώνο θετικής πολικότητας.
5. Τα τμήματα dsRNA σχηματίζονται μέσα στο «εκκολλαπτόμενο» υποϊικό σωματίδιο και τα ελεύθερα dsRNA ή τα ελεύθερα ssRNA αρνητικής πολικότητας γενικά δεν ανευρίσκονται σε μολυσμένα κύτταρα.
6. Η αντιγραφή του RNA συμβαίνει εντός των κυτταροπλασματικών βιροπλάσμάτων.
7. Τα υποϊικά σωματίδια σχηματίζονται στα βιροπλάσματα και ωριμάζουν μέσω της σύνδεσης με τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, τα σωματίδια αποκτούν το εξωτερικό τους πρωτεϊνικό καψίδιο.
8. Τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου είναι σημαντικά για τον έλεγχο της συγκρότησης του ιού και της ακεραιότητας των σωματιδίων.
9. Η απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων γίνεται μετά από λύση των μολυσμένων κυττάρων.

#### 1.4.1. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ

Η προσρόφηση των RVs είναι μια πολύπλοκη διαδικασία [19]. Αρχικά, το μολυσματικό σωματίδιο (TLP), αντιδρά μέσω των προεξοχών της VP4 (VP4 spikes) με τους κυτταρικούς υποδοχείς (υποδοχείς προσρόφησης). Οι υποδοχείς περιέχουν σιαλικά οξέα (sialic acid, SA) στις τερματικές ή υπο-τερματικές θέσεις [20,21]. Η κατεργασία των κυττάρων με νευραμινιδάση εμποδίζει τη μόλυνσή τους από συγκεκριμένα στελέχη RVs (π.χ. SA11) τα οποία θεωρούνται ευαίσθητα στα SA [22]. Άλλα στελέχη που μπορούν να μολύνουν κύτταρα τα οποία έχουν προηγουμένως υποστεί κατεργασία με νευραμινιδάση, αρχικά ονομάστηκαν SA-ανθεκτικά (π.χ. Wa και DS-1). Αργότερα όμως φάνηκε ότι προσδένονται σε υποδοχείς που περιέχουν SA σε εσωτερικές θέσεις των γλυκολιπιδίων τα οποία δεν είναι ευαίσθητα στη νευραμινιδάση π.χ. η γαγγλιοσίδη GM1 [23]. Για την προσρόφηση διαμεσολαβεί η υπομονάδα VP8 της VP4 καθώς η ρηγή αύλακα της επιφάνειας της VP8\* αντιδρά με

τα SA των κυτταρικών γλυκανών [20,21]. Πρόσφατα, φάνηκε ότι ορισμένα στελέχη RV (π.χ. το G10P[11]) προσδένονται σε μη SA που περιέχουν αντιγόνα ομάδας αίματος (histo blood group antigens, HBGA) μέσω του μοτίβου Galβ1-4GlcNAc [24-26]. Όσον αφορά στον γενότυπο P[8], η αντίδρασή του με τον υποδοχέα HBGA εξαρτάται από ένα λειτουργικό ένζυμο FUT2 [27]. Επίσης ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι κάποιοι RVs και νοροϊοί χρησιμοποιούν πολυμορφικούς HBGA υποδοχείς για την προσρόφηση [28]. Διάφορα μόρια της κυτταρικής επιφάνειας μπορούν να λειτουργούν ως συν-υποδοχείς (μετά την προσρόφηση) όπως είναι ορισμένες ιντεγκρίνες (α2β1, ανβ3, αχβ2, α4β1) οι οποίες αντιδρούν με μοτίβα ιντεγκρίνης στην VP5 ή την VP7 (μοτίβο DGE για την VP5 ή μοτίβα GRP και CNP στην VP7) [12,29], ή με την συγγενή πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 (heat shock cognate protein 70, Hsc70) του ανθρώπου [30]. Όλοι οι συν-υποδοχείς συνδέονται με λιπίδια π.χ. τα λιπίδια που είναι ανθεκτικά στα απορρυπαντικά που βρίσκονται κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη λειτουργούν ως πλατφόρμες στις οποίες συνδέονται τα TLPs [31]. Η σημασία διάφορων υποδοχέων για τη μόλυνση των ανθρώπων από RV βρίσκεται υπό διερεύνηση [32]. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι ορισμένα στελέχη RV προκαλούν αιμοσυγκόλληση [33] και ότι για την αντίδραση αυτή είναι υπεύθυνη η VP8 υπομονάδα της VP4 [34].

#### 1.4.2. ΕΙΣΟΔΟΣ ΚΑΙ ΑΠΕΚΔΥΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ

Μετά την αρχική πρόσδεση στα κύτταρα, η είσοδος των ιικών σωματιδίων είναι μια συντονισμένη διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει μια σειρά αλλαγών στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών του καψιδίου και ενδοκυτταρικές οδούς. Επειδή η αρχική σύνδεση VP8 - γλυκάνης έχει σχετικά χαμηλή συνάφεια, η είσοδος του ιού είναι πιθανώς υπεύθυνη, εν μέρει, για τον τύπο του κυττάρου και την ειδικότητα ως προς τον ξενιστή [15]. Οι κρυσταλλογραφικές δομές των συμπλεγμάτων VP8 -SA υποδεικνύουν ελάχιστες μεταβολές στη διαμόρφωση της VP8 αλλά δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν αυτό ισχύει στο πλαίσιο ολόκληρης της δομής του ροταϊού. Αντίθετα, μετά την πρόσδεση, οι μεταβολές στη διαμόρφωση αφορούν την VP5 και την VP7 [12,15].

Πριν από τη διάσπαση με θρυψίνη, οι προεξοχές της VP4 είναι εύκαμπτες και δεν είναι ορατές στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ωστόσο, είναι παρούσες σε σχεδόν πανομοιότυπη δομή όπως επιβεβαιώθηκε πρόσφατα μετά από παρατήρηση του μονού σωματιδίου στο κρυο-ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [35]. Κατά την επαφή με τον κυτταρικό υποδοχέα, οι προεξοχές της VP4 των TLPs υφίστανται μεταβολές ως προς τη διαμόρφωσή τους κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι λιποφιλικές περιοχές της VP5, οι οποίες κανονικά βρίσκονται καλυμμένες κάτω από την VP8, να εκτίθενται στην επιφάνεια με τη μορφή «ομπρέλας» μετά την είσοδο [36]. Η κατεργασία των

σωματιδίων RV με θρυψίνη φαίνεται να ευνοεί αυτή τη μετάβαση και να προσδίδει πλήρη μολυσματικότητα στα TLPs [15,35]. Μεταλλαγμένα RV που είναι μερικώς ανθεκτικά στη θρυψίνη παρουσιάζουν καθυστέρηση στην κυτταρική είσοδο, αλλά στη συνέχεια αντιγράφονται όπως και οι ιοί άγριου τύπου (wildtype virus, wt) [37].

Η είσοδος και η διείσδυση του ιικού σωματιδίου δεν λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες από 0 ° C έως 4 ° C, υποδηλώνοντας ότι αυτό το βήμα απαιτεί ενεργές κυτταρικές διεργασίες. Το ιικό σωματίδιο βρίσκεται ολόκληρο μέσα το κύτταρο του ξενιστή 60 έως 90 λεπτά μετά τη σύνδεση [15]. Ωστόσο, ο μηχανισμός διείσδυσης του ιού στα κύτταρα παραμένει ακόμα ασαφής. Για να διερευνηθεί ο τρόπος εισόδου των ροταϊών στα κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί μορφολογικές και βιοχημικές προσεγγίσεις. Οι τρόποι εισόδου που έχουν προταθεί μέχρι στιγμής είναι η ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση υποδοχέα και η άμεση διείσδυση στη μεμβράνη μέσω διαλυτοποίησης των πρωτεϊνών του εξωτερικού καψιδίου λόγω χαμηλών συγκεντρώσεων Ca<sup>2+</sup> στα ενδοσώματα [38]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι διαφορετικά στελέχη ροταϊού εισέρχονται στα κύτταρα διαμέσου διαφορετικών ενδοκυτταρικών οδών [29].

#### 1.4.3. ΣΥΝΘΕΣΗ mRNA

Τα σωματίδια RV διαθέτουν τα δικά τους σύμπλοκα μεταγραφής (Transcription Complexes, TCs), που αποτελούνται από την VP1, RdRp και τη VP3, το ένζυμο κάλυψης του ιού (με δραστικότητα φωσφοδιεστεράσης, γουανυλυλοτρανσφεράσης και μεθυλάσης). Τα TCs είναι τοποθετημένα στην εσωτερική επιφάνεια του στρώματος της VP2 (πυρήνας) στους πενταπλούς άξονες συμμετρίας [2]. Κάθε TC συσχετίζεται με ένα τμήμα RNA του ιικού γονιδιώματος [6]. Τα DLPs των ροταϊών στο κυτταρόπλασμα παράγουν επικαλυμμένα, μη πολυαδενυλιωμένα (+) ssRNA (από τον αρνητικό κλώνο του γονιδιωματικού RNA) τα οποία απελευθερώνονται από το σωματίδιο διαμέσου των καναλιών I. Τα τμήματα που μεταγράφηκαν χρησιμεύουν είτε για τη μετάφραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τον ιό (νωρίς στον κύκλο αντιγραφής) είτε ως πρότυπα για την αντιγραφή (αργά στον κύκλο αντιγραφής) ώστε να προκύψουν τα dsRNA που θα αποτελέσουν το γονιδίωμα των απόγονων σωματιδίων RV [39]. Τα σωματίδια της οικογένειας Reoviridae μπορούν να παράγουν mRNAs από 12 διαφορετικά τμήματα του γονιδιώματος (π.χ. το γένος Coltivirus). Για τους Ροταϊούς (που έχουν 11 τμήματα γονιδιωματικού RNA) δεν είναι σαφές εάν τα επιπλέον TCs «καταλαμβάνονται» από RNA ή είναι «κενά». Τα DLPs των RVs είναι «μεταγραφικά δραστικά» στο κυτταρικό κυτταρόπλασμα και *in vitro*, όπου παράγουν μεγάλες ποσότητες mRNAs (σε mg), με την προϋπόθεση ότι υπάρχει επάρκεια τόσο σε προρυθμιστές όσο και στην ενεργειακή πηγή (ATP)[16]. Μια λογαριθμική αύξηση στην παραγωγή mRNA σε μεταγενέστερα στάδια της μόλυνσης (> 4 ώρες μετά τη μόλυνση) υποδηλώνει ότι τα νέα DLPs έχουν γίνει μεταγραφικά ενεργά (δευτερογενής μεταγραφή). Τα mRNA που έχουν προκύψει από συγκεκριμένα

τμήματα του γονιδιώματος των DLPs μεταφράζονται στη συνέχεια σε πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα [40].

#### 1.4.4. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΡΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Οι πρωτεΐνες του ροταϊού και τα RNA αλληλεπιδρούν στα κυτταροπλασματικά σύμπλοκα που ονομάζονται βιροπλάσματα. Για το σχηματισμό του βιροπλάσματος, είναι απαραίτητη η παρουσία και η επάρκεια των δύο από τις μη δομικές πρωτεΐνες των RV, της NSP2 και της NSP5, καθώς η ταυτόχρονη έκφραση τους σε μη μολυσμένα κύτταρα οδηγεί στην παραγωγή δομών τύπου βιροπλάσματος (viroplasm-like structures) [41]. Η παρεμπόδιση αυτών των πρωτεϊνών από ειδικά siRNAs, από ενδοσώματα ή η χρήση των μεταλλακτών RV ts που είναι ειδικοί για την NSP2 ή την NSP5 σε θερμοκρασία αποτρεπτική, παρεμποδίζουν το σχηματισμό βιροπλάσματος, τη μορφογένεση των RV και την παραγωγή των απογόνων RVs [39,42]. Η κυτταροπλασματική NSP2 σχηματίζει επίσης σύμπλοκα με την VP1, την VP2 και την τουμπουλίνη [43], καθιστώντας την τουμπουλίνη συστατικό των βιροπλάσματος και επάγει τον αποπολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και τη σταθεροποίηση με ακετυλίωση [44,45]. Τα λειτουργικά πρωτεασώματα και τα συστατικά του αυτοφαγικού διαύλου είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό βιροπλάσματος και την αντιγραφή των RVs [46]. Η NSP2 σχηματίζει οκταμερή και έχει λειτουργίες όπως αυτές της νουκλεοσιδικής τριφωσφατάσης, του αποσταθεροποιητή της έλικας RNA και της διφωσφορικής νουκλεοσιδικής κινάσης [47]. Οι άυλακες στο οκταμερές της NSP2 είναι θέσεις σύνδεσης για τις οποίες ανταγωνίζονται η NSP5 και τα ssRNAs, ρυθμίζοντας πιθανώς την ισορροπία μεταξύ της μετάφρασης και της αντιγραφής του RNA [47]. Η NSP5 είναι μια πρωτεΐνη πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη που βρίσκεται σε ολιγομερείς μορφές και γίνεται υπερφωσφορυλιωμένη [43]. Οι ακριβείς βιοχημικές λειτουργίες της NSP5 δεν έχουν ακόμα προσδιοριστεί [43,48].

Η NSP4, μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, βρίσκεται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Endoplasmic Reticulum, ER) και έχει πολλαπλές λειτουργίες:

- 1) Χρησιμεύει ως ενδοκυτταρικός υποδοχέας για τα DLPs αλληλοεπιδρώντας με την VP6 [49],
- 2) απελευθερώνει  $Ca^{2+}$  από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες [50] ενεργώντας ως πορίνη [51,52] αυξάνοντας έτσι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα  $Ca^{2+}$  που απαιτούνται για την σταθεροποίηση του εξωτερικού στρώματος των TLPs. Η λειτουργία της ως πορίνη βρέθηκε να οφείλεται στην αλληλεπίδραση της NSP4 με το κυτταρικό μόριο-αισθητήρα των  $Ca^{2+}$ , το STIM1 [53].

3) Η NSP4 σχηματίζει «καλύματα» στα βιροπλάσματα και εντοπίζεται παράλληλα με την πρωτεΐνη αυτοφαγίας LC3 [54]. Η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης  $Ca^{2+}$  που προκαλείται από την NSP4, ενεργοποιεί μια οδό η οποία είναι εξαρτώμενη από την κινάση και οδηγεί σε αυτοφαγία [55,56].

4) Η NSP4 μεταβάλλει τη διαπερατότητα της μεμβράνης [12] και αποσταθεροποιεί τις διακυτταρικές συνδέσεις [50].

5) Το πιο σημαντικό είναι ότι η NSP4 δρα ως ιογενής εντεροτοξίνη [57] καθώς εκκρίνεται νωρίς μετά από τη μόλυνση με RV, είτε ως πεπτιδικό τμήμα είτε ως ολόκληρο μόριο [58] και αλληλεπιδρά με μη μολυσμένα εντερικά κύτταρα που διαθέτουν υποδοχείς ιντεγκρίνης  $\alpha 1\beta 1$  και  $\beta 2\beta 1$  [59].

Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς ιντεγκρίνης διεγείρουν την ενδοκυτταρική αντίδραση που σχετίζεται με την ενδοκυτταρική απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  και τη διάρροια. Η NSP4 υπάρχει σε τρεις ομάδες στο μολυσμένο κύτταρο [54]:

1) Εντοπίζεται στο ER ως υποδοχέας για τα DLPs,

2) εκκρίνεται από το κύτταρο ως διαλυτό στοιχείο [58,60]

3) σχηματίζει «καλύματα» στα βιροπλάσματα [54].

Η πρωτεΐνη NSP3 των RVs έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά (στο N τερματικό της) με το 3' άκρο του ιικού ssRNA θετικής πολικότητας και (στο άκρο του C) με τον παράγοντα μετάφρασης eIF4G (δεσμευμένο στο 5' τελικό άκρο του RNA) [12,61]. Δεδομένου ότι η NSP3 μπορεί να εξάγει το PABP από τα κυτταρικά mRNAs, εμποδίζει την μετάφραση του κυτταρικού mRNA πολύ αποτελεσματικά [61]. Η κυτταρική μετάφραση του mRNA παρεμποδίζεται από την έκφραση της NSP3 με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του PABP και των κυτταρικών mRNAs στον κυτταρικό πυρήνα. Η αναστολή της έκφρασης της NSP3 από το siRNA, ωστόσο, καταστέλλει κυρίως την επίδρασή της στην κυτταρική μετάφραση του mRNA. Η μετάφραση του ιικού RNA δεν υφίσταται βλάβη [62]. Η πρωτεΐνη NSP3 ανταγωνίζεται επίσης μέρος της έμφυτης ανοσοαπόκρισης [62,63].

Η NSP1 είναι η πιο μεταβλητή από όλες τις πρωτεΐνες των RVs. Είναι πιθανό να εμπλέκεται στον περιορισμό των ειδών των ξενιστών. Μια βασική λειτουργία της NSP1 είναι η ικανότητά της να δρα ως ανταγωνιστής της αρχικής ανοσοαπόκρισης [64].

Τα βιροπλάσματα προσλαμβάνουν σταγονίδια κυτταρικών λιπιδίων (Lipid Droplets, LDs) τα οποία λειτουργούν ως μέσα αποθήκευσης και μεταφοράς στο κύτταρο [12,65]. Η παρεμπόδιση της ομοιόστασης των LD και η παρεμπόδιση της διάσπασης

λιπιδίων μειώνουν τον αριθμό και το μέγεθος των βιροπλάσμάτων και την παραγωγή και τη μολυσματικότητα των απόγονων ιικών σωματιδίων [65,66].

#### 1.4.5. ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ RNA, ΣΥΝΘΕΣΗ ssRNA ΑΡΝΗΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ DLP

Τα 11 διαφορετικά (+) ssRNA αναδιαμορφώνονται, αλληλοεπιδρούν με τις ιϊκές πρωτεΐνες του πυρήνα και στη συνέχεια συγκροτούνται και αντιγράφονται. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση [4] ότι τα πρωτεύοντα σύμπλοκα αντιγραφής των VP1 / VP3 / ssRNA αλληλοεπιδρούν με ένα δεκαμερές της VP2 (πιθανότατα με τη συμμετοχή των NSP5 και NSP2) [67], οδηγώντας στον σχηματισμό σωματιδίων. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το αρνητικό φορτίο του RNA πρέπει να εξουδετερωθεί μέσω της συσκευασίας είτε δισθενών κατιόντων είτε σπερμιδίνης, μιας κυτταρικής τρισθενούς κατιονικής ένωσης [12]. Η N-τερματική περιοχή της VP2 είναι απαραίτητη για την ενκάψωση της VP1 (και του συνδεδεμένου ssRNA) [68]. Ο σχηματισμός συμπλόκου με την VP2 είναι βασικός και απαραίτητος για τη δράση RdRp της VP1, με τα σύμπλοκα VP1/VP2 να αποτελούν τα ελάχιστα σωματίδια αντιγραφής *in vitro* [12]. Οι μοριακές λεπτομέρειες της πρώιμης μορφογένεσης των σωματιδίων RV (σχηματισμός σωματιδίων του πυρήνα και αντιγραφή RNA) δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητές. Ειδικότερα, δεν είναι σαφές ο τρόπος με τον οποίο ελέγχεται η συσκευασία του σωστού συνόλου των 11 τμημάτων RNA στα επιμέρους σωματίδια. Μόλις σχηματιστούν, τα σωματίδια του πυρήνα διακαψιδώνονται ταχέως μέσω της VP6, οδηγώντας στη σύνθεση των DLPs. Η τελευταία διαδικασία έχει μελετηθεί *in vitro* [69].

#### 1.4.6. ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΙΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ

Τα DLPs, κατά την έξοδο από τα βιροπλάσματα, διέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο για ωρίμανση. Σε αυτή τη διαδικασία, η NSP4 διατηρείται ως ενδοκυτταρικός υποδοχέας μέσω της αλληλεπίδρασης της με την VP6 [49]. Μέσα στο ER, τα σωματίδια RV αποκτούν περίβλημα παροδικά, το οποίο χάνεται όταν τα σωματίδια αποκτήσουν το ανώτερο στρώμα που αποτελείται από την VP4 (60 τριμερή) και την VP7 (260 τριμερή) [15]. Η προέλευση, η λειτουργία και η απώλεια του «μεταβατικού» φακέλου δεν είναι ακόμα κατανοητές. Εντούτοις, είναι πιθανό ότι τα τριμερή της VP4, τα οποία σχηματίζουν προεξοχές, αντιδρούν πρώτα με την VP6 και εν συνεχεία ενσωματώνονται σε ένα συνεχές στρώμα τριμερών της VP7 [69]. Οι δοκιμασίες διακαψίδωσης *in vitro* έδειξαν ότι η πλήρης μολυσματικότητα των TLPs επιτυγχάνεται μόνο με την αλληλεπίδραση της VP4 με τα DLPs, ακολουθούμενη από την αλληλεπίδραση με τη VP7 [69]. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, η NSP4 έχει μια

κρίσιμη λειτουργία στη διαδικασία ωρίμανσης μέσω της αλληλεπίδρασης με τα DLPs. Ειδικότερα, η παρεμπόδιση της έκφρασης της NSP4 από siRNA οδηγεί σε ελαττώματα στην ωρίμανση των σωματιδίων RV [70] και η αντιγραφή του RNA των RV επίσης παρεμποδίζεται, πιθανώς λόγω της αλληλεπίδρασης της NSP4 με το βιρόπλασμα [54]. Τα TLPs απελευθερώνονται από μη πολωμένα κύτταρα (MA104) με λύση [71], αλλά από επιθηλιακά κύτταρα (π.χ.Caco-2) απελευθερώνονται με ένα είδος εκβλάστησης που δεν καταστρέφει άμεσα το κύτταρο [72].

#### 1.4.7. ΕΜΜΕΝΟΥΣΑ ΛΟΙΜΩΞΗ

Η εμμένουσα λοίμωξη από RV έχει επιβεβαιωθεί με την απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες ενώ έχει βρεθεί και σε ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές (ανθρώπους και άλλα είδη θηλαστικών) χωρίς ωστόσο να υπάρχουν δεδομένα μέχρι στιγμής για τους λεπτομερείς μοριακούς μηχανισμούς αυτής της σχέσης ιού-ξενιστή [15].

#### 1.4.8. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΡΟΤΑΪΩΝ

Ως υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα, οι ιοί απαιτούν κυτταρικές λειτουργίες για την αντιγραφή τους. Οι περισσότεροι ιοί δεν διαθέτουν το μηχανισμό για να μεταφράζουν πρωτεΐνες από τα mRNA τους και βασίζονται στα οργανίδια μετάφρασης και τις λειτουργίες του κυττάρου ξενιστή. Πρόσφατα, αποκαλύφθηκε μια πολύ ευρύτερη εμπλοκή κυτταρικών στοιχείων και λειτουργιών στην αντιγραφή του ιού που για τους RVs είναι [12,15]:

- κυτταρικοί υποδοχείς και συν-υποδοχείς για την προσρόφηση
- κυτταρικά ενδοσώματα για την απέκδυση των TLPs σε DLPs
- αλληλεπίδραση των βιροπλασμάτων, των «εργοστασίων ιών» με τα LDs
- αλληλεπίδραση της NSP3 με στοιχεία του κυτταρικού μηχανισμού μετάφρασης
- αλληλεπίδραση της NSP4 με κυτταρικές μεμβράνες που περιέχουν τις ενδοκυτταρικές αποθήκες  $Ca^{2+}$
- αλληλεπίδραση των ιικών μη δομικών πρωτεϊνών με κυτταρικές δομικές πρωτεΐνες (ακτίνη, μικροΐνες)
- αλληλεπίδραση της NSP1 με διάφορα στοιχεία της αρχικής κυτταρικής ανοσοαπόκρισης



## 1.5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Οι RVs μολύνουν κυρίως τα ώριμα κύτταρα που βρίσκονται στις λάχνες του λεπτού εντέρου των θηλαστικών, όπου μπορεί να παρατηρηθεί παρουσία κενοτοπιών και απώλεια επιθηλίου, ακολουθούμενη από υπερπλασία της κρύπτης. Αν και η εξω-εντερική εξάπλωση του RV συμβαίνει συχνά, όπως αποδεικνύεται από την ανίχνευση dsRNA, αντιγόνου και μολυσματικών RVs (περιστασιακά) στον ορό και σε άλλα σημεία του σώματος του ξενιστή [73,74], η σημασία αυτών των εντοπίσεων για την παρουσία παθολογικών ευρημάτων σε ανοσοικανούς ξενιστές δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί [75]. Αντίθετα, στους ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές, οι RVs μπορούν να αντιγράφονται στο ήπαρ, στο χολικό σύστημα και στο πάγκρεας και έχουν συσχετιστεί με χολική ατρησία και παγκρεατίτιδα [76]. Ένα σημαντικό εύρημα (σε ζωικά μοντέλα) είναι η έναρξη της διάρροιας σε ένα πρώιμο χρονικό σημείο, όταν ακόμα απουσιάζουν οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του λεπτού εντέρου [77], πιθανώς λόγω της πρώιμης δράσης της NSP4 [12,15].

Η παθογένεια της λοίμωξης από ροταϊό είναι πολυπαραγοντική και η έκβαση της νόσου εξαρτάται από παράγοντες που αφορούν τόσο τον ιό όσο και τον ξενιστή. Για παράδειγμα, η ηλικία που θα συμβεί η μόλυνση επηρεάζει τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων. Σε νεογέννητα ή θηλάζοντα ποντίκια, η μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε χολική ατρησία. Σε ποντίκια και αρουραίους, ηλικίας 0 έως 14 ημερών, εμφανίζεται διάρροια και εξω-εντερική αντιγραφή του ιού σε κάποιο βαθμό. Σε ενήλικους ποντικούς, η μόλυνση δεν οδηγεί σε πρόκληση διάρροιας. Μετά από γενετική ανάλυση επιλεγμένων στελεχών ιών (με αναδιάταξη) αναγνωρίστηκαν αρκετές ιικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη λοιμογόνο δράση του ιού (VP3, VP4, NSP1, VP6, VP7, NSP2, NSP3 και NSP4) [78,79] και προτάθηκε ότι αυτές οι πρωτεΐνες παίζουν ρόλο στην αποτελεσματικότητα της αντιγραφής του ιού (VP3, NSP2, VP6, και NSP3), στη διακοπή της σύνθεσης των πρωτεϊνών του ξενιστή (NSP3), στην εξω-εντερική εξάπλωση και αντιγραφή του ιού (NSP1 και NSP3), στην είσοδο του ιού στα κύτταρα (VP4 και VP7), στη ρύθμιση της επαγωγής ιντερφερόνης (NSP1) και στην πρόκληση διάρροιας (NSP4)[15].

Από τις μελέτες που έγιναν για την αναγνώριση των παραγόντων που σχετίζονται με τον μηχανισμό πρόκλησης του πιο κοινού κλινικού συμπτώματος της νόσου, της διάρροιας, προέκυψαν αντιφατικά αποτελέσματα. Οι μηχανισμοί στους οποίους αποδόθηκε η πρόκληση διάρροιας ήταν η κακή απορρόφηση λόγω της καταστροφής του επιθηλίου του εντέρου, η ισχαιμία των εντερικών λαχνών, η δράση της NSP4, μιας ιικής εντεροτοξίνης [12,80,81] και η ενεργοποίηση του εντερικού νευρικού συστήματος [82]. Ωστόσο, η μείωση της ικανότητας αντιγραφής του ιού από οποιαδήποτε αιτία, θα μπορούσε να επηρεάσει κάθε έναν από αυτούς τους μηχανισμούς. Στην πραγματικότητα, αρκετές μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπους, έχουν δείξει ότι το επίπεδο της απέκκρισης ιικών σωματιδίων στα κόπρανα

συνδέεται με τη σοβαρότητα της διάρροιας [15]. Ωστόσο, πρόσφατη μελέτη που έγινε στην Ινδία σε συμπτωματικά και ασυμπτωματικά νεογνά, που ήταν μολυσμένα με ένα παρόμοιο στέλεχος ροταϊού, δεν οδήγησε σε συσχέτιση μεταξύ της σοβαρότητας της διάρροιας και είτε της ποσότητας είτε της διάρκειας της απέκκρισης του ιού [75].

Πρόσφατα, η παθογένεια του εμέτου έχει επίσης διασαφηνιστεί μέσω παρατηρήσεων ότι ο RV μπορεί να μολύνει τα κύτταρα εντεροχρωμαφίνης στο έντερο και να διεγείρει την παραγωγή 5-υδροξυτρυπταμίνης (σεροτονίνης) η οποία με τη σειρά της διεγείρει τις δομές του εγκεφαλικού στελέχους που ελέγχουν τον έμετο [83,84].

Η χολική ατρησία μπορεί να προκληθεί σε νεογέννητα ποντίκια μετά από μόλυνση με RV, οδηγώντας σε αποφρακτική χολαγγειοπάθεια, η σοβαρότητα της οποίας εξαρτάται από την ηλικία του ξενιστή κατά τη στιγμή της μόλυνσης καθώς επίσης και από την παρουσία και την ισχύ των έμφυτων ανοσοαποκρίσεων [85]. Σε αυτό το μοντέλο, τα νεογέννητα ποντίκια φαίνεται να προστατεύονται από τη χολική ατρησία μέσω της παθητικής ανοσοποίησης που επιτυγχάνεται είτε με ανοσοποίηση των μητέρων με σωματίδια τύπου RV, είτε με έγχυση υπεράνοσου ορού στα νεογέννητα πριν από τη μόλυνση [86].

Ένα σχετικά νέο πεδίο έρευνας των εντερικών λοιμώξεων είναι η μεταγονιδιωματική ανάλυση των ιών και άλλων μικροβίων που βρίσκονται στο έντερο [87–89] και η συσχέτιση της παρουσίας τους με την ασθένεια. Χρησιμοποιώντας αυτή την προσέγγιση, μπορεί να ανιχνευθούν γονιδιώματα ιών, τα σωματίδια των οποίων δεν είχαν παρατηρηθεί προηγουμένως ούτε είχαν απομονωθεί σε κυτταροκαλλιέργεια. Μέχρι στιγμής, έχουν αναλυθεί κυρίως DNA ιοί, πολλοί από τους οποίους είναι βακτηριοφάγοι. Έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα για την ανίχνευση τόσο DNA όσο και RNA ιών σε δείγματα κοπράνων [90] και έχουν ξεκινήσει εφαρμογές για την ανάλυση του πλήρους ιικής προέλευσης γενετικού υλικού του ανθρώπινου εντέρου [91–93]. Θα είναι σημαντικό να γνωρίζουμε εάν και σε ποιο βαθμό το μικροβίωμα του ανθρώπινου εντέρου, συμπεριλαμβανομένου του βιρώματος, μπορεί να επηρεάσει την παθογένεια των χρόνιων παθήσεων του εντέρου (όπως η νόσος του Crohn και η ελκωτική κολίτιδα) [94]. Χρησιμοποιώντας το μοντέλο γνωτοβιοτικών χοιριδίων για τη λοίμωξη και τη νόσο από RV στους ανθρώπους, παρατηρήθηκε ότι προβιοτικά βακτήρια γαλακτικού οξέος σε σωστή δοσολογία μπορούν να ενισχύσουν την απόκριση κυτοκίνης Th1 και Th2 και να προλάβουν μερικώς τις αλλοιώσεις που προκαλούνται από τους RVs στο επιθήλιο του εντέρου [95,96].

Ίσως ο πιο κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει την ικανότητα μολυσματικότητας των στελεχών του ροταϊού είναι η ομολογία ή η ετερολογία του στελέχους με τον ξενιστή. Ομόλογα στελέχη (στελέχη που απομονώθηκαν από το εν λόγω είδος ξενιστή)

τείνουν να αντιγράφονται αποτελεσματικά, προκαλώντας συχνά διάρροια σε πολύ χαμηλή δόση ενοφθαλμισμού και να εξαπλώνονται αποτελεσματικά σε αυτόν τον ξενιστή. Γενικά, τα ετερόλογα στελέχη (που δεν απομονώνονται συνήθως από τον συγκεκριμένο ξενιστή αλλά βρίσκονται συχνά σε άλλο είδος ξενιστή) αντιγράφονται ελάχιστα σε σύγκριση με τα ομόλογα στελέχη, προκαλούν διάρροια μόνο μετά από μεγάλες δόσεις ενοφθαλμισμού και δεν εξαπλώνονται αποτελεσματικά σε άλλους ευπαθείς ξενιστές. Τα εμπόδια που περιορίζουν το εύρος των ξενιστών, μολονότι σημαντικά, δεν είναι απόλυτα και υπάρχουν πολυάριθμα παραδείγματα ζωονοτικής μετάδοσης σε ανθρώπους [97]. Οι ιικοί παράγοντες που σχετίζονται με τον περιορισμό του εύρους των ξενιστών δεν έχουν διερευνηθεί διεξοδικά και οι μελέτες έχουν περιοριστεί σε πειραματικές μολύνσεις με ανασυνδυασμένους ιούς σε χοίρους και ποντικούς [15].

## 1.6. ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΗ

### 1.6.1. ΕΙΔΙΚΗ ΧΥΜΙΚΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΗ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΡΟΤΑΪΩΝ

Μετά από λοίμωξη με RVs, ενεργοποιείται η επίκτητη ανοσοαπόκριση τόσο από B κύτταρα που παράγουν αντισώματα που είναι ειδικά έναντι των ιικών πρωτεϊνών, όσο και από ειδικά T κύτταρα που αναγνωρίζουν επίτοπους του RV στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων σε σύμπλοκα με αντιγόνα MHC τάξης I και II. Πολλά αντισώματα που παράγονται έναντι της VP7 και της VP4 είναι εξουδετερωτικά (Neutralizing Antibodies, NAb) *in vitro* και προστατευτικά *in vivo*. Αυτή η δράση των Nabs έχει αποδειχθεί μέσω παθητικής μεταφοράς σε ζωικά μοντέλα όπως ποντίκια και γνωτοβιοτικά χοιρίδια [98,99]. Η παθητική μεταφορά των ειδικών για RV CD8+ T κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι παρέχει προστασία [100]. Τα ειδικά αντισώματα για τον RV που έχουν μεταφερθεί διαπλακουντικά πιθανόν να προστατεύουν τα νεογνά από τη μόλυνση [101]. Ωστόσο, είναι επίσης πιθανό να παρεμβαίνουν μέσω ανοσολογικών αντιδράσεων στον εμβολιασμό έναντι του RV [102,103].

Σχετικά με τη συμβολή της χυμικής και κυτταρικής ανοσοαπόκρισης, μελέτες έχουν δείξει ότι τα T κύτταρα βοηθούν στην εξάλειψη του RV μετά την πρωτογενή μόλυνση ενώ τα B κύτταρα μνήμης παρέχουν μακροπρόθεσμη προστασία [104]. Τα χυμικά αντισώματα που ενισχύονται μετά από επαναλαμβανόμενη μόλυνση, κατευθύνονται έναντι επιτόπων ειδικών ως προς τον ορότυπο αλλά παρατηρείται επίσης διασταυρούμενη αντίδραση για τα μόρια της VP4 και της VP7, παρέχοντας έτσι ετερότυπη προστασία [104]. Τα δενδριτικά κύτταρα βρέθηκε ότι είναι απαραίτητα και επαρκή για να επάγουν την ενεργοποίηση των B κυττάρων μετά από μόλυνση με RV σε ποντίκια (*in vivo*) και σε ανθρώπινα κύτταρα (*in vitro*) [105]. Τα CD4 + T

κύτταρα του ανθρώπου που είναι ειδικά για τον RV και κυκλοφορούν στο αίμα, εκφράζουν τον εντερικό υποδοχέα α4β7 [106].

Ωστόσο, η προστασία από τη λοίμωξη από RV δεν συσχετίζεται εξ ολοκλήρου με τη συγκέντρωση των ειδικών NAb's έναντι της VP4 και της VP7. Κατά τη φυσική μόλυνση ή τον εμβολιασμό για RV, τα βρέφη και τα μικρά παιδιά αναπτύσσουν αντισώματα έναντι και άλλων δομικών (VP6, VP2) και μη δομικών (NSP4) πρωτεϊνών. Τα ειδικά αντισώματα για τη VP6 δεν έχουν εξουδετερωτική δράση *in vitro*, αλλά όταν χρησιμοποιήθηκαν ειδικά για την VP6 αντισώματα της κατηγορίας IgA αποδείχθηκε ότι είναι προστατευτικά *in vivo* [107]. Προτάθηκε και έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι τα ειδικά για τη VP6 IgA αντισώματα απορροφώνται («διακυτταρώνονται») από επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου μέσω υποδοχέων της πρωτεΐνης J στη βασική μεμβράνη και σχηματίζουν σύμπλοκα με τα νέα DLPs που απελευθερώνονται από το βιρόπλάσμα, αποτρέποντας έτσι την ωρίμανση τους σε TLPs («ενδοκυτταρική εξουδετέρωση») [12,108,109]. Ωστόσο, έχει επίσης αποδειχθεί ότι τα ποντίκια και οι ασθενείς με έλλειψη IgA εξαλείφουν τον RV μετά από μόλυνση, πιθανώς λόγω αντισταθμιστικής προστατευτικής ανοσίας από αντισώματα IgG [110]. Η παθητική μεταφορά αντισωμάτων ειδικών για την NSP4 είχε σαν αποτέλεσμα την παροχή μερικής προστασίας σε ποντίκια [111], αλλά τα ειδικά αντισώματα για την NSP4 που έχουν παραχθεί από ενεργητική ανοσοαπόκριση δεν φάνηκε να προστατεύουν τα γνωστοβιοτικά χοιρίδια από μόλυνση με RVA [112]. Οι προοπτικές μελέτες έχουν δείξει ότι, μετά από μια ή δύο φυσικές μολύνσεις με RV, τα παιδιά προστατεύονται σε μεγάλο βαθμό από την εκδήλωση σοβαρής νόσου μετά από μόλυνση από διάφορους, επίσης ετερότυπους, RVs [113].

#### 1.6.2. ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΗ

Η λοίμωξη από RV ενεργοποιεί άμεσα διάφορους μηχανισμούς έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης (Innate Immune Responses, IIR), οι οποίοι, μετά την πρωτογενή μόλυνση, εμφανίζονται νωρίτερα από την επίκτητη ανοσολογική απόκριση έναντι του RV [114]. Οι μηχανισμοί IIRs φαίνεται να είναι ειδικοί έναντι του στελέχους RV και του κυτταρικού τύπου [115]. Προς το παρόν δεν είναι πλήρως σαφές σε ποιο βαθμό οι μηχανισμοί IIR, μετά από λοίμωξη με RV, μπορούν να συμβάλλουν στην αλλαγή της πορείας της ασθένειας. Έχει αποδειχθεί ότι η NSP1 των RVs αλληλοεπιδρά με κυτταρικές πρωτεΐνες όπως είναι οι ρυθμιστικοί παράγοντες της ιντερφερόνης 3 (interferon regulatory factors 3, IRF 3) [116], το γονίδιο 5 που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση του μελανώματος (melanoma differentiation-associated gene 5, MDA5)/η μιτοχονδριακή αντιϊκή πρωτεΐνη (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS) [116,117], η πρωτεΐνη καταστολής όγκου p53 [118] και ο παράγοντας 2 που σχετίζεται με τον υποδοχέα TNF (TNF receptor associated factor

2, TRAF2) [119]. Το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της NSP1 με τις παραπάνω κυτταρικές πρωτεΐνες είναι η πρωτεασωματική αποδόμησή τους παρεμποδίζοντας ή μειώνοντας με τον τρόπο αυτό την πρόωπη ενεργοποίηση της απόκρισης της IFN. Η NSP1 προκαλεί επίσης μείωση της ρύθμισης των IRF5 και IRF7 [120] και στοχεύει το γονίδιο I που επάγεται από ρετινοϊκό οξύ (retinoic acid-inducible gene I, RIG-I) [121] του οποίου παρ'όλα αυτά, η ρύθμιση μειώνεται ανεξάρτητα από το πρωτεάσωμα [122]. Η NSP1 αλληλεπιδρά επίσης με το IRF3 μέσω δέσμευσής του στο σημείο διμερισμού της πρωτεΐνης [123,124]. Η λοίμωξη από RVs αναστέλλει επίσης τη φωσφορυλίωση της STAT1 και τη μετάθεση των STAT1/STAT2 στον πυρήνα με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η όποια αντίδραση έναντι του ιού (antiviral state) που επάγεται από την IFN [125–128]. Επιπρόσθετα, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η C-τερματική περιοχή της VP3, περιέχει μια φωσφοδιεστεράση η οποία διασπά το 2', 5'-ολιγοαδενυλικό, εμποδίζοντας έτσι την ενεργοποίηση της RNάσης L με αποτέλεσμα να αναστέλλεται μια ισχυρή απόκριση των μηχανισμών IIR των κυττάρων του ξενιστή [129]. Το RIG-I βρέθηκε ότι δρα ως κυτταροπλασματικός αισθητήρας για τα ssRNAs που εξωθούνται από τα DLPs [130]. Η NSP1 στοχεύει στην προ-αποπτωτική κυτταρική πρωτεΐνη p53, οδηγώντας στην πρωτεασωματική αποδόμησή της με αποτέλεσμα να καθυστερεί τον κυτταρικό θάνατο κατά τα αρχικά στάδια της αντιγραφής του RV [118].

Έχει βρεθεί ότι σε ποντίκια με ανεπάρκεια σηματοδότησης της IFN, η λοίμωξη από RV προκαλεί πιο σοβαρή νόσο [76,78,131]. Άλλωστε, έχει αποδειχτεί σε χοίρους μολυσμένους με RV [132] αλλά και στους ανθρώπους [133], ότι η παραγωγή IFN είναι κυρίαρχος μηχανισμός IIR. Ειδικότερα, τα δενδριτικά κύτταρα του ανθρώπου δεν επιτρέπουν την αντιγραφή του RV, αλλά ξεκινούν μια γρήγορη απόκριση της IFN που μπορεί να διεγείρει την απόκριση των B κυττάρων [105].

Η NSP4 που εκκρίνεται από κύτταρα που έχουν μολυνθεί από RV αποδείχθηκε ότι επάγει τη σύνθεση προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε μακροφάγα ποντικού [134]. Τα CD4+ και CD8+ T κύτταρα που είναι ειδικά για τον RV και τα B κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα α4β7. Έτσι, τα συστατικά του RV αλληλεπιδρούν μέσω διάφορων μηχανισμών με μόρια και «μονοπάτια» των κυτταρικών μηχανισμών IIR [135,136].

### 1.6.3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Σε γενικές γραμμές, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας συγκεκριμένων επιπέδων ειδικών αντισωμάτων έναντι του RV και της προστασίας που προσφέρουν (π.χ. παρουσία ειδικών αντισωμάτων IgA έναντι του RV στα κόπρανα σε τίτλο > 1:80, παρουσία ειδικών αντισωμάτων IgA έναντι του RV στον ορό σε τίτλο > 1:200, παρουσία ειδικών αντισωμάτων IgG έναντι του RV στον ορό σε τίτλο > 1:800) [100].

Αν και έχουν διατυπωθεί αντικρουόμενες απόψεις [114], έχει επίσης προταθεί η σημασία των επιπέδων των αντισωμάτων IgA έναντι του RV ως προστατευτικών [137,138]. Ωστόσο, επειδή υπάρχει έλλειψη συσχέτισης μεταξύ των σχετικά χαμηλών τίτλων Nabs μετά από φυσική λοίμωξη με RV ή εμβολιασμό και της παροχής υψηλών επιπέδων προστατευτικής ανοσίας, είναι πιθανό να υπάρχουν επιπρόσθετοι παράγοντες που είναι σημαντικοί για την παροχή προστασίας [139]. Είναι ενδιαφέρον ότι και τα δύο εμβόλια που κυκλοφορούν επί του παρόντος είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά. Τα εμβόλια αυτά είναι αποτελεσματικά σε χώρες με εύκρατο κλίμα αν και οι συσχετίσεις προστασίας δεν έχουν προσδιοριστεί πλήρως [139,140].

## 1.7. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ, ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

### 1.7.1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Η μόλυνση με RV μπορεί να παραμείνει ασυμπτωματική ή να οδηγήσει σε οξεία γαστρεντερίτιδα με ήπια έως σοβαρή διάρροια, έμετο και διάφορους βαθμούς αφυδάτωσης. Η θερμοκρασία του σώματος είναι συχνά, αλλά μόνο μέτρια, αυξημένη. Ο έμετος προηγείται της διάρροιας και διαρκεί για μικρότερο χρονικό διάστημα (τρεις έναντι πέντε ημερών). Η ανισορροπία των ηλεκτρολυτών οδηγεί συχνά σε σοβαρή αφυδάτωση. Ο θάνατος από την ασθένεια που προκαλεί ο RV οφείλεται κυρίως σε σοβαρή αφυδάτωση και καρδιαγγειακή ανεπάρκεια. Παρά το γεγονός ότι ο θάνατος από τη νόσο είναι σπάνιος σε ανεπτυγμένες και ημι-ανεπτυγμένες χώρες, κυρίως λόγω της έγκαιρης διαθεσιμότητας των μέτρων επανυδάτωσης, είναι συχνή έκβαση σε χώρες της υποσαχάριας Αφρικής και της νοτιοανατολικής Ασίας [141]. Κατά τη φυσική μόλυνση ή τον μη επιτυχημένο εμβολιασμό, τα παιδιά με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (severe combined immunodeficiency, SCID) μπορούν να αναπτύξουν χρόνια λοίμωξη και νόσο από RV [139,142]. Σε παιδιά με χρόνια λοίμωξη, έχει αναφερθεί η ανάδυση RVs με «ασυνήθιστα» πρότυπα μετανάστευσης του RNA λόγω των αναδιατάξεων του γονιδιώματος [143].

### 1.7.2. ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Για τη διαφορική διάγνωση, οι κύριοι ιοί που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι οι καλυκοϊοί (νοροϊός, σαποϊός), οι αστροϊοί και λιγότερο συχνά οι εντερικοί αδενοϊοί και ο ιός Aichi. Για την αναζήτηση του αιτίου της νόσου και την τελική διάγνωση είναι χρήσιμη η χρήση της multiplex RT-PCR [144]. Άλλοι ιοί του εντέρου που προκαλούν

ως επί το πλείστον ασυμπτωματική λοίμωξη είναι διαφορετικοί εντεροϊοί και, στους ανοσοκατασταλαμένους, οι ιοί *ricobirnavirus*, ο κυτταρομεγαλοϊός και ο HIV [12].

### 1.7.3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Οι κλινικές και επιδημιολογικές εκδηλώσεις της νόσου (σοβαρή διάρροια, έμετος, αφυδάτωση) δεν επαρκούν για να τεθεί διάγνωση. Η ακριβής διάγνωση απαιτεί ανίχνευση του ιού ή του ιικού αντιγόνου ή μιας ειδικής ορολογικής απόκρισης έναντι του ιού. Η διάγνωση της λοίμωξης με RV γίνεται με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ή ELISA και πιο πρόσφατα με τη χρήση RT-PCR [12,15]. Από αυτές τις μεθόδους, η ELISA εφαρμόζεται συχνότερα σε επίπεδο ρουτίνας (λόγω της ευκολίας χρήσης και της ταχύτητας λήψης αποτελέσματος). Εντούτοις, η RT-PCR, η οποία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και ειδική [145] και είναι επίσης κατάλληλη για τον προσδιορισμό του γονότυπου [146] έχει γίνει η μέθοδος αναφοράς. Λόγω της συνεχούς γονιδιακής μετατόπισης με σημειακές μεταλλάξεις, οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του γονότυπου πρέπει να αλλάζονται περιοδικά [147].

Σε μια πρόσφατη μελέτη, έγινε σύγκριση των γονιδιωμάτων των G10P[11] που ανιχνεύθηκαν σε 20 ασυμπτωματικά και 19 συμπτωματικά νεογνά κατά τη χρονική περίοδο 2003-2004 στην Ινδία. Οι αλληλουχίες των γονιδιωμάτων των ιών ανακτήθηκαν μετά από προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων με τεχνολογία Sanger και next generation sequencing και βρέθηκε ότι ήταν πανομοιότυπες. Στη μελέτη αυτή, δεν βρέθηκαν διαφορές σε νουκλεοτίδια ή αμινοξέα που να σχετίζονται με την παρουσία συμπτωματικής ή ασυμπτωματικής λοίμωξης [148]. Επομένως, άλλοι παράγοντες οι οποίοι δεν έχουν ακόμα προσδιοριστεί, καθορίζουν την εκδήλωση συμπτωμάτων.

Από το 1973, έχουν αναπτυχθεί πολλές δοκιμές για την ανίχνευση ροταϊού στα κόπρανα [15] αν και σήμερα οι ανοσολογικές δοκιμές και οι αναλύσεις που βασίζονται σε RT-PCR αποτελούν τα κύρια διαγνωστικά εργαλεία. Τα βέλτιστα δείγματα για ανίχνευση του ιού χρησιμοποιώντας παραδοσιακές μεθόδους (π.χ. EM ή ELISA) είναι αυτά που λαμβάνονται από την πρώτη έως την τέταρτη ημέρα από την εκδήλωση της νόσου. Εντούτοις, η απέκκριση του ιού μπορεί να συνεχιστεί για έως και τρεις εβδομάδες, ανάλογα με τη διάρκεια των συμπτωμάτων και μπορεί να ανιχνευθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα με τη χρήση της RT-PCR [149]. Η απέκκριση ιικών σωματιδίων, όπως ανιχνεύεται με συμβατικές τεχνικές, όπως η ELISA, συνήθως συμπίπτει με τη διάρκεια της διάρροιας. Ωστόσο, η διάρροια μπορεί να συνεχιστεί για επιπλέον δύο έως τρεις ημέρες και μέχρι την παύση της διάρροιας, τα αποτελέσματα της ELISA μπορεί να είναι θετικά [15]. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η

άμεση παρατήρηση δείγματος κοπράνων στο EM για την ανίχνευση ροταϊού [150]. Το EM έχει το πλεονέκτημα της υψηλής ειδικότητας επειδή οι ροταϊοί έχουν χαρακτηριστική μορφολογική εμφάνιση, αλλά υπάρχουν σημαντικά μειονεκτήματα όπως η σχετικά χαμηλή απόδοση και το αυξημένο κόστος του εξοπλισμού. Σε πρώιμες μελέτες, η άμεση εξέταση κοπράνων στο EM επέτρεψε την ανίχνευση του ροταϊού σε ποσοστό 80% έως 90% των θετικών δειγμάτων σε σύγκριση με τις ανοσολογικές τεχνικές. Πλέον, είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση ροταϊών σε δείγματα κοπράνων διάφορες μέθοδοι με υψηλότερη απόδοση από το EM [149].

Η μέθοδος εκλογής σε πολλά εργαστήρια είναι η ELISA, επειδή είναι ευαίσθητη, δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό, διατίθεται εμπορικά, είναι σχετικά οικονομική και συχνά έχει ενσωματωμένο μάρτυρα για την ανίχνευση μη ειδικών αντιδράσεων. Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες μέθοδοι ανίχνευσης του ιού, όπως η ανοσοηλεκτροφόρηση αντίθετης φοράς (Counter immunoelectroosmophoresis), η ηλεκτροφόρηση του RNA του ροταϊού σε πήκτωμα, η αντίστροφη παθητική δοκιμή αιμοσυγκόλλησης (reverse passive hemagglutination assay, RPHA) και η συγκόλληση σωματιδίων latex. Πλέον, διατίθεται μια ποικιλία ευαίσθητων και ειδικών εμπορικών κιτ για την ανίχνευση ροταϊών που χρησιμοποιούν κάποια μορφή ανοσοπροσδιορισμού τύπου ELISA στερεάς φάσης. Για την ανίχνευση ροταϊών της ομάδας B ή C και για τη μέτρηση των αντισωμάτων έναντι αυτών των ιών, αναπτύχθηκαν επίσης διάφορες ανοσοενζυμικές δοκιμές σε ερευνητικά εργαστήρια [15].

Από την ποικιλία των ερευνητικών εργαστηριακών τεχνικών που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των ροταϊών της ομάδας A, η σημαντικότερη μετά την ανοσολογική δοκιμή στερεάς φάσης είναι η RT-PCR, η οποία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και ειδική και έχει το πρόσθετο πλεονέκτημα ότι μπορεί να επιτευχθεί προσδιορισμός των γενότυπων [149]. Για παράδειγμα, με τη χρήση RT-PCR ανιχνεύθηκε η απέκκριση του ιού από 4 έως 57 ημέρες μετά την έναρξη της διάρροιας και το 30% των παιδιών που βρέθηκαν να είναι ELISA θετικά σε πρώιμο στάδιο, απέκριναν ποσότητες του ιού που μπορούσαν να ανιχνευθούν με ELISA για 25 σε 57 ημέρες [145]. Η PCR έχει επίσης εφαρμοστεί στην ανίχνευση ροταϊών ομάδας B και C [15].

Η ανάκτηση ροταϊών από δείγματα κοπράνων απευθείας σε κυτταροκαλλιέργεια είναι επίσης δυνατή, αλλά αυτή η προσέγγιση δεν είναι πρακτική εκτός αν εξυπηρετεί ειδικούς πειραματικούς σκοπούς. Αυτή η μέθοδος φαίνεται να είναι περίπου 75% αποτελεσματική σε σχέση με την ανίχνευση αντιγόνου χρησιμοποιώντας συμβατικές δοκιμές [15]. Η αποτελεσματικότητα της ανάκτησης του ιού από βαμβακοφόρους στειλεούς που χρησιμοποιούνται για λήψη δείγματος κοπράνων από το ορθό, σε κυτταροκαλλιέργειες είναι σημαντικά μικρότερη. Η ανάπτυξη του ροταϊού σε καλλιέργειες ιστών επιτρέπει τον προσδιορισμό του



ορότυπου του ιού με δοκιμασία εξουδετέρωσης. Ωστόσο, ο ορότυπος του ροταϊού μπορεί να προσδιοριστεί με ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων των VP7 και VP4. Η χρήση της RT-PCR επέτρεψε επίσης τον προσδιορισμό του γενότυπου των ροταϊών σε δείγματα τα οποία δεν μπορούσαν να τυποποιηθούν με χρήση ELISA ή να καλλιεργηθούν [146].

Στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκε ποικιλία τεχνικών για την εκτίμηση της ανοσολογικής απόκρισης μετά από λοίμωξη από ροταϊό, όπως οι δοκιμές IEM, η σύνδεση συμπληρώματος (complement fixation, CF), ο ανοσοφθορισμός, η δοκιμασία της αιμοσυγκόλλησης, η ELISA, η οροεξουδετέρωση, η αναστολή αιμοσυγκόλλησης, η αναστολή της αντίστροφης παθητικής αιμοσυγκόλλησης, η ELISpot και οι δοκιμασίες ανοσοκυτταροχημικής χρώσης. Επί του παρόντος, οι πιο χρήσιμες δοκιμές είναι η ELISA για τον προσδιορισμό των IgA και IgG και οι δοκιμασίες εξουδετέρωσης. Η μέθοδος CF είναι περίπου εξίσου αποτελεσματική με τις άλλες μεθόδους για την ανίχνευση αντισωμάτων σε ασθενείς ηλικίας μεταξύ 6 και 24 μηνών, αλλά δεν είναι τόσο αποτελεσματική στους ενήλικες ή στα βρέφη ηλικίας κάτω των 6 μηνών και γενικά δεν χρησιμοποιείται σήμερα. Σε βρέφη και ενήλικες, ο ανοσοφθορισμός και η ELISA για IgG, IgA και IgM αντισώματα είναι οι πιο αποτελεσματικές και ευαίσθητες μέθοδοι [15].

Δεδομένου ότι τα αντισώματα IgA δεν μεταφέρονται διαπλακουντικά στο έμβρυο, η ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων IgA αποτελεί τη δοκιμασία επιλογής για την εκτίμηση της ανοσολογικής απάντησης σε βρέφη ηλικίας κάτω των 9 μηνών καθώς στην ηλικία αυτή έχουν ακόμα μητρικά αντισώματα IgG [151]. Αυτή η δοκιμασία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση αντισωμάτων στο σάλιο, σε υγρό του δωδεκαδάκτυλου και στα κόπρανα και αποτελεί τη δοκιμή που χρησιμοποιείται στις περισσότερες μελέτες που αποσκοπούν στην εκτίμηση του ρυθμού της ανοσοαπόκρισης έναντι των εμβολιών για τον ροταϊό [152].

Η διερεύνηση της αντιγονικής ποικιλομορφίας των ροταϊών μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση στελεχών προσαρμοσμένων σε κυτταροκαλλιέργειες σε δοκιμές διασταυρούμενης εξουδετέρωσης χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα που είναι ειδικά για τον κάθε ορότυπο (monoclonal antibodies, MAbs) και υπεράνοσου ορού έναντι συγκεκριμένου στελέχους [153]. Εντούτοις, η προσαρμογή της κυτταροκαλλιέργειας είναι μια ιδιαίτερα απαιτητική μέθοδος και κάποια στελέχη δεν είναι δυνατόν να απομονωθούν σε συνήθεις τύπους κυττάρων (π.χ. MA104, CaCO<sub>2</sub> και Vero). Επειδή ο ροταϊός απεκκρίνεται μέσω των κοπράνων σε μεγάλες ποσότητες (έως 10<sup>11</sup> σωματίδια / g κοπράνων), η άμεση ανίχνευση αντιγόνου και η τυποποίηση είναι μια ευκολότερη εναλλακτική λύση. Με την πάροδο του χρόνου αναπτύχθηκαν πολυάριθμα MAbs που είναι κοινά και άλλα που είναι ειδικά ως προς τον τύπο και ο συνδυασμός αυτών σε ανοσοενζυμικές δοκιμές τύπου sandwich επέτρεψε την κατανόηση του παγκόσμιου επιπολασμού σημαντικών

στελεχών του ροταϊού του ανθρώπου [154,155]. Τα πιο χρήσιμα αντισώματα που είναι ειδικά για τον ορότυπο του ιού είναι εκείνα που δημιουργούνται έναντι της πρωτεΐνης VP7.

Για τον χαρακτηρισμό των ροταϊών, η ανάπτυξη τεχνικών υβριδοποίησης προηγήθηκε της ανάπτυξης τεχνικών βασισμένων στην PCR. Σηματοδοτημένα τμήματα γονιδιώματος ή τμήματα γονιδίων χρησίμευσαν ως ανιχνευτές (probes) σε πρώιμες μελέτες, ενώ μικρά, ειδικά ως προς τον τύπο ολιγονουκλεοτίδια, χρησιμοποιήθηκαν για υβριδισμό σε ιικό RNA [156–158]. Η χρήση μικροσυστοιχιών που επέτρεψε την ανίχνευση μιας ποικιλίας γνωστών ειδικών χαρακτηριστικών των γονότυπων υπήρξε το τελευταίο επίτευγμα των τεχνικών υβριδοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό του ροταϊού [9,159]. Αν και δεν χρησιμοποιήθηκαν συστηματικά, μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 2000, οι τεχνικές υβριδισμού ολόκληρου του γονιδιώματος αποτέλεσαν πολύτιμο εργαλείο για την εκτίμηση της γενετικής σχέσης μεταξύ δύο οποιωνδήποτε στελεχών ροταϊού [160].

Οι πληροφορίες σχετικά με την αλληλουχία του γονιδιώματος των ροταϊών οδήγησε ακολούθως στην ανάπτυξη τεχνικών βασιζόμενων στην PCR, συμπεριλαμβανομένων των multiplex nested ή hemi-nested αντίστροφης μεταγραφής δοκιμών PCR (multiplex nested ή hemi-nested RT-PCR) για τον προσδιορισμό του γενότυπου. Στις δοκιμές αυτές, χρησιμοποιούνται μίγματα εκκινητών που είναι ειδικοί για κάθε γενότυπο με σκοπό την ανίχνευση των πιο κοινών γενότυπων του ροταϊού. Οι διαφορές στο μέγεθος των προϊόντων της PCR που προκύπτουν από τους ειδικούς εκκινητές, χρησιμεύουν ως βάση για τον προσδιορισμό του γενότυπου των ροταϊών. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, αναπτύχθηκαν διάφορες μορφές ανάλυσης και οι πιο δημοφιλείς ενημερώνονταν συνεχώς με την πάροδο του χρόνου [147,161,162]. Οι δοκιμές nested multiplex PCR αποτέλεσαν τη συνιστώμενη τεχνική από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) για την επιτήρηση των ροταϊών. Η καθολική πρόσβαση στις δοκιμές PCR και στα αντιδραστήρια τυποποίησης και η εξαιρετική επαναληψιμότητα κατέστησαν αυτή τη μέθοδο την πλέον χρησιμοποιούμενη τα τελευταία 25 χρόνια για την παρακολούθηση των στελεχών σε επίπεδο ρουτίνας [160].

Η RT-PCR σε συνδυασμό με την αλληλούχιση του DNA είναι ένα εναλλακτικό εργαλείο που εφαρμόστηκε πιο πρόσφατα για τον προσδιορισμό των γενότυπων του ροταϊού [161,163]. Σε αυτή τη δοκιμή, τα τμήματα γονιδίων που υφίστανται προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων κυμαίνονται από λίγα εκατοντάδες ζεύγη βάσεων έως 1 kilo ζεύγη βάσεων, ανάλογα με τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται για ενίσχυση. Μετά τη χορήγηση του εμβολίου, η αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων έχει καταστεί σημαντική εργαστηριακή τεχνική δεδομένου ότι δίνεται μεγαλύτερη προσοχή στην επαγόμενη από το εμβόλιο επιλογή στελέχους, στην ανίχνευση στελεχών που προέρχονται από εμβόλια και στην πιθανή ανταλλαγή

γενετικού υλικού μεταξύ των στελεχών του πεδίου και του εμβολίου. Η πρόοδος στις τεχνολογίες αλληλούχισης, όπως η διαθεσιμότητα μαζικών πλατφορμών παράλληλης αλληλούχισης, φαίνεται να συμπληρώνουν άλλες μεθόδους και ενδέχεται να αντικαταστήσουν εντελώς αυτές τις μεθόδους στο μέλλον [160,164–168].

#### 1.7.4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία βασίζεται κατά κύριο λόγο στην ενυδάτωση του ασθενούς (από του στόματος ή ενδοφλέβια) [12,169]. Έχουν επίσης προταθεί διάφορες συνθέσεις διαλυμάτων αλάτων επανενυδάτωσης για χρήση από το στόμα [143,170] ενώ επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία διαλύματα με βάση το ρύζι [171]. Η χρήση της λοπεραμίδης, των αντιχολινεργικών φαρμάκων και των προσροφητικών δεν συνιστάται [172]. Η ρακεκαδοτρίλη, ένας αναστολέας της εγκεφαλινάσης που καταστέλλει το εντερικό νευρικό σύστημα που ενεργοποιείται μετά από λοίμωξη με RV [82,173], η γρανισετρόνη, ένας ανταγωνιστής του υποδοχέα της σεροτονίνης και ανταγωνιστές των αγγειοδραστικών εντερικών πεπτιδίων [174] βρέθηκε επίσης ότι βοηθούν στη μείωση της σοβαρότητας της οξείας διάρροιας. Τα διαλύματα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις αντισωμάτων έναντι του RV βρέθηκε ότι είναι ευεργετικά τόσο για τη θεραπεία της νόσου όσο και σαν προληπτικό μέτρο [175,176].

Πρόσφατα, τμήματα αντισώματος μονής αλύσου που προέρχονται από λάμα, τα οποία είναι ειδικά για την VP6 του RV, φάνηκε ότι παρέχουν ευρέως διασταυρούμενη αντίδραση *in vitro* και μειώνουν την αποβολή του ιού σε μολυσμένα ποντίκια [177–179]. Αυτό το αντίσωμα φαίνεται να είναι αποτελεσματικό καθώς προκαλεί μείωση της αντιγραφής του RV στα γνωστοβιοτικά χοιρίδια [180] και είχε μέτρια ευεργετική επίδραση στη νόσο από RV σε ανθρώπους [181,182]. Το αντίσωμα που έχει μέγεθος μόνο 15 kDa [183] παρέμεινε δραστικό μετά από μακροχρόνια αποθήκευση (> 1 έτος) και ήταν ανθεκτικό στη θέρμανση σε 94 °C για 90 λεπτά [182]. Επίσης εκφράστηκε σε υψηλά επίπεδα σε διαγονιδιακό ρύζι (Mucorice-ARP1), σε πειραματικές μελέτες, κατέστειλε το φορτίο RV τόσο σε ανοσοϊκανά όσο και σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια και επίσης παρείχε προστασία από μόλυνση με RV [182]. Αυτό και παρόμοια παρασκευάσματα αντισωμάτων έχουν ρεαλιστικές δυνατότητες για θεραπευτική και προφυλακτική χρήση στον άνθρωπο [184].

Άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις συνίστανται στη χρήση του ευρέος φάσματος αντιϊκού νιταζοξανιδίου [185–187] και των προβιοτικών όπως υποστηρίζεται από μελέτες σε γνωστοβιοτικά χοιρίδια [188–190].

## 1.8. ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ

Οι ροταϊοί προκαλούν το 5-10% όλων των περιστατικών οξείας γαστρεντερίτιδας σε βρέφη και νεαρά παιδιά ηλικίας <5 ετών και σε ποσοστό 30% η νόσος από RV είναι αρκετά σοβαρή ώστε να απαιτείται θεραπεία σε κέντρα πρωτοβάθμιας φροντίδας ή νοσοκομεία [191–193]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, πριν από τον εμβολιασμό, οι RVs ήταν η αιτία πρόκλησης τριών εκατομμυρίων επεισοδίων νόσου ετησίως, απαιτώντας 50.000 επισκέψεις σε γιατρό και 60.000 νοσηλείες, αλλά αναφέρθηκαν μόνο 20-40 θάνατοι [194,195]. Παρόμοιοι αριθμοί αναφέρθηκαν στην Ευρώπη, με εξαίρεση ότι ο αριθμός των θανάτων ήταν περίπου 200 [196,197]. Ωστόσο, στις χώρες της υποσαχάριας Αφρικής και της Νότιας Ασίας, η νόσος από RV συνδέεται με υψηλή θνησιμότητα [141,198].

Παρά την μεγάλη γονιδιωματική και αντιγονική ποικιλομορφία των RVs, μόνο ένας μικρός αριθμός τύπων RV επικράτησαν στους ανθρώπους κατά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες παγκοσμίως. Οι τύποι των RVs που κυκλοφορούν σε υψηλή συχνότητα είναι οι G1P1A[8], G2P1B[4], G3P1A[8], G4P1A[8] και πιο πρόσφατα οι G9P1A[8] και G12P1A[8], προκαλώντας το 80-90% όλων των μολύνσεων με RV στη Βόρεια Αμερική, την Ευρώπη και την Αυστραλία [199–201]. Αντίθετα, στις χώρες της Αφρικής, της Ασίας και της Νότιας Αμερικής, άλλοι γονότυποι όπως οι G5, G6 και G8 είναι οι επικρατέστεροι [184,202–205]. Όσον αφορά την εκτίμηση του επιπολασμού συγκεκριμένων γονότυπων RVA, πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψιν το πρόβλημα της μεροληπτικής δειγματοληψίας (sampling bias).

Μετά την εμφάνιση του προσδιορισμού του γονότυπου των RVs μέσω της RT-PCR [155,206], έγινε δυνατή η διεξαγωγή λεπτομερών μελετών για τη μοριακή επιδημιολογία των RVs. Ο προσδιορισμός του γονότυπου έχει τεράστια αξία για την εκτίμηση της εξέλιξης και την επιδημιολογία των RVs στους ανθρώπους, τα θηλαστικά και τα πτηνά [207,208]. Ωστόσο, η σημασία της τυποποίησης των RVs για την επιτυχία του εμβολιασμού μπορεί να έχει υπερεκτιμηθεί. Μεταξύ άλλων γεγονότων, η ευρεία ετερότυπη αποτελεσματικότητα ενός μονοσθενούς εμβολίου για τον RV (Rotarix®) θέτει υπό αμφισβήτηση αυτό το «δόγμα». Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα κρούσματα οξείας γαστρεντερίτιδας που προκλήθηκαν από είδη Β των RVs στην Κίνα [209] ενώ επίσης έχουν αναφερθεί μεμονωμένες περιπτώσεις λοιμώξεων από είδη Β των RV στο Μπανγκλαντές και την Ινδία [210,211]. Οι μολύνσεις με είδη RVC είναι ως επί το πλείστον ασυμπτωματικές ή με ήπια κλινικά συμπτώματα, αλλά μπορεί να προκαλέσουν διάρροια σε ενήλικες [212]. Οι λοιμώξεις με τα είδη RVD, RVF και RVG εντοπίζονται κυρίως σε πτηνά ενώ οι λοιμώξεις με τα είδη RVH ανιχνεύθηκαν σε χοιρίδια [213–215] και σε ανθρώπους [216].

Οι RVs είναι πολύ μεταδοτικοί για τους παρακάτω λόγους: (1) μικρός αριθμός σωματιδίων του ιού σε χαμηλή αναλογία (αριθμός των σωματιδίων του ιού /

μολυσματικές μονάδες) αρκεί για να προκαλέσει παραγωγική μόλυνση σε ένα ευπαθές άτομο [217,218], (2) μεγάλη ποσότητα σωματιδίων του ροταϊού αποβάλλεται στα κόπρανα (έως και  $10^{11}$  σωματίδια / ml) κατά τη διάρκεια του οξέως σταδίου της μόλυνσης [219] ή για μεγαλύτερες περιόδους από μολυσμένους ανοσοκατασταλαμένους ξενιστές [220]. και (3) τα σωματίδια ροταϊού είναι πολύ ανθεκτικά στις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH κ.λπ [221,222]. Η μετάδοση γίνεται συνήθως μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού και η περίοδος επώασης είναι σύντομη (1-2 ημέρες). Ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την πρόκληση συμπτωματικής λοίμωξης από RV είναι η παραμονή σε κέντρα φροντίδας παιδιών [223,224]. Ωστόσο, μικρές επιδημίες RV έχουν αναφερθεί σε ηλικιωμένους (σε ΚΑΠΗ, στα γηροκομεία, κλπ.) [225]. Τέλος, οι νοσοκομειακές λοιμώξεις με RV είναι συχνές και δύσκολο να εξαλειφθούν [226].

Η εξέλιξη των RVs έχει διασαφηνιστεί μετά από προσδιορισμό των γονότυπων με τη χρήση RT-PCR [208] και έχουν αναγνωρισθεί διάφοροι μηχανισμοί [227] όπως:

- συχνές σημειακές μεταλλάξεις σε όλα τα τμήματα RNA, είτε σποραδικές είτε συσσωρευμένες διαδοχικά [228–236].
- αναδιάταξη του γονιδιώματος των RV που εμφανίζεται σε κύτταρα και οργανισμούς που έχουν μολυνθεί από δύο τύπους RV in vivo [237] και συχνά εμπλέκονται στο ζωνοτικό τύπο μετάδοσης [164,202,205,238–243].
- αναδιατάξεις του γονιδιώματος, που συνίστανται σε μερικές επαναλήψεις ή διαγραφές αλληλουχιών νουκλεοτιδίων των επιμέρους τμημάτων, μια ειδική μορφή ανασυνδυασμού [244–247].
- πραγματικός ανασυνδυασμός γονιδιώματος που περιλαμβάνει διάφορα τμήματα [232,248–252].
- πολλοί από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς που δρουν σε συνδυασμό.

Οι κύριοι μηχανισμοί φαίνεται να είναι σημειακές μεταλλάξεις που συμβαίνουν συνεχώς λόγω του υψηλού ποσοστού σφάλματος της RdRp των RVs [228] και των αναδιατάξεων του γονιδιώματος. Οι RVs των ζώων μπορούν επίσης να μεταδοθούν απευθείας στους ανθρώπους [242,253].

## 1.9. ΠΡΟΛΗΨΗ: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΡΟΤΑΪΩΝ, ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΑ ΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΡΟΤΑΪΟΥΣ

Από τη στιγμή που οι RVs ανακαλύφθηκαν ως σημαντικοί παθογόνοι παράγοντες του εντέρου στα παιδιά πριν από περισσότερα από 40 χρόνια, επιστήμονες και κλινικοί γιατροί συνένωσαν τις δυνάμεις τους για την ανάπτυξη ενός εμβολίου για τον ροταϊό. Από μελέτες σε ζωικά μοντέλα κατέστη προφανές ότι η προστασία έναντι της νόσου που προκαλούν οι RVs μπορεί να επιτευχθεί με παθητική μεταφορά ειδικών προϊόντων ανοσολογικής απόκρισης όπως αντισώματα και T κύτταρα ή με εμβολιασμό [100,104,254–256]. Οι προοπτικές μελέτες σε μικρά παιδιά ανέδειξαν ότι: (1) η πρωτοπαθής λοίμωξη από τον RV εμφανίζεται κυρίως κατά το πρώτο έτος της ζωής και γενικά είναι συμπτωματική (2) οι επιμολύνσεις με RV κατά τη διάρκεια των πρώτων 2-3 ετών ζωής είναι συχνές αλλά σπάνια συνοδεύονται από οξεία γαστρεντερίτιδα (ακόμα και όταν η μόλυνση οφείλεται σε RVs τύπου G/P που διαφέρουν από αυτόν της αρχικής μόλυνσης) [257] (3) η προστασία που επιτυγχάνεται μετά από επαναλαμβανόμενες φυσικές λοιμώξεις συσχετίζεται με την παρουσία αντισωμάτων έναντι του RV στον ορό και, το πιο σημαντικό, στο έντερο (IgA αντισώματα) [258,259]. Έτσι, η νόσος που προκαλείται από RV σε ανθρώπους θεωρήθηκε ότι μπορεί να προληφθεί με τη χρήση του εμβολίου. Αρχικά, αναπτύχθηκαν εμβόλια από ζώντες ιούς ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης, καθώς φαινόταν ιδανικά λόγω της μίμησης μιας αλληλουχίας επαναλαμβανόμενων φυσικών μολύνσεων με αποτέλεσμα την προστασία από σοβαρή νόσο (προσέγγιση Jennerian) [260]. Τα αρχικά ελπιδοφόρα αποτελέσματα που προέκυψαν από ένα ζωντανό εξασθενημένο βόειο εμβόλιο για τον RV (στέλεχος RIT 4237) στη Φινλανδία δεν κατέστη εφικτό να αναπαραχθούν από δοκιμές που έγιναν σε αναπτυσσόμενες χώρες και οι δοκιμές πάνω σε αυτό το υποψήφιο εμβόλιο διακόπηκαν [261]. Ένα άλλο βόειο στέλεχος RV, το στέλεχος WC3 και ένα στέλεχος RV πιθήκου, το RRV, ήταν παρομοίως ανεπαρκή ή μεταβλητής αποτελεσματικότητας στη μονοσθενή μορφή τους [262,263]. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε μια τροποποίηση της προσέγγισης Jennerian αναπτύσσοντας ένα τετραδύναμο εμβόλιο που αποτελούνταν από ανάμειξη του εξασθενημένου RRV (G3P7[5]) και των μονο-ανασυγκροτητών που περιείχαν τα γονίδια που κωδικοποιούν την VP7 των ανθρώπινων G1, G2 και G4 γονότυπων στο γενετικό υπόβαθρο των άλλων 10 RNA τμημάτων του στελέχους RRV [260]. Το τετραδύναμο ανθρώπινο ανασυνδυασμένο εμβόλιο που βασίστηκε στο RRV ήταν αποτελεσματικό σε αρκετές δοκιμές φάσης III [264–266].

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, το 1998 χορηγήθηκε άδεια για το εμβόλιο αυτό και παρήχθη με το όνομα RotaShield® (Wyeth Lederle Vaccines). Κατά τη διάρκεια της περιόδου 1998/99 εφαρμόστηκε ως εμβόλιο γενικής χρήσης (universal mass vaccination, UMV) σε περισσότερα από 1 εκατομμύριο παιδιά στις ΗΠΑ. Εντούτοις, όταν εμφανίστηκαν περιπτώσεις εγκολεασμού του εντέρου σε χρονική συσχέτιση με

τον εμβολιασμό για RV, ο CDC και ο AAP συνέστησαν τη διακοπή του εμβολιασμού. Σε έρευνες παρακολούθησης, βρέθηκε ότι ο κίνδυνος για παρουσία εγκολεασμού του εντέρου που να σχετίζεται με τον εμβολιασμό για RV ήταν περίπου 1: 2500 [267], οδηγώντας στην εθελοντική διακοπή της παραγωγής του εμβολίου από τον κατασκευαστή. Ακολούθησε μια σημαντική διαμάχη σχετικά με το μέγεθος του κινδύνου εμφάνισης εγκολεασμού του εντέρου λόγω του εμβολίου [268–275], που με τη σειρά της οδήγησε σε μια σημαντικά χαμηλότερη εκτίμηση (1:10.000 ή χαμηλότερη) αμφισβητώντας την απόφαση για διακοπή της χρήσης του τετραδύναμου εμβολίου, θέτοντας παράλληλα το ζήτημα ηθικής που προέκυπτε λόγω της στέρησης του εμβολίου από τις αναπτυσσόμενες χώρες στις οποίες η θνησιμότητα από τη νόσο που προκαλεί ο RV είναι υψηλή [276].

Μετά από αυτή την αντίδραση, έγιναν εκτενείς προσπάθειες για την ανάπτυξη εναλλακτικών εμβολίων για τον RV. Ένα από τα υποψήφια εναλλακτικά εμβόλια ήταν ένα μονοσθενές ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης εμβόλιο (G1P1A[8]), που προερχόταν από το ανθρώπινο στέλεχος RV 89-12 και η απώλεια της λοιμογόνου δύναμης του προκλήθηκε μετά από σειριακή διέλευση σε κυτταροκαλλιέργειες. Σε μια μεγάλη κλινική δοκιμή φάσης III [277], βρέθηκε ότι αυτό το εμβόλιο είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό έναντι της σοβαρής νόσου που προκαλείται από ομόλογα στελέχη RV καθώς επίσης και ετερόλογα στελέχη όπως τα G3P[8], G4P[8], αλλά και το G2P[4], αν και σε μικρότερο βαθμό [278]. Το εμβόλιο έλαβε άδεια για τον εμβολιασμό των βρεφών το 2005, και έκτοτε χρησιμοποιείται σε πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο (παράγεται ως «Rotarix®» από την Glaxo-SmithKline, και ονομάζεται επίσης RV1). Ταυτόχρονα, αναπτύχθηκε ένα πεντασθενές ζωντανό εξασθενημένο εμβόλιο, χρησιμοποιώντας το βόειο στέλεχος RV WC3 (G6P7[5]) το οποίο επίσης υποβλήθηκε σε μια πολύ επιτυχημένη κλινική δοκιμή φάσης III [279] και από το 2006 και μετά χορηγήθηκε άδεια σε πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο. Παραμένει ένας πολύ μικρός κίνδυνος για πρόκληση εγκολεασμού οφειλόμενος και στα δύο εμβόλια, περίπου 1: 50.000 ή λιγότερο, ο οποίος όμως υπερβαίνει τα οφέλη των εμβολίων [280–288].

Σε αντίθεση με την υψηλή αποτελεσματικότητα του εμβολιασμού με RV σε αναπτυσσόμενες χώρες, σε μερικές χώρες μεσαίου και χαμηλού εισοδήματος, όπως το Μεξικό, η Νικαράγουα, το Μαλάουι, η Νότια Αφρική, η Κένυα, το Μάλι, το Μπαγκλαντές και το Βιετνάμ, βρέθηκε ότι η αποτελεσματικότητα του εμβολίου (20%) ήταν αισθητά χαμηλότερη [289–291] για λόγους που δεν είναι επί του παρόντος πλήρως κατανοητοί [292]. Ένας παράγοντας μπορεί να είναι έλλειψη Βιταμίνης Α, όπως διερευνήθηκε πειραματικά σε γνωστοβιοτικά χοιρίδια [293–295]. Δεδομένου ότι η θνησιμότητα από οξεία γαστρεντερίτιδα που σχετίζεται με τον RV είναι υψηλότερη στις χώρες χαμηλού εισοδήματος [141], ο WHO συνιστά από το 2009 ο εμβολιασμός για RV να πραγματοποιείται σε όλες τις χώρες, αποδεχόμενοι τη σχετικά χαμηλότερη αποτελεσματικότητα εμβολίων σε χώρες χαμηλού εισοδήματος · WHO, 2013).

Η εύρεση του DNA του κυκλοϊού του χοίρου τύπου 1 και 2 χοίρου που ανιχνεύθηκε στα δύο εγκεκριμένα εμβόλια με μεταγονιδιωματικές τεχνικές, αρχικά προκάλεσε αντιδράσεις, αλλά στη συνέχεια διερευνήθηκε και η χρήση των εμβολίων δεν βρέθηκε επιβλαβής για τους ανθρώπους [296–299].

Αν και το μονοσθενές RV1 εμβόλιο είναι πολύ αποτελεσματικό έναντι των εντεροκυτταρικών G2P[4] RVs, η αναλογία των περιστατικών οξείας γαστρεντερίτιδας που συνδέεται με τον G2P[4] είναι υψηλότερη σε εμβολιασμένα σε σχέση με μη εμβολιασμένα παιδιά που νοσηλεύονται [300]. Άλλες μελέτες δεν βρήκαν σημαντική μεταβολή στον επιπολασμό συγκεκριμένων RV γονότυπων λόγω του εμβολίου [234,301–303]. Για να επιτευχθεί περισσότερη σαφήνεια σχετικά με αυτό το πρόβλημα, συνεχίζεται η επιτήρηση μετά την κυκλοφορία των στελεχών RV και ο προσδιορισμός του επιπολασμού των γονότυπων.

Επειδή και τα δύο εμβόλια RV περιέχουν ζωντανό εξασθενημένο ιό, δεν προκαλεί έκπληξη η εμφάνιση ανασυνδυασμένων στελεχών του εμβολίου (μεταξύ τόσο των στελεχών RV του εμβολίου όσο και στελεχών του εμβολίου και των άγριων στελεχών που αναδύθηκαν κατά τη διάρκεια της ταυτόχρονης κυκλοφορίας τους) [235,304,305]. Ένα άλλο ζωντανό εξασθενημένο εμβόλιο για τον RV, το ανθρώπινο-βόειο φυσικό ανασυνδυασμένο στέλεχος 116E (G9P8[11] που απομονώθηκε αρχικά από ασυμπτωματικά μολυσμένα νεογνά στην Ινδία) εξετάστηκε σε κλινική δοκιμή φάσης III στην Ινδία και καταγράφηκε αποτελεσματικότητα 56% έναντι της εκδήλωσης σοβαρής νόσου [306], η οποία είναι συγκρίσιμη με εκείνη των εμβολίων R1 και R5 σε χώρες με χαμηλό εισόδημα. Λόγω της υψηλής αποτελεσματικότητας των εμβολιακών προγραμμάτων για τον RV, η κυρίαρχη αιτία της νοσηλείας παιδιών με οξεία γαστρεντερίτιδα είναι πλέον οι μολύνσεις από Νοροϊούς [307–310].

Ως εναλλακτικές στα ζωντανά εξασθενημένα εμβόλια, γίνεται έρευνα για τη χρήση απενεργοποιημένων ιικών σωματιδίων [216,311,312], σωματίδια που προσομοιάζουν στον ιό (Virus Like Particles, VLPs) που εκφράζονται σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί με ανασυνδυασμένα στελέχη βακουλοϊών [313–318] και εμβόλια με βάση το DNA [319]. Οι νανοσωληνίσκοι της VP6 του Ροταϊού, σε συνδυασμό με VLP νοροϊού, αποτελούν άλλη μια εναλλακτική νέου εμβολίου [320–323].

#### 1.10. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ

Οι άνθρωποι είναι ευπαθείς σε λοίμωξη με RVA χωρίς ηλικιακό περιορισμό, παρόλο που τα βρέφη και τα μικρά παιδιά ηλικίας 4 μηνών έως 3 ετών είναι πιθανό να αναπτύξουν σοβαρή μορφή κλινικών εκδηλώσεων [324]. Υπάρχουν γεωγραφικές διαφορές στην επιδημιολογία των λοιμώξεων από ροταϊούς. Ωστόσο, από την ηλικία των 5 ετών, τα περισσότερα παιδιά είναι οροθετικά για τον RVA, ανεξάρτητα από τη



γεωγραφική περιοχή στην οποία ζουν. Στις χώρες με εύκρατο κλίμα, οι λοιμώξεις με RVA τείνουν να παρουσιάζουν εποχικά πρότυπα, με τις εξάρσεις κρουσμάτων να είναι πιο εμφανείς κατά τους ψυχρούς μήνες. Σε υποτροπικά και τροπικά περιβάλλοντα, η εποχικότητα είναι λιγότερο εμφανής [324,325].

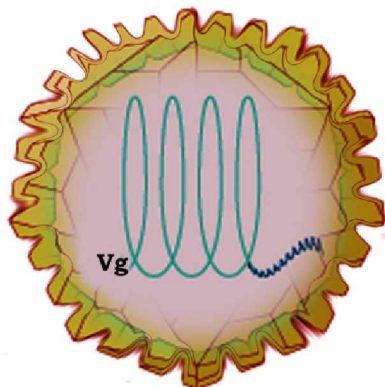
Οι ροταϊοί παρουσιάζουν γενετική και αντιγονική ποικιλομορφία και τα δημοσιευμένα δεδομένα επιτήρησης υποδεικνύουν ότι πολλαπλά στελέχη συνυπάρχουν σε μια περιοχή οποιαδήποτε στιγμή. Συνήθως, στις βιομηχανικές χώρες, ένας μόνο γενότυπος κυριαρχεί σε μια γεωγραφική περιοχή σε μία μόνο εποχή. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, δεν μπορεί να προσδιοριστεί ένα μεμονωμένο επικρατέστερο στέλεχος και οι λοιμώξεις συχνότερα προκαλούνται από πολλαπλούς γονότυπους ροταϊού (δηλ. Μικτές λοιμώξεις) [326].

Οι μελέτες επιτήρησης έχουν αναγνωρίσει 14 τύπους G (G1-G6, G8-G12, G14, G20 και G26) και 17 τύπους P (P [1] έως P [11], P [14], P [15] ], P [24], P [25] και P [28]) και σχεδόν 90 συνδυασμούς αντιγόνων RVA (δηλ. Συνδυασμοί G-P) σε παιδιά παγκοσμίως. Μεταξύ αυτών, ωστόσο, μόνο λίγοι είναι υπεύθυνοι για την πλειοψηφία των λοιμώξεων που εκδηλώνονται κλινικά. Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα πιο κοινά ανθρώπινα στελέχη είναι τα G1P [8] (31 - 53%), G2P [4] (10-13%), G3P [8] (5-11%), G4P [8] (5-14%), G9P [8] (10-11%) και G12P [8] (1-3%). Η ιατρική σημασία των G1P [8], G2P [4], G3P [8] και G4P [8] έγινε εμφανής στα τέλη της δεκαετίας του 1980 [327,328]. Αντίθετα, τα στελέχη G9P [8] και G12P [8] έχουν γίνει κοινά παγκοσμίως μόνο από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 και μετά. Η περαιτέρω ποικιλία των στελεχών προκαλείται, εν μέρει, από την αναδιάταξη μεταξύ των μείζονων στελεχών που κυκλοφορούν τοπικά που μπορούν να οδηγήσουν σε ασυνήθιστους συνδυασμούς των κοινών G και P γονότυπων [199,328]. Για παράδειγμα, τα στελέχη G1P [4] και G2P [8] αναφέρθηκε να συνυπάρχουν συνήθως με στελέχη G1P [8] και G2P [4]. Συγκεκριμένα, η επιδημιολογική υπεροχή των έξι κοινών γενότυπων φαίνεται να μην έχει αλλάξει μετά την εισαγωγή του εμβολίου, αν και μερικά από τα μείζονα στελέχη τείνουν να είναι πιο κοινά από άλλα. Έτσι, τα στελέχη G2P [4] εμφανίστηκαν να κυριαρχούν σε διαδοχικές εποχές σε χώρες όπου το ετεροτυπικό εμβόλιο G1P [8] (Rotarix) χρησιμοποιείται στα εθνικά προγράμματα ανοσοποίησης ρουτίνας [329]. Προς το παρόν, δεν είναι σαφές αν προκλήθηκε μειωμένη ετεροτυπική ανοσία από το μονοσθενές εμβόλιο και συνεπώς για το φαινόμενο αυτό ευθύνεται ο μηχανισμός επιλογής που σχετίζεται με το εμβόλιο ή η παρατεταμένη υπεροχή των στελεχών G2P [4] οφείλεται στις φυσικές διακυμάνσεις των στελεχών του ανθρώπινου ροταϊού στον πληθυσμό [330]. Εκτός από τα έξι κύρια στελέχη RVA, έχουν εντοπιστεί σημαντικά στελέχη σε ορισμένες περιοχές σε τοπικό επίπεδο. Τέτοια στελέχη ανασχημάτισαν παροδικά τον τοπικό επιπολασμό RVA των τεσσάρων ιστορικά πιο κοινών στελεχών και των δύο πρόσφατα αναδυόμενων γενότυπων. Ιστορικά παραδείγματα για τοπικά κοινά στελέχη είναι οι ιοί G5P [8] και G8P [6] σε τμήματα της Νότιας Αμερικής και της Υποσαχάριας Αφρικής, αντίστοιχα [331,332].

Επίσης, μετά την εισαγωγή του εμβολίου, τα στελέχη G6P [6] και G9P [4] προκάλεσαν σημαντικό αριθμό κρουσμάτων, στην Αφρική και τη Λατινική Αμερική, αντίστοιχα [165,333].

Διάφοροι άλλοι συνδυασμοί αντιγόνων που ανιχνεύθηκαν σε ανθρώπους εντοπίστηκαν κυρίως σε σποραδικές, χωρικά απομονωμένες περιπτώσεις. Ορισμένα από αυτά περιγράφηκαν για πρώτη φορά την περίοδο μετά την αδειοδότηση του εμβολίου και δεν μπορεί να αποκλειστεί η προέλευσή τους από το στέλεχος του εμβολίου. Οι γονοτύποι G1P [5], G2P [5] ή G6P [8] μοιράζονται είτε το γονίδιο που κωδικοποιεί την VP7 του G6 είτε την VP4 του P [5] με το στέλεχος βοοειδών στο εμβόλιο Rota-Teq [329]. Άλλα σπάνια στελέχη RVA πιστεύεται ότι έχουν εξελιχθεί από ζώα ξενιστές που λειτουργούν ως δεξαμενές λόγω μετάδοσης των στελεχών μεταξύ διαφορετικών ειδών. Μερικά από αυτά τα σπάνια στελέχη ανιχνεύονται ελαφρά συχνότερα από άλλα RVAs. Τέτοια παραδείγματα είναι το στέλεχος G3P [9] που προσομοιάζει με στελέχη που έχουν ανιχνευθεί σε γάτα και το στέλεχος G4P [6] που μοιάζει με στελέχη που έχουν ανιχνευθεί σε χοίρους και ανιχνεύθηκαν στους ανθρώπους τις τελευταίες δύο δεκαετίες από πολλές χώρες παγκοσμίως [164,166–168,334–341]. Αν και τα στελέχη αυτά ανιχνεύονται σχετικά πιο συχνά σε σχέση με άλλους σπάνιους γονότυπους, οι οδοί μετάδοσης συνήθως δεν περιγράφονται.

## 2. ΝΟΡΟΪΟΙ



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση δομής Νόροϊων

### 2.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Τα μέλη της οικογένειας Caliciviridae έχουν γονιδίωμα RNA θετικής πολικότητας το οποίο είναι πολυαδενυλιωμένο, μια πρωτεΐνη η οποία είναι συνδεδεμένη με το γονιδίωμα (VPg), καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας, χωρίς φάκελο, με διάμετρο 27 έως 40 nm. Το καψίδιο αποτελείται κατά κύριο λόγο από μια δομική πρωτεΐνη, την VP1, η οποία είναι περίπου 60.000 D. Η οικογένεια Caliciviridae αποτελείται από τα γένη Norovirus, Sapovirus, Lagovirus, Nebovirus και Vesivirus, κάθε ένα από τα οποία αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό φυλογενετικό κλάδο. Σε κάθε γένος, ανήκουν ένα ή περισσότερα είδη τα οποία έχουν προσδιοριστεί κυρίως με βάση την γενετική τους συγγένεια.

### 2.2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΒΙΡΙΟΥ

Το βίριο των καλικοϊών παρουσιάζει εικοσαεδρική συμμετρία  $T = 3$ . Το καψίδιο αποτελείται από 90 διμερή της πρωτεΐνης του καψιδίου (VP1) που σχηματίζουν ένα κέλυφος. Από το κέλυφος προεξέχουν 90 καψομερίδια στους διπλούς άξονες που μοιάζουν με τόξα. [342,343] Αυτά τα τόξα είναι διατεταγμένα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παρατηρούνται 32 μεγάλες κοιλότητες οι οποίες δημιουργούν την εικόνα δομών που μοιάζουν με «κύπελλα» στην επιφάνεια των ιικών σωματιδίων (το calici προέρχεται από τη λατινική λέξη calyx ή "κύπελλο"). Η παρατήρηση στο κρυοηλεκτρονικό μικροσκόπιο και οι μελέτες στις οποίες έγινε επεξεργασία της εικόνας αντιπροσωπευτικών καλικοϊών μέσω υπολογιστή, έδειξαν ότι υπάρχουν μικρές διαφορές στη δομή του καψιδίου μεταξύ των καλικοϊών. Οι διαφορές αυτές παρατηρήθηκαν επίσης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με τη χρήση αρνητικής βαφής.

Η ατομική δομή του rVLP του ιού Norwalk έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.[343]. Έτσι αναγνωρίστηκαν δύο κύριοι τομείς στην πρωτεΐνη VP1, το κέλυφος (shell, S) και ο προεξέχον βραχίονας (protruding, P). Ο τομέας S σχηματίζει το εσωτερικό τμήμα του καψιδίου που περιβάλλει το γονιδίωμα RNA και διατηρεί τις εικοσαεδρικές επαφές της δομής  $T = 3$ . Ο τομέας P σχηματίζει τις προεξοχές τύπου τόξου που προέρχονται από το κέλυφος και περιέχουν τις διμερείς επαφές.[343]. Ο NH<sub>2</sub>-τερματικός (N) βραχίονας, ο οποίος βρίσκεται εντός του τομέα S, αποτελείται από τα υπολείμματα αμινοξέων 1 έως 49. Το τμήμα του τομέα S αποτελείται από τα αμινοξέα (aa) 50 έως 225. Ολόκληρος ο τομέας S (aa 1 έως 225) αντιστοιχεί στη N-τερματική περιοχή της πρωτεΐνης του καψιδίου που είναι σχετικά συντηρημένη μεταξύ των νοροϊών. Ο τομέας P, ο οποίος συνδέεται με τον τομέα S (aa 219 έως 225), αντιστοιχεί στο C-τελικό ήμισυ της VP1, το οποίο παρουσιάζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων. Ο τομέας P διαιρείται στον υποτομέα P1, που περιλαμβάνει τα aa 226 έως 278 και 406 έως 520 και τον υποτομέα P2, που περιλαμβάνει τα aa 279 έως 405. Οι υποτομείς P1 σχηματίζουν τις πλευρές του τόξου των καψομεριδίων και τοποθετούν τον μεταβλητό υποτομέα P2 στην κορυφή του τόξου. Στη διμερή μορφή της πρωτεΐνης του καψιδίου, οι δύο υποτομείς P2 σχηματίζουν μια δίλοβη δομή στην επιφάνεια του βιρίου. Η έκθεση της μεταβλητής περιοχής P2 στην επιφάνεια εξυπηρετεί τον σχηματισμό μίας κύριας αντιγονικής θέσης και τη δέσμευση στον υποδοχέα [342–347]. Έχει προταθεί ότι η εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή του τομέα S μπορεί να λειτουργήσει ως εικοσαεδρικό ικρίωμα με το N-τερματικό βραχίονα παρέχοντας μία μετατόπιση ώστε να διευκολυνθεί η δημιουργία της κατάλληλης καμπυλότητας. Επίσης, η περιοχή του τομέα P μπορεί να αποτελεί μια αντικαταστάσιμη ενότητα με αποτέλεσμα να προκύπτουν διαφορές ως προς το στέλεχος και την ειδικότητα ως προς τα αντιγόνα [342,343].

Η γνώση της δομής του καψιδίου συνέβαλε στη μελέτη της συναρμολόγησής του και διευκόλυνε την έκφραση υποϊκικών μορφών του καψιδίου οι οποίες έχουν αποδειχθεί χρήσιμες σε αρκετές περιοχές έρευνας [348]. Το ακραίο N-τερματικό άκρο της VP1 του NV (τα πρώτα 20 aa) δεν φαίνεται να είναι απαραίτητο για τη συναρμολόγηση των VLP με φυσικό μέγεθος 38 nm και συμμετρία  $T = 3$ . Η έκφραση μόνο της περιοχής S της VP1 (ξεκινώντας με το ακραίο N-τερματικό άκρο της VP1 και περιλαμβάνοντας τα υπολείμματα αμινοξέων 1 έως 227) είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό λείων σωματιδίων (που ορίζονται ως σωματίδια "S") διαμέτρου περίπου 30 nm.<sup>36</sup> Αν και η αρχική έκφραση μόνο της περιοχής P δεν παρήγαγε VLPs σε βακτηριακά συστήματα ή συστήματα βακτουλοϊών, [349,350] η φυσική περιοχή του τομέα P σχημάτισε διμερή P τα οποία αναγνωρίστηκαν από αντισώματα και υδατάνθρακες κατά τον ίδιο τρόπο με τα άθικτα VLPs.[350] Περαιτέρω γενετική μηχανική είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρών, υποϊκικών σωματιδίων, τα P σωματίδια, τα οποία αποτελούνταν από 12 διμερή του τομέα P και είχαν συμμετρία

T = 1 [348]. Πρόσφατα, η έκφραση της περιοχής P με ένα περαιτέρω τροποποιημένο άκρο επέτρεψε την παραγωγή μικρών σωματιδίων P [351].

### 2.3. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Οι καλυκοϊοί έχουν γραμμικό, μονόκλωνο γονιδίωμα RNA θετικής πολικότητας το μέγεθος του οποίου κυμαίνεται από περίπου 7,3 έως 8,5 kb. Το γονιδίωμα ξεκινά χαρακτηριστικά με μια τερματική αλληλουχία pGrU στο 5' άκρο που είναι συνδεδεμένη με μια μικρή πρωτεΐνη, την VPg. Οι μη δομικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται αρχίζοντας από το 5' άκρο του γονιδιώματος, και οι δομικές πρωτεΐνες (VP1 και VP2) κωδικοποιούνται προς το 3' άκρο του γονιδιώματος. Τα γονιδιώματα των καλυκοϊών οργανώνονται σε δύο ή περισσότερα σημαντικά ORFs, ανάλογα με το γένος. Οι νοροϊοί κωδικοποιούν τη δομική πρωτεΐνη VP1 σε ένα ξεχωριστό ORF (ORF2). Όλοι οι καλυκοϊοί έχουν ένα σχετικά μικρό ORF κοντά στο άκρο 3' που κωδικοποιεί τη δομική πρωτεΐνη VP2 η οποία έχει μεταβλητό μέγεθος (12.000 έως 29.000 D) και αλληλουχία μεταξύ των καλυκοϊών. 65,418 Τα γενωμικά γονίδια των νοροϊών που έχουν αναλυθεί μέχρι στιγμής περιέχουν ένα μοναδικό συντηρημένο ORF (ORF4) με μια κωδικοποιημένη πρωτεΐνη 23.800 D (ονομαζόμενη VF-1) η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση της έμφυτης ανοσοαπόκρισης του ξενιστή in vivo [352].

### 2.4. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

#### 2.4.1. ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Στα ώριμα βίρια των καλυκοϊών συναντώνται τρεις πρωτεΐνες, οι VP1, VP2 και VPg. Η VP1 (~ 60.000 D), η οποία είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη του ιού, είναι παρούσα σε 180 αντίγραφα (90 διμερή) ανά βίριο [353]. Η κυριαρχία της VP1 στο σχηματισμό της δομής του ιικού καψιδίου είναι σε συμφωνία με τον κρίσιμο ρόλο της για τον προσδιορισμό του αντιγονικού φαινότυπου του ιού και των αλληλεπιδράσεών της με τα κύτταρα ξενιστές.

Η VP2 (12.000 έως 29.000 D) θεωρείται δευτερεύουσα δομική πρωτεΐνη επειδή υπάρχει σε ένα έως δύο αντίγραφα ανά βίριο και η λειτουργία της είναι άγνωστη [354,355]. Ωστόσο, έχει αναφερθεί η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών VP1 και VP2 του καψιδίου [354] υποδηλώνοντας ότι παίζει κάποιο ρόλο στην ωρίμανση ή τη σταθερότητα των ιικών σωματιδίων.

Η VPg είναι συνδεδεμένη με το γονιδιωματικό και υπογονιδιωματικό RNA σε μολυσμένα κύτταρα [356]. Πρόκειται για ένα δευτερεύον συστατικό που βρίσκεται

σε ένα ή δύο αντίγραφα ανά βίριο [355]. Αν και η VPg είναι παρούσα στα βίρια, φαίνεται να λειτουργεί κυρίως ως μη δομική πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής.

#### 2.4.2. ΜΗ ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι ώριμες μη δομικές πρωτεΐνες (NS1 έως NS7) των καλυκοϊών προέρχονται από πρωτεολυτική διάσπαση μίας μεγάλης πολυπρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το ORF1. Το μήκος του μη διασπασμένου πολυπρωτεϊνικού πρόδρομου μορίου είναι περίπου 200.000 D. Αυτό το μεγάλο πρόδρομο μόριο δεν έχει παρατηρηθεί ποτέ, πιθανότατα επειδή η πρωτεολυτική επεξεργασία είναι ταχεία και γίνεται παράλληλα με τη μετάφραση [357–359]. Η πρωτεολυτική διάσπαση διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνάση κυστεΐνης που κωδικοποιείται από τον ιό (NS6Pro) [360]. Η θέση διάσπασης στην πολυπρωτεΐνη του ORF1, που προσδιορίζει τα όρια των τελικών προϊόντων διάσπασης των μη δομικών πρωτεϊνών, έχει προσδιοριστεί για στελέχη καλυκοϊών που αντιπροσωπεύουν τα γένη *Norovirus*, [357,358,361,362] *Vesivirus*, [363] *Lagovirus*, [364] και *Sarovirus* [365]. Για την πολυπρωτεΐνη του ORF1 των νοροϊών έχουν χαρτογραφηθεί μέχρι στιγμής πέντε θέσεις διάσπασης από τις οποίες προκύπτουν έξι ώριμα προϊόντα. Στον πίνακα φαίνονται οι λειτουργίες των μη δομικών πρωτεϊνών των Νοροϊών όπως έχουν αναγνωριστεί μέχρι στιγμής.

#### 2.5. ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ

##### 2.5.1. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ

Οι νοροϊοί προσδένονται και εισέρχονται στο κύτταρο, το γονιδίωμα RNA απελευθερώνεται και λαμβάνει χώρα η μετάφραση του γονιδιώματος μέσω των μηχανισμών μετάφρασης των κυττάρων ξενιστών. Οι πρωτεΐνες του ιού που μεταφράζονται σε πρώιμο στάδιο αλληλεπιδρούν με το κύτταρο ξενιστή για τη δημιουργία θέσεων αντιγραφής του ιού (που περιλαμβάνουν αναδιοργανωμένες ενδοκυτταρικές μεμβράνες), ενώ άλλες πρωτεΐνες λειτουργούν ως ένζυμα αντιγραφής. Τα RNA θετικής πολικότητας που συντίθενται είναι συνδεδεμένα με την VPg και συσκευάζονται σε ιικά σωματίδια που απελευθερώνονται μετά από λύση των κυττάρων. Ο κύκλος αντιγραφής είναι ταχύς καθώς νέοι ιικοί απόγονοι ανιχνεύονται μέσα σε λίγες ώρες μετά τη μόλυνση.

### 2.5.2. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ

Μέσω δομικών μελετών έχει διαπιστωθεί ότι η VP1 των νοροϊών αλληλεπιδρά με υδατάνθρακες των αντιγόνων HBG (histo-blood group antigens, HBGAs)[366,367]. Σχεδόν όλα τα VLP του νοροϊού δεσμεύονται σε έναν ή περισσότερους υδατάνθρακες των HBGA. Υπάρχουν δομικές μελέτες οι οποίες έχουν προσδιορίσει τις αλληλεπιδράσεις με ορισμένους σακχαρίτες των HBGA σε επίπεδο αμινοξέων [366]. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ευαισθησίας στη λοίμωξη από τον ιό Norwalk σε ενήλικους εθελοντές και την κατάσταση έκκρισης των HBGA που συνδέεται με το γονίδιο FUT2 [368]. Ωστόσο, τα πειράματα για να εξακριβωθεί ότι τα HBGAs μπορούν να χρησιμεύσουν ως λειτουργικός υποδοχέας για τους νοροϊούς ήταν ανεπιτυχή, εν μέρει λόγω του ότι δεν υπάρχει διαθέσιμο σύστημα κυτταροκαλλιέργειας που να επιτρέπει την απομόνωση των νοροϊών. Αν και η έκφραση του ανθρώπινου γονιδιακού προϊόντος FUT2 σε μη επιτρεπτικά κύτταρα ενίσχυσε τη δέσμευση των VLPs του ιού Norwalk σε κύτταρα in vitro, δεν επέτρεψε την είσοδο του ιού στα κύτταρα. [369].

### 2.5.3. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ

Οι απαιτήσεις των καλυκοϊών για την είσοδό τους στα κύτταρα ξενιστές και την επακόλουθη μόλυνση παρουσιάζουν διαφορές. Για παράδειγμα η μολυσματικότητα του νοροϊού του ποντικού (στέλεχος MNV-1) δεν εξαρτάται από το όξινο περιβάλλον των ενδοσωμάτων. Έχει προταθεί ότι η είσοδος του MNV-1 γίνεται μέσω μιας ενδοκυτταρικής οδού που πιθανώς περιλαμβάνει λιπίδια ευαίσθητα στη χοληστερόλη και δυναμίνη II (τουλάχιστον σε κύτταρα RAW264.7) [370–372].

### 2.5.4. ΑΠΕΚΔΥΣΗ

Η διαδικασία που οδηγεί στην απέκδυση του ιικού σωματιδίου και επιτρέπει στο γονιδίωμα RNA να γίνει προσιτό από το μηχανισμό μετάφρασης δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Η απέκδυση είναι μια ταχεία διαδικασία. Για παράδειγμα, το γένωμα του MNV απελευθερώθηκε 1 ώρα μετά τη μόλυνση [371]. Η ανάλυση των VLPs του ιού Norwalk με φασματομετρία μάζας έδειξε ότι είναι σταθερά υπό όξινες συνθήκες. Έτσι, προτάθηκε ένα μοντέλο αποσυναρμολόγησης στο οποίο σωματίδια με συμμετρία T = 3 (που περιέχουν 180 αντίγραφα της VP1) αποσυνδέονται σε διμερή υπό αλκαλικές συνθήκες.[373]

### 2.5.5. ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Το γονιδιωματικό RNA που βρίσκεται στα βίρια απαιτεί την παρουσία της πρωτεΐνης VPg για την εγκατάσταση μόλυνσης στα κύτταρα [374]. Η εκκίνηση της μετάφρασης του εισερχόμενου γονιδιώματος θετικής πολικότητας πιθανώς διαμεσολαβείται από αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης VPg με τον κυτταρικό μηχανισμό μετάφρασης [375–377]. Από την άλλη μεριά, η αντιγραφή του γονιδιώματος σχετίζεται με την αναστολή της μετάφρασης στα κύτταρα ξενιστές. Στο σημείο αυτό, ο ρόλος της ιικής πρωτεΐνης (NS6Pro) είναι σημαντικός καθώς έχει αποδειχθεί ότι διασπά ορισμένες κυτταρικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μετάφραση, γεγονός το οποίο δίνει, εν μέρει, ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στο ιικό RNA [378]. Αρχικά μεταφράζεται το ORF1 με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας μεγάλης πολυπρωτεΐνης, από την οποία προκύπτουν στη συνέχεια πρόδρομες ουσίες και προϊόντα λόγω της διάσπασης που προκαλεί η NS6Pro σε αρκετές θέσεις [363]. Ορισμένες από τις μη δομικές πρωτεΐνες και οι πρόδρομοί τους που προκύπτουν, ρυθμίζουν τις θέσεις αντιγραφής εντός του κυττάρου ξενιστή [379,380], ενώ άλλες (όπως η RdRp και η NS7Pol) παίζουν ρόλο στην αντιγραφή του ιικού RNA. Η παρουσία άφθονου υπογονιδιωματικού RNA θετικής πολικότητας συνδεδεμένου με τη VPg λειτουργεί ως μήνυμα για τη μετάφραση των δομικών πρωτεϊνών VP1 και VP2 [381,382].

### 2.5.6. ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ ΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Όπως όλοι οι ιοί RNA θετικής πολικότητας, η αντιγραφή του RNA σχετίζεται με μεμβράνες του κυττάρου ξενιστή [383]. Έτσι παρατηρείται αισθητή αναδιάταξη των ενδοκυτταρικών μεμβρανών και υπάρχουν ενδείξεις για την έναρξη της αντιγραφής του RNA σε μια περιπυρηνική τοποθεσία που περιέχει μεμβράνες που συνδέονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο, το δίκτυο trans-Golgi, και δείκτες της ενδοσωματικής μεμβράνης [361,362]. Η έναρξη της σύνθεσης ενός κλώνου RNA αρνητικής πολικότητας από το γονιδιωματικό εκμαγείο RNA αρχίζει στο 3' άκρο του γονιδιωματικού RNA θετικής πολικότητας και πιθανώς περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με κυτταρικές πρωτεΐνες [384]. Το RNA αρνητικής πολικότητας, με τη σειρά του, χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη μεταγραφή δύο κύριων RNA θετικής πολικότητας που αντιστοιχούν στο γονιδιωματικό RNA πλήρους μήκους και το τερματικό 1/3 του γονιδιώματος προς το άκρο 3' που αντιστοιχεί στο υπογονιδιωματικό RNA [382].



### 2.5.7. ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ

Έχει προταθεί ότι η διαδικασία την ωρίμανσης των σωματιδίων των καλυκοϊών περιλαμβάνει δύο στάδια [385]. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται ταχεία συσσωμάτωση και συναρμολόγηση των πρόδρομων πρωτεϊνών του καψιδίου σε υπομονάδες 5S, οι οποίες στη συνέχεια περνούν μέσω διαφόρων ενδιάμεσων μορφών και προκύπτουν οι σταθερές υπομονάδες 15S.

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τη σύνδεση των υπομονάδων 15S με τα νεοσυντεθέντα γονιδιώματα RNA για να σχηματίσουν μολυσματικά σωματίδια. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών έχουν ανιχνευθεί για τη VPg και τον προδρόμο του καψιδίου καθώς και μεταξύ της RdRp NS7Poi και του προδρόμου καψιδίου, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να σχετίζονται με τη συσκευασία του πρόσφατα συντιθέμενου RNA στο ιικό καψίδιο [386]. Επιπροσθέτως, η επιτυχής συναρμολόγηση των μολυσματικών ικών σωματιδίων έχει συνδεθεί με την αποτελεσματική έκφραση της πρωτεΐνης του καψιδίου του ιού, τη VP2 [387].

Τα συνδεδεμένα με VPg γονιδιωματικά και τα υπογονιδιωματικά RNA θετικής πολικότητας ανευρίσκονται σε σωματίδια με διαφορετική πυκνότητα, υποδεικνύοντας ότι δεν συσκευάζονται μαζί στο ίδιο βίριο.[388,389] Η ενσωμάτωση υπογονιδιωματικού RNA σε σωματίδια χαμηλής πυκνότητας (lower-density, LD) υποδηλώνει ότι εντός των 2.400 νουκλεοτιδίων του 3' τερματικού του γονιδιώματος εντοπίζεται ένα σήμα που αφορά στη συσκευασία.

### 2.5.8. ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ

Τα μολυσμένα κύτταρα υφίστανται λύση και θεωρείται ότι η πλειοψηφία των ικών απογόνων απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Η ενεργοποίηση της απόπτωσης έχει συσχετιστεί με μόλυνση από καλυκοϊό τόσο *in vitro* [390] όσο και *in vivo* [391–394]. Οι αποπτωτικές μεταβολές στις κυτταρικές μεμβράνες μπορεί να είναι ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους τα κύτταρα λύονται και απελευθερώνονται τα ιικά σωματίδια.

## 2.6. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Οι μελέτες που έχουν γίνει σε ενήλικες εθελοντές βοήθησαν στον προσδιορισμό σημαντικών χαρακτηριστικών της γαστρεντερίτιδας που προκαλείται από τους νοροϊούς, της παθογένειας και της ανοσολογίας της [395]. Προς τον παρόν, δεν υπάρχει κάποιο ζωικό μοντέλο που να αναπαράγει άμεσα όλο το εύρος των κλινικών συμπτωμάτων που παρατηρούνται στον άνθρωπο. Ωστόσο, κάποια από τα ζωικά

είδη στα οποία υπάρχει ένδειξη για μόλυνση από νοροϊούς του ανθρώπου μετά από πειραματική μόλυνση, είναι τα γνωτοβιοτικά χοιρίδια [391], οι μόσχοι [396], οι πίθηκοι [397] και οι χιμπατζήδες [398].

Νοροϊοί έχουν ανιχνευθεί σε κόπρανα ποντικών (π.χ. στέλεχος MNV-1), [399] χοίρων (στέλεχος SW418), [400] βοοειδών (στέλεχος ιού Jena), και σκύλων (στέλεχος 170/07). Ο νοροϊός των βοοειδών (στέλεχος Jena) αναφέρθηκε ότι προκαλεί διάρροια και σοβαρή ελάττωση των εντερικών λαχνών του λεπτού εντέρου σε νεογέννητους μόσχους παρόμοια με εκείνη που παρατηρείται στη μόλυνση από ανθρώπινο νοροϊό. Επίσης, παρατηρήθηκαν κύτταρα θετικά στην παρουσία αντιγόνων του ιού στα επιθηλιακά κύτταρα των λαχνών και στη μεμβράνη του βλεννογόνου [401].

#### 2.6.1. ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ

Οι νοροϊοί εισέρχονται στο σώμα κυρίως μέσω της στοματικής οδού. Τα βίρια είναι σταθερά στα οξέα, με αποτέλεσμα να έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν από τη διέλευση από τον στόμαχο. Υπάρχουν έμμεσες ενδείξεις από επιδημιολογικές μελέτες ότι η είσοδος των ιών μπορεί να γίνει και μέσω αερολυμάτων, όπως εκείνων που παράγονται από τον "εκρηκτικό-ρουκετοειδή" έμετο που συμβαίνει συχνά κατά τη διάρκεια της νόσου [402]. Η περίοδος επώασης είναι σύντομη και κυμαίνεται από 10 έως 51 ώρες, με μέσο όρο τις 24 ώρες [403–407]. Η οξεία νόσος συνήθως διαρκεί περίπου 24 έως 48 ώρες. Η περίοδος επώασης που καταγράφηκε σε 22 φυσικά εμφανιζόμενες εξάρσεις κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας από νοροϊούς ήταν μεταξύ 24 και 48 ωρών σε 20 από αυτές με εύρος από 4 έως 77 ώρες [408].

Μελέτες κατέδειξαν ότι όταν οι ιοί Norwalk, Hawaii, Montgomery County και Snow Mountain χορηγήθηκαν σε εθελοντές μέσω της στοματικής οδού, προκάλεσαν γαστρεντερίτιδα [404–407,409]. Η μετάδοση μέσω της αναπνευστικής οδού έχει προταθεί αλλά δεν έχει τεκμηριωθεί ακόμα [402]. Ο ιός ανιχνεύθηκε σε έμετο που λήφθηκε από μολυσμένους εθελοντές [410] και σε ορισμένες περιπτώσεις θεωρήθηκε ως πηγή μετάδοσής του. Η μετάδοση του ιού μέσω της στοματικής οδού έχει επίσης προταθεί καθώς το RNA του νοροϊού ανιχνεύθηκε σε εκπλύματα από το στόμα ατόμων που ήταν μολυσμένα με νοροϊό (σε μία περίπτωση, μέχρι και δύο εβδομάδες μετά το πέρας της νόσου) και σε 10/17 ασθενείς (59%) που νοσηλεύτηκαν με γαστρεντερίτιδα από νοροϊό οι οποίοι έκαναν έμετο εντός 24 ωρών πριν από τη συλλογή του δείγματος [411]. Τα ρινοφαρυγγικά εκπλύματα από έναν εθελοντή με πειραματικά προκληθείσα γαστρεντερίτιδα από τον ιό Norwalk δεν προκάλεσαν νόσο σε τρεις εθελοντές [404].

### 2.6.2. ΘΕΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ

Η θέση πρωτογενούς αντιγραφής των νοροϊών δεν έχει τεκμηριωθεί ακόμα, αλλά θεωρείται ότι βρίσκεται στην ανώτερη εντερική οδό. Μετά από βιοψία της νήσιδας εθελοντών που ανέπτυξαν νόσο του γαστρεντερικού συστήματος ύστερα από χορήγηση του ιού Norwalk ή του ιού της Χαβάης από το στόμα, αναδείχθηκε η παρουσία ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων [412]. Αν και ο βλεννογόνος παρέμενε ιστολογικά ανέπαφος, παρατηρήθηκε διεύρυνση και μείωση των λαχνών του λεπτού εντέρου. Παρατηρήθηκε επίσης διήθηση από μονοπύρρηνα κύτταρα και κενотоπία στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Ωστόσο, οι βιοψίες που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της ανάρρωσης από τη νόσο φαίνεται να είναι φυσιολογικές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η χαρακτηριστική βλάβη της νήσιδας παρατηρήθηκε επίσης σε εθελοντές που μολύνθηκαν από τον ιό NV ή Hawaii αλλά δεν ανέπτυξαν νόσο [412].

### 2.6.3. ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΣΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ

Η κύρια περιοχή αντιγραφής των νοροϊών είναι πιθανώς η ανώτερη εντερική οδός (δωδεκαδάκτυλο και άνω νήσιδα), αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να υπάρξει εξω-εντερική εξάπλωση του ιού. Το ιικό RNA ανιχνεύθηκε στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ενός ασθενή ηλικίας 23 μηνών με εγκεφαλοπάθεια [413]. Σε μια ανάλυση που συμπεριλήφθηκαν 39 ασθενείς με οξεία γαστρεντερίτιδα από νοροϊούς (επιβεβαιωμένη μετά από ανίχνευση ιικού RNA στα κόπρανα), ανιχνεύθηκε RNA νοροϊού στον ορό των 6 (15%) ασθενών με real time PCR [414]. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι νοροϊοί του ανθρώπου έχουν οδηγήσει σε μόλυνση του εντέρου σε γνωστοβιοτικά χοιρίδια [391] και χιμπατζήδες [398] μετά από ενδοφλέβια χορήγηση.

### 2.7. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

Η ανοσολογική απόκριση έναντι των νοροϊών στους ανθρώπους δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα. Είναι γεγονός ότι οι ενήλικες επιδεικνύουν σταθερά υψηλό βαθμό ευπάθειας τόσο στη φυσική όσο και στην πειραματικά επαγόμενη νόσο. Σε ορισμένες εξάρσεις κρουσμάτων, το ποσοστό των ενηλίκων που νόσησε ήταν μεγαλύτερο από 80% [408] ενώ περίπου το 50% ενηλίκων εθελοντών ανέπτυξαν σταθερά νόσο μετά από μόλυνση με τον ιό NV [404,406,407]. Η ανθεκτικότητα στη νόσο, που προκύπτει μετά από μόλυνση με νοροϊούς, πιθανώς περιλαμβάνει μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της γενετικής και της ανοσολογικής ευαισθησίας του ξενιστή και της έκθεσης σε εξελισσόμενα στελέχη του ιού.

### 2.7.1. ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η πλειονότητα των πληροφοριών που υπάρχουν σχετικά με την ανοσολογική απόκριση έναντι των νοροϊών προέρχεται από μελέτες που έχουν γίνει σε εθελοντές λόγω της αδυναμίας υπολογισμού του τίτλου των εξουδετερωτικών αντισωμάτων του ορού και του εντέρου σε καλλιέργειες κυττάρων. Έτσι, παρά το γεγονός ότι σε αυτές τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν υψηλές δόσεις του ιού για την πρόκληση μόλυνσης, διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν δύο μορφές ανοσολογικής απόκρισης έναντι των νοροϊών, η βραχυπρόθεσμη και η μακροπρόθεσμη [404,407,415]. Η βραχυπρόθεσμη ανοσολογική απόκριση είναι ειδική ως προς τον ιό (πιθανώς και ως προς τον ορότυπο). Έτσι οι εθελοντές που νόσησαν μετά από πρόκληση μόλυνσης με νοροϊό παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην επαναπρόκληση της νόσου από τον ίδιο ιό 6 έως 14 εβδομάδες αργότερα. Ωστόσο, όταν η επαναπρόκληση της μόλυνσης επιχειρήθηκε με χρήση του ετερότυπου ιού Hawaii, οι εθελοντές ανέπτυξαν νόσο. Ομοίως, οι εθελοντές που νόσησαν πρόσφατα μετά από μόλυνση με τον ιό Hawaii, ήταν ευπαθείς στη μόλυνση με NV και ανέπτυξαν νόσο [407].

Η μακροχρόνια ανοσολογική απόκριση αποκλίνει από το παραδοσιακό πρότυπο. Σε μια μελέτη στην οποία προκλήθηκε μόλυνση σε 12 εθελοντές σε δύο περιπτώσεις, σε απόσταση 27 έως 42 μηνών, παρατηρήθηκαν δύο διαφορετικά πρότυπα αντίστασης στη διαδοχική πρόκληση [415]. Από αυτούς, έξι άτομα ανέπτυξαν νόσο τόσο μετά από την αρχική πρόκληση όσο και μετά την επαναπρόκληση. Αντίθετα, τα άλλα έξι άτομα δεν νόσησαν μετά από την αρχική πρόκληση και ήταν επίσης ανθεκτικά μετά την επαναπρόκληση 31 έως 34 μήνες αργότερα. Ωστόσο, οι ορολογικές μελέτες κατά τις οποίες μετρήθηκαν αντισώματα έναντι του νοροϊού πριν την πρόκληση της μόλυνσης δεν οδήγησαν σε αποτελέσματα που να εξηγούν τη διαφορά στην ευπάθεια των εθελοντών [415].

Παραδόξως, οι εθελοντές που δεν νόσησαν είχαν χαμηλό τίτλο αντισωμάτων, όταν υπήρχαν μετρήσιμα αντισώματα, σε δείγμα ορού πριν την πρόκληση μόλυνσης. Επίσης, δεν ανέπτυξαν σημαντική ανοσολογική απόκριση μετά από κάθε πρόκληση. Ωστόσο, οι εθελοντές που νόσησαν μετά από κάθε πρόκληση μόλυνσης και για τους οποίους έγινε εκτίμηση της ανοσολογικής τους απόκρισης, ανέπτυξαν αντισώματα μετά από κάθε πρόκληση. Σε πιο πρόσφατες μελέτες εθελοντών παρατηρήθηκε επίσης ότι τα αντισώματα του ορού έναντι του νοροϊού δεν σχετίζονται με την αντοχή στη νόσο [416,417]. Σε μελέτες εθελοντών αλλά και κατά τη διάρκεια φυσικών εξάρσεων κρουσμάτων βρέθηκε ότι τα επίπεδα αντισωμάτων που αναπτύσσονται τοπικά στη νήστιδα επίσης δεν σχετίζονται με την αντοχή στη νόσο. Ωστόσο, η ανοσία που αποκτάται μετά από φυσική μόλυνση ίσως να παίζει κάποιο ρόλο στην προστασία σε επίπεδο βλεννογόνου. Μια πρόσφατη μελέτη εθελοντών

έδειξε ότι η ανάπτυξη ταχείας απόκρισης IgA στον βλεννογόνο (που υποδεικνύει προηγούμενη έκθεση σε NV ή σε σχετικό νοροϊό) συσχετίστηκε με αντοχή στη νόσο μετά από πρόκληση μόλυνσης με τον ιό NV [368]. Επιπλέον, η παρουσία αντισωμάτων αποδείχθηκε κρίσιμη για την κάθαρση του MNV στα ποντίκια.

Η ανακάλυψη ότι ο NV και άλλοι ανθρώπινοι νοροϊοί αναγνωρίζουν τα HBGAs οδήγησε στην ανάπτυξη δοκιμών που μετρούν τη δραστικότητα δέσμευσης των αντισωμάτων του ορού στους υδατάνθρακες των HBGA [418]. Η παρουσία αντισωμάτων που παρεμπόδισαν τη δέσμευση των VLPs του ιού Norwalk σε γλυκάνες H τύπου 1 ή H τύπου 3 κατά την πρόκληση μόλυνσης με τον ιό Norwalk φαίνεται να συσχετίζεται με προστασία έναντι της νόσου σε ενήλικες εθελοντές. Έτσι προτάθηκε ότι οι δοκιμές αποκλεισμού των HBGA θα ήταν χρήσιμες ως υποκατάστατα των παραδοσιακών δοκιμών εξουδετέρωσης δεδομένης της απουσίας κυτταροκαλλιεργειών που να μπορούν να απομονωθούν οι νοροϊοί [419]. Η εφαρμογή αυτής της τεχνικής στην πρώτη μελέτη αποτελεσματικότητας των εμβολίων έναντι του νοροϊού σε ενήλικες εθελοντές έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου των τίτλων δέσμευσης των HBGA πριν την πρόκληση και την προστασία από τη νόσο [420]. Η δοκιμή αναστολής αιμοσυγκόλλησης για τη μέτρηση αντισωμάτων στον ορό, φάνηκε επίσης να συσχετίζεται με προστασία από τη νόσο σε εθελοντές μετά από πρόκληση μόλυνσης με τον ιό Norwalk [421].

### 2.7.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η κυτταρική ανοσία μελετήθηκε σε εθελοντές μετά από ανοσοποίηση με rVLPs του ιού Norwalk από το στόμα [422]. Τα VLPs προκάλεσαν κυτταρική ανοσοαπόκριση. Υπήρξε αύξηση της ιντερφερόνης  $\gamma$  (IFN), απουσία παραγωγής IL-4, υποδηλώνοντας ένα κυρίαρχο μοτίβο Th-1 για την παραγωγή κυτοκίνης. Σε μελέτη με 15 εθελοντές που μολύνθηκαν με τον ιό Snow Mountain, την ημέρα 2 μετά την πρόκληση, ανιχνεύθηκε σημαντική αύξηση IFN  $\gamma$  και IL-2 στον ορό, αλλά όχι IL-6 ή IL-10, δείχνοντας και πάλι κυρίαρχη Th-1 απόκριση [423].

### 2.7.3. ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η έμφυτη ανοσία βρέθηκε ότι είναι σημαντική για τον έλεγχο του νοροϊού του ποντικού (στέλεχος MNV-1) σε ποντίκια. Ορισμένα ποντίκια που ήταν ανθεκτικά σε συστατικά της έμφυτης ανοσίας (όπως STAT1 ή υποδοχείς για ιντερφερόνη) ανέπτυξαν θανατηφόρα νόσο όταν προκλήθηκε μόλυνση με MNV-1 [399]. Έχει αναφερθεί ότι ο MDA-5, ένας ενδοκυτταρικός αισθητήρας της διπλής έλικας RNA, μπορεί να εμπλέκεται στην αναγνώριση και τον έλεγχο του MNV [424]. Οι καλικοϊοί

έχει αποδειχθεί ότι είναι ευαίσθητοι σε διάφορους τύπους ιντερφερόνης in vitro [425].

## 2.8. ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ

Οι νοροϊοί απεκκρίνονται μέσω της εντερικής οδού του ξενιστή στα κόπρανα και έχουν επίσης ανιχνευθεί σε έμετο [410]. Το ιικό RNA μπορεί να ανιχνευθεί στα κόπρανα πριν από την εμφάνιση των συμπτωμάτων και η αποβολή μέσω των κοπράνων μπορεί να διαρκέσει αρκετές ημέρες έως εβδομάδες σε ανοσολογικά ικανά άτομα [403,416] και ακόμη μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς [392]. Σε μια μελέτη που συμπεριλήφθηκαν 13 ηλικιωμένοι ασθενείς (ηλικίας 60 έως 98 ετών), η μέση διάρκεια της απέκκρισης νοροϊών ήταν 14,3 ημέρες, ενώ ορισμένα άτομα απέκριναν τον ιό έως και 32 ημέρες. Σε παιδιατρικούς ασθενείς (ηλικίας 3 μηνών έως 7 ετών), ο μέσος όρος της απέκκρισης ήταν 16 ημέρες, με τρεις ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 6 μηνών να απεκκρίνουν τον ιό για περισσότερο από 40 ημέρες [426]. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι τα μολυσμένα άτομα που αναρρώνουν από τη νόσο που προκαλείται από τους νοροϊούς μπορούν να συνεχίσουν να απεκκρίνουν τον ιό και πέρα από τη συμπτωματική περίοδο, γεγονός που έχει επιπτώσεις στη διαχείριση των κρουσμάτων [427]. Το RNA του νοροϊού έχει ανιχνευθεί σε εκπλύματα από το στόμα ατόμων που εμφάνισαν λοίμωξη από νοροϊό για αρκετές ημέρες μετά την υποχώρηση των συμπτωμάτων, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να υπάρχει μετάδοση από το στόμα [411]. Η ανίχνευση RNA νοροϊού στον ορό παιδιών με γαστρεντερίτιδα έχει επίσης αναφερθεί, αλλά δεν είναι γνωστό αν αυτό το RNA αντιστοιχεί σε εκείνο του κυκλοφορούντος μολυσματικού ιού (ιαιμίας) ή του μη μολυσματικού (αδρανοποιημένου) ιού που υπάρχει στα κυκλοφορούντα ανοσιακά κύτταρα [414].

Οι νοροϊοί μεταδίδονται με διάφορους τρόπους. Οι κυριότεροι τρόποι μετάδοσης για τους νοροϊούς είναι η επαφή μεταξύ ατόμων και η τροφιμογενής ή υδατογενής μετάδοση. Η μόλυνση των επιφανειών και των αντικειμένων από μολυσμένα άτομα μπορεί να οδηγήσει σε έκθεση [427]. Αρκετές επιδημιολογικές έρευνες έχουν συνδέσει την έκθεση σε νοροϊούς με τον αέρα ή τα αερολύματα από έμετο [402].

Ο εκρηκτικός χαρακτήρας ορισμένων εξάρσεων κρουσμάτων NV, κατά τη διάρκεια των οποίων νόσησε μέσα σε 24 έως 48 ώρες ένας μεγάλος αριθμός ατόμων, δείχνει ότι η μόλυνση συχνά προέρχεται από κοινή πηγή. Αυτή η υπόθεση διατυπώθηκε ήδη από την αρχική έξαρση κρουσμάτων από τον ιό NV, αλλά δεν μπόρεσε να αναγνωριστεί η κοινή πηγή μόλυνσης. Αργότερα, μια ανασκόπηση των 38 εξάρσεων κρουσμάτων από τον ιό NV ανέδειξε ότι στις 31 περιπτώσεις (82%) ήταν πιθανή η

ύπαρξη κοινής πηγής μόλυνσης. Ο τρόπος μετάδοσης αναγνωρίστηκε σε 17 από τις 31 περιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένης της υδατογενούς μετάδοσης στις 13 περιπτώσεις και της τροφιμογενούς στις άλλες τέσσερις. Η υδατογενής μετάδοση αποδόθηκε στο δημοτικό σύστημα ύδρευσης (δύο φορές), σε ημι-δημόσιο νερό (επτά φορές), σε αποθηκευμένο νερό σε κρουαζιερόπλοιο (δύο φορές) και σε κολυμβητήρια αναψυχής (δύο φορές). Η τροφιμογενής μετάδοσης συσχετίστηκε με την κατανάλωση στρειδιών ή σαλάτας. Η πρωτογενής μετάδοση από άτομο σε άτομο αφορούσε σε επτά από τις 38 εστίες [408].

Σε 20 από τις 23 περιπτώσεις που είχαν κοινή πηγή μόλυνσης και σε κάθε μία από τις τρεις περιπτώσεις όπου υπήρχε πρωτογενής μετάδοση από άτομο σε άτομο, παρατηρήθηκε δευτερογενής μετάδοση με ρυθμό μόλυνσης - λοιμογόνου δύναμης από 4% έως 32%. Σε μια μεγάλη έξαρση κρουσμάτων για την οποία υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για την ηλικία των νοσούντων, το δευτερεύον ποσοστό μόλυνσης - λοιμογόνου δύναμης ήταν υψηλότερο στα παιδιά ηλικίας κάτω των 10 ετών. Η μέση διάρκεια των 38 περιπτώσεων ήταν 7 ημέρες (από 1 ημέρα έως 3 μήνες). Ο αριθμός των ατόμων που νόσησαν κυμάνθηκε από 2 έως 2.000, με το ποσοστό εκδήλωσης συμπτωμάτων να είναι υψηλότερο στις κοινές εστίες (μέσος όρος 60%, εύρος 23% έως 93%) σε σχέση με τις πρωτογενείς εστίες μετάδοσης από άτομο σε άτομο (διάμεσος 39%, εύρος 31% έως 42%) [216]. Στην έξαρση κρουσμάτων του Κολοράντο από τον ιό Snow Mountain, το 61% των 418 κρουσμάτων που καταγράφηκαν είχαν έναρξη συμπτωμάτων σε μία μόνο ημέρα [428]. Ως αιτιολογικός παράγοντας προτάθηκε η υδατογενής μετάδοση επειδή η ταχύτητα προσβολής σχετίστηκε άμεσα με την ποσότητα των καταναλωθέντων ποτών που περιείχαν νερό ή πάγο. Επιπλέον, η παροχή νερού μολύνθηκε από διαρροή σηπτικής δεξαμενής και ήταν ανεπαρκώς χλωριωμένη [429].

Η μολυσματική δόση των νοροϊών είναι μικρή, με διάμεση τιμή 18 ιικών σωματιδίων [430]. Έκθεση σε υψηλότερα επίπεδα πιθανότατα αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης νόσου. Σε μια μελέτη που εξετάστηκε το ιικό φορτίο των κοπράνων, ανιχνεύθηκαν μεγάλοι αριθμοί (πάνω από 100 φορές) αντιγράφων γονιδιώματος νοροϊού σε άτομα που απεκκρίνουν GI (διάμεση  $3,0 \times 10^8$  γονιδιωματικά αντίγραφα ανά γραμμάριο κοπράνων) σε σχέση με GII (διάμεση τιμή,  $8,4 \times 10^5$  αντίγραφα γονιδιώματος ανά γραμμάριο κοπράνων) [431]. Προτάθηκε ότι τα υψηλότερα επίπεδα απέκκρισης GII μπορεί να αντιπροσωπεύουν υψηλότερη μεταδοτικότητα αυτών των ιών μέσω της κοπρανοστοματικής οδού [431]. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και υψηλά επίπεδα απέκκρισης GI καθώς η διάμεση τιμή του ιού που απεκκρίθηκε στα κόπρανα των 16 εθελοντών ήταν  $9,5 \times 10^{10}$  αντίγραφα γονιδιώματος ανά γραμμάριο κοπράνων [403].

Οι νοροϊοί είναι εξαιρετικά σταθεροί σε φυσικοχημικούς παράγοντες. Σε μελέτη εθελοντών βρέθηκε ότι ο NV διατηρεί τη μολυσματικότητα του μετά από (α) έκθεση των κοπράνων σε pH 2,7 για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, (β) κατεργασία με

20% αιθέρα στους 4 °C επί 18 ώρες, ή (γ) επώαση στους 60 °C για 30 λεπτά [404]. Τα βίρια του ιού Norwalk παραμένουν μολυσματικά όταν φυλάσσονται σε υπόγεια ύδατα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για διάστημα 61 ημερών και το RNA μπορεί να ανιχνευθεί σε τέτοια δείγματα μετά από αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 χρόνια [432]. Ο NV είναι ανθεκτικός σε αδρανοποίηση μετά από επεξεργασία με χλωρίνη με συγκέντρωση χλωρίου 3,75 έως 6,25 mg (ελεύθερο υπολειμματικό χλώριο από 0,5 έως 1,0 mg / L) /, συγκέντρωση χλωρίου που είναι σύμφωνη με εκείνη που διαπιστώθηκε σε δίκτυο διανομής πόσιμου νερού) [433]. Ο NV, ωστόσο, απενεργοποιείται μετά από επεξεργασία με 10 mg / L χλωρίου, μια συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των δικτύων ύδρευσης μετά από ανίχνευση μόλυνσης. Ο NV είναι πιο ανθεκτικός στην απενεργοποίηση με χλώριο από τον ιό τύπου 1, τον ανθρώπινο ροταϊό (Wa), τον ροταϊό του πιθήκου (SA11) ή τον f2 βακτηριοφάγο [433].

## 2.9. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΥΝΑΜΗ

Οι καθοριστικοί παράγοντες της λοιμογόνου δύναμης των νοροϊών του ανθρώπου δεν έχουν προσδιοριστεί ακόμα, αλλά οι διαφορές στην κλινική έκβαση, που κυμαίνονται από ασυμπτωματική μόλυνση έως σοβαρή διάρροια, υποδηλώνουν ότι υπάρχουν διαφορές στα στελέχη του ιού. Η εντυπωσιακή διακύμανση του επιπολασμού της νόσου σε ορισμένα έτη, με απότομες αυξήσεις των εξάρσεων κρουσμάτων παγκοσμίως και το εύρος της νόσου αποτελούν χαρακτηριστικά της επιδημιολογίας των νοροϊών (ειδικά για τον γονότυπο GII.4) και ένδειξη ότι πράγματι υπάρχουν διαφορές στα στελέχη του ιού [429].

## 2.10. ΕΜΜΕΝΟΥΣΑ ΛΟΙΜΩΞΗ

Οι νοροϊοί έχουν συσχετιστεί με εμμένουσα λοίμωξη σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, [345,392] και επομένως η νοσοκομειακή μετάδοση νοροϊών σε τέτοιους ασθενείς θα πρέπει να προλαμβάνεται με τη λήψη μέτρων προφύλαξης. Σε μια μελέτη, εννέα ενήλικες ασθενείς που είχαν λάβει αλλομοσχεύματα νεφρού και ήταν ανοσοκατεσταλμένοι, φάνηκε ότι απεκκρίνουν τον ιό για περιόδους που κυμαίνονται από 97 σε 898 ημέρες [434]. Σε άλλη μελέτη, καταγράφηκε η παρουσία χρόνιας διάρροιας σε έναν ασθενή που υποβλήθηκε σε μεταμόσχευση καρδιάς και ανοσοκατασταλτική θεραπεία, ο οποίος απέκκρινε ένα στέλεχος νοροϊού GII για διάστημα 2 ετών [345]. Ένας ασθενής 36 ετών εισήχθη στο νοσοκομείο με χρόνια διάρροια και αναφέρθηκε ότι απέκκρινε τον ιό για 15 μήνες [435]. Ο θάνατος δύο ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία συσχετίστηκε με παρατεταμένη διάρροια λόγω λοίμωξης από νοροϊούς [436]. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι οι



ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς με λοίμωξη από νοροϊό, διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης εντερικής πνευμάτωσης [437].

## 2.11. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

### 2.11.1. ΗΛΙΚΙΑ

Οι νοροϊοί έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις και ασθένειες σε όλες τις ηλικιακές ομάδες.

Σύμφωνα με πρόσφατη ανασκόπηση των δημοσιευμένων μελετών, ο εκτιμώμενος συνολικός επιπολασμός στα βρέφη και στα μικρά παιδιά που νοσηλεύονται για θεραπεία γαστρεντερίτιδας είναι περίπου 12%, γεγονός που καθιστά τους νοροϊούς το δεύτερο σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε αυτή την ηλικιακή ομάδα μετά τους ροταϊούς. Άλλωστε, κατά την περίοδο επιτήρησης, μετά την αποτελεσματική χορήγηση του εμβολίου έναντι του ροταϊού σε βρέφη στη Φιλανδία, βρέθηκε ότι η μόνη σημαντική αιτία οξείας γαστρεντερίτιδας ήταν οι νοροϊοί.

Οι νοροϊοί συσχετίστηκαν πρόσφατα με την πρόκληση γαστρεντερίτιδας σε ηλικιωμένους, ιδιαίτερα εκείνους που ζουν σε νοσηλευτικά ιδρύματα [438]. Το 25% των 233 εξάρσεων κρουσμάτων μη βακτηριακής γαστρεντερίτιδας που αναφέρθηκαν στα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) από τον Ιούλιο του 1997 έως τον Ιούνιο του 2000, σημειώθηκαν σε νοσοκομεία και νοσηλευτικά ιδρύματα.

### 2.11.2. ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ - ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

Παρόλο που δεν είναι διαθέσιμα ακριβή στοιχεία για τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα, αρκετές μελέτες εκτιμούν ότι υπάρχει σημαντικό εύρος στις ασθένειες που σχετίζονται με τους νοροϊούς [439,440]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, περίπου 71.000 νοσηλείες συνδέονται κάθε χρόνο με γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από νοροϊούς, με κόστος που ανέρχεται στα 493 εκατομμύρια δολάρια ετησίως [441]. Σε μια ανασκόπηση δημοσιευμένων μελετών, οι νοροϊοί αναφέρθηκαν σταθερά ως η δεύτερη πιο σημαντική αιτία σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε βρέφη και μικρά παιδιά παγκοσμίως, με 200.000 θανάτους ετησίως σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών στις αναπτυσσόμενες χώρες [442]. Οι νοροϊοί έχουν συνδεθεί με γαστρεντερικές νόσους σε νεογνά. Έχει αναφερθεί μόλυνση από νοροϊούς και εμφάνιση νόσου σε πρόωρα βρέφη που λαμβάνουν εντατική φροντίδα σε νοσοκομειακές μονάδες και ότι η νεκρωτική εντεροκολίτιδα εμφανίστηκε συχνότερα σε πρόωρα βρέφη με μόλυνση

από νοροϊό [443]. Σε μια ανάλυση ιατρικών καταχωρίσεων (όπως επισκέψεις σε γιατρούς, νοσηλείες και θάνατοι) που σχετίζονταν με γαστρεντερίτιδα μη αναγνωρισμένης αιτίας κατά τη διάρκεια περιόδων εξάρσεων κρουσμάτων νοροϊών στην Ολλανδία, εκτιμήθηκε ότι τα ηλικιωμένα άτομα (ηλικίας 65 ετών και άνω) διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για σοβαρές ασθένειες που απαιτούν ιατρική παρέμβαση και θάνατο [444].

Στη Σουηδία, παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας σε ηλικιωμένους ασθενείς που νοσηλεύτηκαν για τη θεραπεία σοβαρής γαστρεντερίτιδας λόγω λοίμωξης από νοροϊούς [445]. Επιπλέον, θνησιμότητα 2% αναφέρθηκε σε μια σημαντική έξαρση κρουσμάτων από νοροϊούς σε έξι νοσηλευτικά ιδρύματα στο Ισραήλ [446]. Σε μια ανάλυση για τον ρόλο των διάφορων εντερικών παθογόνων σε νοσηλευόμενους ασθενείς στον Καναδά (από το 2001 έως το 2004) εκτιμήθηκε ότι οι νοροϊοί ήταν ο υπεύθυνος αιτιολογικός παράγοντας για μέση επίπτωση νοσηλείας 1,6 περιπτώσεων ανά 100.000 και ότι η μέση ηλικία των νοσηλευόμενων ασθενών ήταν 59 ετών [447]. Κατά τη διάρκεια αυτής της τετραετούς περιόδου, αποδόθηκαν 43 θάνατοι σε νοροϊούς, καθιστώντας τους κύρια αιτία θνησιμότητας μεταξύ των εντερικών παθογόνων που μελετήθηκαν. Οι νοροϊοί έχουν συσχετιστεί με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα σε ασθενείς με υποκείμενη νόσο, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις ή ανοσοκατεσταλμένους ή που ασθενείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία [392,408,436].

### 2.11.3. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΩΝ ΕΠΙΔΗΜΙΩΝ

Σε μία μελέτη 233 περιπτώσεων έξαρσης κρουσμάτων μη βακτηριακής γαστρεντερίτιδας που αναφέρθηκαν στο CDC από τον Ιούλιο του 1997 έως τον Ιούνιο του 2000, οι 217 (93%) συσχετίστηκαν με νοροϊούς [438]. Σε μια μεγαλύτερη έρευνα σε 3.714 μη βακτηριακές εστίες γαστρεντερίτιδας που εμφανίστηκαν στην Ευρώπη μεταξύ του 1995 και του 2000, το 85% συνδέθηκε με νοροϊούς [448]. Εξάρσεις κρουσμάτων εμφανίζονται συχνά σε νοσοκομεία, εγκαταστάσεις μακροχρόνιας φροντίδας, στρατόπεδα, χώρους αναψυχής, δημοτικά σχολεία, κέντρα ημερήσιας φροντίδας, κρουαζιερόπλοια, κέντρα συνταξιοδότησης, κολέγια, εστιατόρια, οικογένειες, κοινωνικές εκδηλώσεις με μενού και φυλακές. Οι εξάρσεις αυτές μπορεί να ποικίλουν σε μέγεθος, από μικρές οικογένειες έως εκατοντάδες άτομα.

Αξιοσημείωτος είναι ο κυρίαρχος ρόλος των νοροϊών σε εξάρσεις κρουσμάτων που σχετίζονται με τροφιμογενή μετάδοση. Οι νοροϊοί είναι η κύρια αιτία τροφιμογενούς νόσου στις ΗΠΑ ακολουθούμενοι από *Salmonella* [μη-τυφοειδής], *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp. και *Staphylococcus aureus*) καθώς αντιπροσπεύουν περίπου το 26% όλων των αναφερόμενων περιπτώσεων [440]. Σε μια μελέτη 8.271

τροφιμογενών εξάρσεων που αναφέρθηκαν από τον CDC (1991-2000) φάνηκε ότι οι εξάρσεις που αποδόθηκαν σε νοροϊούς ήταν συχνά μεγαλύτερες από τις εξάρσεις που αποδόθηκαν σε βακτήρια (διάμεση τιμή ατόμων που προσβλήθηκαν: 25 έναντι 15), με το 10% των ατόμων να χρήζουν ιατρικής περίθαλψης και το 1% να νοσηλεύονται σε νοσοκομείο [449]. Σε μια μελέτη υδατογενών εξάρσεων κρουσμάτων στη Φινλανδία, οι 18 (64%) από τις 28 περιπτώσεις που αξιολογήθηκαν, συσχετίστηκαν με νοροϊούς [450]. Τα δίθυρα μαλάκια (όπως τα στρείδια και μύδια) ήταν μια σημαντική πηγή τροφιμογενούς μετάδοσης νοροϊών.

Οι νοροϊοί έχουν επίσης αναφερθεί ως σημαντικοί παράγοντες γαστρεντερίτιδας σε στρατόπεδα σε αρκετά διαφορετικές περιοχές του κόσμου [451]. Μεταξύ του προσωπικού του στρατού των ΗΠΑ που απασχολούνταν στη Νότια Αμερική ή τη Δυτική Αφρική, η λοίμωξη από NV ανιχνεύθηκε στο 10% του νοσούντος προσωπικού, ακολουθώντας τα εντεροτοξινογόνα στελέχη *Escherichia coli* τα οποία ήταν η πιο συχνή αιτία (17%) [452]. Επιπλέον σημαντικές εξάρσεις κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας από νοροϊούς έχουν αναφερθεί σε πλοία όπου νόσησαν εκατοντάδες μέλη του πληρώματος.

Αν και η πλειοψηφία των περιστατικών διάρροιας των ταξιδιωτών αποδίδεται σε εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli*, ο αριθμός των αναφορών που έχουν συνδέσει τους νοροϊούς με τη νόσο αυξάνεται. Έχει επίσης αναφερθεί μετάδοση των νοροϊών σε αεροπλάνα και κρουαζιερόπλοια αναδεικνύοντας την πιθανή ευκολία με την οποία διασπείρονται τα στελέχη παγκοσμίως.

#### 2.11.4. ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Οι νοροϊοί έχουν παγκόσμια κατανομή. Τόσο σε ανεπτυγμένες όσο και σε αναπτυσσόμενες χώρες, τα άτομα που παρουσιάζουν μόλυνση είναι κατά κύριο λόγο ανήλικοι αντανακλώντας την παγκόσμια κατανομή και την ενδημική φύση αυτών των ιών [453]. Σε μια μελέτη που έγινε σε βρέφη και παιδιά ηλικίας 0 έως 14 ετών στη Φινλανδία, διαπιστώθηκε ότι ο επιπολασμός αντισωμάτων έναντι των νοροϊών GII.4 φθάνει στο 91,2% σε παιδιά ηλικίας άνω των 5 ετών [454]. Ο επιπολασμός αντισωμάτων έναντι των νοροϊών GII (Μεξικό, Χαβάη ή Lordsdale) φαίνεται να είναι υψηλότερος από εκείνη των ιών GI στις περισσότερες αλλά όχι σε όλες τις μελέτες το οποίο πιθανώς αντανακλά την κυριαρχία των στελεχών GII. Ο επιπολασμός των αντισωμάτων έναντι των νοροϊών παρουσιάζει χαρακτηριστική αύξηση με την ηλικία σε αναπτυγμένες χώρες σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες χώρες [453].

Η επίπτωση της γαστρεντερίτιδας από νοροϊούς εκτιμήθηκε σε αρκετές κοινοτικές μελέτες. Στις ΗΠΑ μια μελέτη επιτήρησης για την οξεία γαστρεντερίτιδα (που περιελάμβανε την αναγνώριση του παθογόνου παράγοντα με τη χρήση διαγνωστικών

δοκιμών) σε μια μόνο πολιτεία (Georgia) ανέδειξε ότι οι νοροϊοί ήταν η κυρίαρχη αιτία οξείας γαστρεντερίτιδας, αντιστοιχώντας σε 6.500 (16%) και 640 (12%) ανθρωπο-έτη ανά 100.000 σε επίπεδο κοινότητας και επίπεδο ασθενή με οξεία γαστρεντερίτιδα αντίστοιχα [439].

Στην Ολλανδία, το 18% των κοινοτικών περιπτώσεων γαστρεντερίτιδας κατά τη διάρκεια μίας μόνο χειμερινής περιόδου και τουλάχιστον 5% των περιπτώσεων γαστρεντερίτιδας που οδήγησαν σε επίσκεψη σε γιατρό, συνδέθηκαν με λοίμωξη από νοροϊό [455]. Επιπλέον, μια διετής προοπτική πληθυσμιακή μελέτη σειράς έδειξε ότι οι νοροϊοί ήταν η μόνη σημαντική αιτία γαστρεντερίτιδας συνολικά σε όλες σχεδόν τις ηλικιακές ομάδες στην Ολλανδία [456]. Στη Γερμανία, η συχνότητα εμφάνισης γαστρεντερίτιδας από νοροϊούς στην κοινότητα που απαιτεί ιατρική φροντίδα, αναφέρθηκε σε 626 περιπτώσεις / ανά 100.000 ανθρωπο-έτη, καθιστώντας την κυρίαρχη γνωστή αιτία οξείας γαστρεντερίτιδας σε αυτή τη χώρα. [457] Στην Αγγλία, η συχνότητα εμφάνισης γαστρεντερίτιδας από νοροϊούς ήταν 4,5 περιπτώσεις / ανά 100 ανθρωπο-έτη, που αντιστοιχεί σε περίπου 2 εκατομμύρια επεισόδια ανά έτος [458].

## 2.12. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΤΟΥ ΙΟΥ

Μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη σημαντικής γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των κυκλοφορούντων νοροϊών. Η γενετική τυποποίηση των κυκλοφορούντων στελεχών έχει αποδειχθεί χρήσιμο εργαλείο για την αποσαφήνιση της πηγής και της εξάπλωσης των εξάρσεων κρουσμάτων, [459] και δίκτυα διάχυσης δεδομένων έχουν δημιουργηθεί σε διάφορες περιοχές του κόσμου [460]. Τα συστήματα γενετικής τυποποίησης που έχουν προταθεί για τους νοροϊούς βασίζονται στη συγγένεια ως προς την πρωτεΐνη του καψιδίου VP1, η οποία πιθανώς να σχετίζεται με αντιγονική ειδικότητα [459]. Με βάση αυτό το σύστημα, το γένος *Noovirus* διαχωρίζεται σε έξι κύριες φυλογενετικές ομάδες, που χαρακτηρίζονται GI έως GV. Οι ομάδες I, II και III υποδιαιρούνται περαιτέρω σε 9, 21 και 3 γονότυπους, αντίστοιχα.

Μεγάλου εύρους μοριακές επιδημιολογικές μελέτες παρείχαν πληροφορίες για σημαντικά γενετικά χαρακτηριστικά των νοροϊών. Μια ανάλυση των δεδομένων γενετικής τυποποίησης από 2.512 νοροϊούς που σχετίζεται με εξάρσεις κρουσμάτων στην Ευρώπη από το 2000 έως το 2011, έδειξε τη σημαντική γενετική ποικιλομορφία στους γονότυπους των κυκλοφορούντων στελεχών. Οι νοροϊοί GI, ιδιαίτερα εκείνοι της ομάδας GI.4, ήταν οι κυρίαρχοι ιοί που ανιχνεύθηκαν και αυτή η κατανομή αντανάκλασε το επιδημιολογικό πρότυπο που παρατηρείται στα περισσότερα μέρη του κόσμου. Σε μια ανάλυση 773 εξάρσεων κρουσμάτων νοροϊών που αναφέρθηκαν στο

CDC από το 1994 έως το 2006, οι 629 (81,4%) προκλήθηκαν από τους ιούς GII και οι 342 (44,2%) προκλήθηκαν από τα στελέχη GII.4 [461]. Στο κυρίαρχο στέλεχος μπορεί να εμφανιστούν μείζονες μετατοπίσεις [461–463] και οι παράγοντες (ξενιστής ή ιός) που είναι υπεύθυνοι για την ανάδυση ενός επιδημικού στελέχους νοροϊού βρίσκονται υπό διερεύνηση. Η ανάλυση της αλληλουχίας των νοροϊών GII.4 που αναδύθηκαν σε παγκόσμιο επίπεδο στις αρχές της δεκαετίας του 2000, αναγνώρισε την εισαγωγή αμινοξέων στην περιοχή VP1 του τομέα P2, υποδηλώνοντας μια πιθανή αλλαγή στον φαινότυπο αναγνώρισης του αντιγόνου ή του υποδοχέα [344]. Στην ομάδα GII.4 περιγράφηκε περαιτέρω εξέλιξη, 56 και αρκετές μελέτες εξέτασαν την πιθανώς μοναδική τάση αυτού του γονότυπου να υποβάλλεται σε γενετική (και αντιγονική) μετατόπιση. Η γενετική διαφοροποίηση έχει ανιχνευθεί σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος όπως η ανάδυση του τύπου πολυμεράσης "GGIIB-pol" που βρέθηκε σε στελέχη νοροϊού σε συνδυασμό με διάφορους διαφορετικούς γονότυπους VP1 [463]. Πρόσθετες αναφορές μοναδικών αλληλουχιών πολυμεράσης οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο ανασυνδυασμός είναι ένας μηχανισμός που οδηγεί στην εξέλιξη των νοροϊών [464].

Αποδεικτικά στοιχεία για μικτές λοιμώξεις από νοροϊούς στο ίδιο άτομο ή στην ίδια έξαρση κρουσμάτων έχουν αναφερθεί σε πολλές επιδημιολογικές μελέτες. Επιπλέον, σημαντική γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών του νοροϊού έχει τεκμηριωθεί σε παιδιατρικούς ασθενείς [465]. Τέτοιες ποικίλες και μικτές μολύνσεις μπορεί να επιτρέψουν τον ανασυνδυασμό μεταξύ γονιδιωμάτων RNA, μια πιθανότητα που προτείνεται από αναλύσεις αλληλουχίας φυσικά κυκλοφορούντων νοροϊών σε αρκετά είδη [464]. Η παρουσία διαφόρων αλληλουχιών νοροϊού σε δείγματα οστρακοειδών είναι συνήθης, [466] υποδηλώνοντας μια άλλη πιθανή πηγή για μικτή μόλυνση.

### 2.13. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Η ιογενής γαστρεντερίτιδα γενικά θεωρείται ότι είναι ήπια και αυτοπεριοριζόμενη, αν και η ασθένεια μπορεί να οδηγήσει σε ανικανότητα για εργασία του ασθενή κατά τη διάρκεια της συμπτωματικής φάσης που συνήθως διαρκεί 24 έως 48 ώρες. Η νόσος μπορεί να είναι αρκετά σοβαρή ώστε να απαιτεί ιατρική παρέμβαση, με αυξημένο κίνδυνο για πρόκληση αφυδάτωση απειλητικής για τη ζωή και στα δύο άκρα του ηλικιακού φάσματος [408]. Η πιθανότητα νοσηρότητας και θνησιμότητας είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς ενώ οι περιπτώσεις σύνδεσης της λοίμωξης με νοροϊό και της χρόνιας γαστρεντερίτιδας σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση ή χημειοθεραπεία αυξάνονται συνεχώς [467–469]. Οι κλινικές εκδηλώσεις που καταγράφηκαν σε 31 εθελοντές που μολύνθηκαν πειραματικά με νοροϊούς και εκδήλωσαν νόσο, περιελάμβαναν τα ακόλουθα: πυρετό

άνω του 37,2 °C (45%), διάρροια (81%), έμετο (65%), κοιλιακό άλγος (68%), ανορεξία (90%), κεφαλαλγία (81%) και μυαλγίες (58%). Αξίζει να σημειωθεί, ότι υπήρξε μια περίπτωση εθελοντή ο οποίος έλαβε υγρά παρεντερικά διότι παρουσίασε έμετο 20 φορές εντός 24 ωρών. Ο αριθμός των κλινικών συμπτωμάτων και σημείων μπορεί να διαφέρει μεταξύ των εθελοντών που μολύνονται με την ίδια δόση ιού.[405] Η νόσος που παρουσίασαν οι εθελοντές στους οποίους προκλήθηκε μόλυνση με τους ιούς Hawaii, Montgomery County και Snow Mountain δεν μπορεί να διακριθεί κλινικά από αυτή που προκαλείται από τον ιό Norwalk [407,428]. Τόσο σε πειραματικές όσο και σε φυσικές συνθήκες έχουν επίσης παρατηρηθεί υποκλινικές λοιμώξεις από τον ιό Norwalk ή Hawaii. Από τους 16 εθελοντές που εμφάνισαν νόσο μετά από λοίμωξη από τον ιό Norwalk ή από τον ιό Hawaii, οι 14 εμφάνισαν παροδική λεμφοπενία. Αυτό αποδόθηκε σε μια ανακατανομή των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων στη θέση της ιογενούς μόλυνσης στο λεπτό έντερο. Τα λεμφοκύτταρα που παραμένουν στην κυκλοφορία ανταποκρίθηκαν κανονικά ή εμφάνισαν υπερβολική απόκριση στα μιτογόνα ερεθίσματα.

Οι κλινικές εκδηλώσεις που παρατηρήθηκαν σε 38 εξάρσεις κρουσμάτων που σχετίζονται με τον NV περιελάμβαναν τα ακόλουθα συμπτώματα: ναυτία (79%), έμετος (69%), διάρροια (66%), κοιλιακές κράμπες (30%), κεφαλαλγία (22%), πυρετό (37%), ρίγη (32%), μυαλγίες (26%) και πονόλαιμο (18%). Δεν αναφέρθηκαν αιμορραγικά κόπρανα. Ο έμετος αναφέρθηκε συχνότερα από τη διάρροια στα παιδιά, ενώ στους ενήλικες παρατηρήθηκε το αντίστροφο. Η διάρκεια της ασθένειας στις 28 εξάρσεις κρουσμάτων κυμάνθηκε από 2 ώρες έως αρκετές ημέρες, με μέση ή διάμεση τιμή μεταξύ 12 και 60 ώρες σε 26 από τις 28 εξάρσεις κρουσμάτων. Σε έξι περιπτώσεις, η νόσος διήρκεσε περισσότερο από 3 ημέρες σε ποσοστό έως και 15% των προσβεβλημένων ατόμων. Τα ποσοστά δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά με βάση την ηλικία ή το φύλο σε έξι περιπτώσεις κατά τις οποίες αναλύθηκαν αυτές οι παράμετροι [408].

Μια διετής μελέτη σε παιδιά (ηλικίας έως 5 ετών) συνέκρινε τη σοβαρότητα των οξέων διαρροϊκών επεισοδίων που προκαλούνται από νοροϊούς με τα επεισόδια που προκαλούνται από ροταϊούς σε νοσοκομείο στο τμήμα των επειγόντων περιστατικών και στα εξωτερικά ιατρεία. Οι περισσότερες περιπτώσεις και για τους δύο ιούς κυμαίνονταν από μέτριες έως σοβαρές, παρόλο που η ασθένεια ήταν συνολικά λιγότερο σοβαρή για τα άτομα που ήταν μολυσμένα με νοροϊό [470]. Η κλινική πορεία της νόσου από νοροϊούς σε πρόωρα βρέφη έχει αναφερθεί ότι περιλαμβάνει συμπτώματα όπως διάταση κοιλίας, άπνοια ή εμφάνιση τύπου σηψαιμίας ενώ οι έμετοι δεν αποτελούν κυρίαρχο σύμπτωμα σε αυτούς τους ασθενείς [471]. Οι νοροϊοί έχει αναφερθεί ότι σχετίζονται με σπάνιες παθήσεις ή επακόλουθα όπως σπασμοί, [472] εγκεφαλοπάθεια, [413] και νεκρωτική εντεροκολίτιδα [443].

## 2.14.ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Μετά από ανάλυση των κοινών χαρακτηριστικών των 38 εξάρσεων κρουσμάτων από NV φάνηκε ότι η διάγνωση της νόσου από τους νοροϊούς μπορεί να τεθεί, εάν πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια: α) δεν ανιχνεύονται βακτηριακοί ή παρασιτικοί παθογόνοι παράγοντες, (β) ο έμετος συμβαίνει σε περισσότερο από το 50% των περιπτώσεων, (γ) η μέση ή διάμεση διάρκεια της ασθένειας κυμαίνεται από 12 έως 60 ώρες και (δ) η περίοδος επώασης είναι 24 έως 48 ώρες[215]. Αυτά είναι τα αποκαλούμενα κριτήρια Kaplan και βρέθηκαν να είναι 99% και 68% ειδικά για την αναγνώριση των εξάρσεων κρουσμάτων από νοροϊούς όταν επαναξιολογήθηκαν μετά από ανάλυση δειγμάτων που επιβεβαιώθηκαν ως θετικά για το νοροϊό[476]. Η διαφορική διάγνωση της νόσου που συμβαίνει σποραδικά σε μεμονωμένους ασθενείς είναι δύσκολη λόγω των κοινών κλινικών χαρακτηριστικών με ένα ευρύ φάσμα εντερικών παθογόνων παραγόντων και συνδρόμων.

## 2.15. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

### 2.15.1. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Επί του παρόντος, η RT-PCR είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανίχνευση των νοροϊών. Με αυτή τη μέθοδο, οι νοροϊοί μπορούν να ανιχνευθούν σε κλινικά δείγματα (κόπρανα ή έμετος), μολυσμένα τρόφιμα και νερό. Η εφαρμογή της Real Time RT-PCR που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου έχει αποκτήσει ευρεία χρήση, διότι επιτρέπει την ταχεία ανίχνευση καθώς και τη σύγκριση των επιπέδων RNA του ιού [473]. Υπάρχουν διάφορες θεωρήσεις για τις βέλτιστες επιδόσεις των τεχνικών RT-PCR [395]. Η διαδικασία εκχύλισης ιικού RNA πρέπει να επιτρέπει τον καθαρισμό του RNA ώστε να μην είναι αποικοδομημένο και να είναι παράλληλα απαλλαγμένο από αναστολείς της αντίδρασης RT-PCR. Οι εσωτερικοί έλεγχοι RNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση κλινικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Η επιλογή των εκκινητών είναι σημαντική, επειδή υπάρχει σημαντική γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των κυκλοφορούντων στελεχών. Έχουν περιγραφεί αρκετά ζεύγη εκκινητών τα οποία συνάγονται από εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος RNA (συνήθως την περιοχή πολυμεράσης) [474]. Η RT-PCR, σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων των προϊόντων της PCR, έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό νοροϊών σε διάφορες εξάρσεις κρουσμάτων. Η ταυτοποίηση των νοροϊών συμπεριλαμβάνεται ολοένα και περισσότερο σε δοκιμές multiplex που ανιχνεύουν μια ευρεία σειρά εντερικών παθογόνων και διευκολύνεται από μια βάση δεδομένων

νοροϊών που έχει επιτρέψει το σχεδιασμό ευρέως δραστικών εκκινήτων και ανιχνευτών.

## 2.15.2. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Έχουν αναπτυχθεί ανοσολογικές δοκιμές για την ανίχνευση νοροϊών οι οποίες χρησιμοποιούν υπεράνοσους αντιορούς που παρασκευάζονται έναντι των rVLPs [453,475]. Αν και είναι ευαίσθητες, αυτές οι δοκιμές είναι συχνά ιδιαίτερα εξειδικευμένες για τα VLP [416,453]. Έχει σημειωθεί πρόοδος στην ανάπτυξη τόσο ειδικών για τους νοροϊούς όσο και διασταυρούμενων μονοκλωνικών αντισωμάτων [417] για χρήση σε δοκιμές ELISA που μπορούν να ανιχνεύσουν ιικό αντιγόνο σε κλινικά δείγματα και είναι διαθέσιμα εμπορικά διαγνωστικά κιτ. Οι ELISAs που χρησιμοποιούν rVLPs ως αντιγόνο είναι ειδικές, ευαίσθητες και αποτελεσματικές για την ανίχνευση της μόλυνσης από τους καλυκοϊούς και έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετές οροεπιδημιολογικές μελέτες μεγάλης κλίμακας. Η ELISA για τα rVLP του ιού Norwalk έχει αποδειχθεί ότι ανιχνεύει διασταυρούμενες αντιδράσεις αντισωμάτων σε εθελοντές που μολύνθηκαν με τους ιούς NV, Hawaii ή Snow Mountain, αν και η μέγιστη απόκριση παρατηρήθηκε στους εθελοντές που προκλήθηκαν με NV [416]. Έτσι, είναι αδύνατον να αναγνωριστεί ο αντιγονικός τύπος ενός μολυσματικού στελέχους νοροϊού με ορολογική ανάλυση εξαιτίας των διασταυρούμενων αντισωμάτων που ανιχνεύονται διαμέσου της ELISA [476]. Η ύπαρξη ανοσολογικής απόκρισης στο 50% ή περισσότερο των ατόμων που εμπλέκονται (ή εξετάστηκαν) σε μια έξαρση κρουσμάτων έναντι ενός αντιγόνου καλυκοϊού, είναι ισχυρή ένδειξη που συνδέει τον ιό με την έξαρση κρουσμάτων [408].

## 2.16. ΘΕΡΑΠΕΙΑ, ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ

### 2.16.1. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Οι νοροϊοί προκαλούν χαρακτηριστική, αυτοπεριοριζόμενη γαστρεντερίτιδα η οποία κανονικά επιλύεται χωρίς επιπλοκές [404–407]. Η νοσηλεία για σοβαρή αφυδάτωση, αν και σπάνια, μπορεί να συμβεί σε ασθενείς με γαστρεντερίτιδα από νοροϊό. Η θεραπεία με υγρά από το στόμα και η χορήγηση ηλεκτρολυτών είναι συνήθως αρκετή για να αντικαταστήσει την απώλεια υγρών [172,427]. Η θεραπεία επανυδάτωσης από το στόμα δεν θα πρέπει να χορηγείται σε ασθενείς με απώλεια συνείδησης λόγω της πιθανότητας εισρόφησης των χορηγούμενων υγρών. Εάν εμφανιστεί σοβαρός έμετος ή διάρροια, η παρεντερική χορήγηση των υγρών μπορεί να είναι απαραίτητη.



Κατά τη διάρκεια πειραματικά επαγόμενης νόσου από νοροϊούς σε ενήλικες, η χορήγηση υποσαλικυλικού βισμούθιου μετά την εμφάνιση συμπτωμάτων μείωσε σημαντικά τη σοβαρότητα και τη διάρκεια των κοιλιακών κραμπών [406]. Επιπλέον, η μέση διάρκεια των συμπτωμάτων του γαστρεντερικού συστήματος μειώθηκε από 20 σε 14 ώρες. Ο αριθμός, το βάρος και η περιεκτικότητα των κοπράνων σε νερό, καθώς και η απέκκριση του ιού, δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τη θεραπεία. Μια ανασκόπηση που αφορούσε τη χρήση διαφόρων φαρμάκων για τη συμπτωματική θεραπεία της οξείας διάρροιας σε βρέφη και μικρά παιδιά (ηλικίας 1 μήνα έως 5 ετών) έδειξε ότι η το υποσαλικυλικό βισμούθιο, η λοπεραμίδη, οι αντιχολινεργικοί παράγοντες, τα προσροφητικά ή οι ενώσεις που περιέχουν *Lactobacillus* δεν συνιστάται από την Αμερικανική Ακαδημία Παιδιατρικής και επιπλέον, η χρήση οπιούχων καθώς και των συνδυασμών οπιούχων και ατροπίνης αντενδείκνυται [172].

Αν και δεν υπάρχουν ακόμη αντι-ικά φάρμακα για τη θεραπεία της γαστρεντερίτιδας από νοροϊούς, τα πρωτόκολλα θεραπείας που εφαρμόστηκαν για άλλους παθογόνους παράγοντες έχουν αξιολογηθεί σε μικρό αριθμό ατόμων, με ποικίλη επιτυχία. Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, έχει αναφερθεί βελτίωση της χρόνιας διάρροιας λόγω νοροϊών μετά από μείωση των φαρμάκων της ανοσοκατασταλτικής θεραπείας. Ωστόσο, απαιτείται προσεκτική παρακολούθηση αυτών των ασθενών. Οι προσπάθειες για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων που να στοχεύουν σε συγκεκριμένα στάδια του κύκλου ζωής του νοροϊού βρίσκονται σε εξέλιξη, αλλά η ασφάλεια και η κλινική αποτελεσματικότητά τους δεν έχουν καθοριστεί [477].

## 2.16.2. ΕΜΒΟΛΙΑ

Δεν υπάρχει ακόμα διαθέσιμο εμβόλιο για τον έλεγχο της γαστρεντερίτιδας από νοροϊούς, αλλά μια μελέτη αποτελεσματικότητας σε ενήλικες εθελοντές έχει πρόσφατα δείξει ότι η χορήγηση rVLPs του ιού Norwalk ως εμβόλιο παρείχε προστασία έναντι της εκδήλωσης νόσου όταν οι εμβολιασμένοι προκλήθηκαν με τον ιό Norwalk [420]. Είναι αναγκαίο να γίνουν επιπλέον δοκιμές για τον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγονικών συστατικών που απαιτούνται για την παροχή προστασίας έναντι ευρέος φάσματος αντιγονικών τύπων και παραλλαγών του νοροϊού.

Διάφορες οδοί χορήγησης, συνθέσεις και συστήματα έκφρασης των rVLPs βρίσκονται υπό διερεύνηση [348,398,422]. Ένα ασφαλές και αποτελεσματικό εμβόλιο θα μπορούσε να μειώσει τη συχνότητα επιδημικής γαστρεντερίτιδας από ιούς. Η διαθεσιμότητα ενός εμβολίου θα έχει ιδιαίτερη σημασία για τους μαθητές, το προσωπικό του στρατού, τους διαμένοντες σε γηροκομεία και σε διάφορα ιδρύματα. Επιπλέον, μπορεί να μειώσει τον αριθμό των επεισοδίων σοβαρής γαστρεντερίτιδας

σε βρέφη και παιδιά. Αν και η γαστρεντερίτιδα από νοροϊό τείνει να είναι ήπια, η μείωση των διαρροϊκών επεισοδίων μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική σε εξασθενημένα, υποσιτισμένα βρέφη, επειδή έχει αποδειχθεί ότι τα επαναλαμβανόμενα διαρροϊκά επεισόδια μπορεί να είναι σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη υποσιτισμού μέσω διαδοχικών βλαβών του εντερικού βλεννογόνου [478]. Όταν διασαφηνιστεί η επίδραση της λοίμωξης από νοροϊό στη φυσιολογική γαστρεντερική μικροχλωρίδα ή σε υποκείμενες παθήσεις, μπορεί να προκύψουν πρόσθετα δεδομένα για την υποστήριξη της ανοσοπροφύλαξης του νοροϊού.

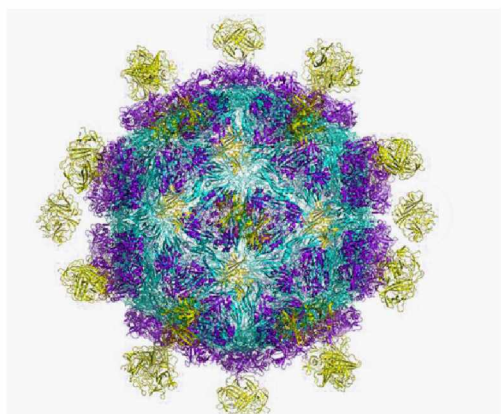
### 2.16.3. ΕΛΕΓΧΟΣ

Δεν υπάρχουν ειδικές μέθοδοι για την πρόληψη της μόλυνσης ή της νόσου από τους νοροϊούς. Η διαχείριση των επιδημιών επικεντρώνεται γενικά στην πρόληψη της εξάπλωσης σε άλλες περιοχές από νοσούντα ή εκτεθειμένα άτομα, συχνό πλύσιμο των χεριών και αποτελεσματική περιβαλλοντική απολύμανση. Οι νοροϊοί είναι γενικά ανθεκτικοί στον καθαρισμό περιβαλλοντικών επιφανειών και υλικών με απορρυπαντικά ή αιθανόλη και απαιτούν πρόσθετη χημική απολύμανση [427]. Έχει αναφερθεί ότι η χρήση απολυμαντικών για τα χέρια με βάση το οινόπνευμα αντί για το πλύσιμο των χεριών έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κίνδυνος μετάδοσης των νοροϊών και της μόλυνσης στις εγκαταστάσεις φροντίδας ασθενών. Ως αποτελεσματικά απολυμαντικά έχουν αναφερθεί αυτά που περιλαμβάνουν υποχλωριώδες στα 5.000 ppm (το οικιακό λευκαντικό είναι περίπου 5% υποχλωριώδες νάτριο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διάλυμα 10%), καθαριστικά με βάση το υπεροξείδιο του υδρογόνου και καθαριστικά με βάση τη φαινόλη [427].

Η συχνή εμφάνιση τροφιμογενών επιδημιών αντανάκλα την επιτακτική ανάγκη για επεξεργασία των τροφίμων σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής. Ο καθαρισμός των στρειδιών δεν είναι επαρκής για την απομάκρυνση των ιικών σωματιδίων του NV και πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο NV συνδέεται με τους ιστούς των στρειδιών μέσω δομών υδατανθράκων παρόμοιων με αυτές των HBGAs [479]. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή της μόλυνσης των στρειδιών με περιττώματα, έμετο ή απόβλητα εργοστασίων επεξεργασίας λυμάτων. Επίσης, η λήψη μέτρων που αυξάνουν την καθαρότητα του πόσιμου νερού ή του νερού των πισίνων μπορεί να μειώσουν τη συχνότητα εμφάνισης εξάρσεων κρουσμάτων.

Διάφορες τεχνολογικές διεργασίες βρίσκονται υπό εξέλιξη για την αδρανοποίηση των νοροϊών στα γεωργικά προϊόντα διατροφής και στα οστρακοειδή πριν από την διάθεση τους στην αγορά. Οι μελέτες σε εθελοντές παραμένουν ένα σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητάς των μέτρων πρόληψης απουσία μιας in vitro δοκιμής μολυσματικότητας για τα ανθρώπινα στελέχη.

### 3. ΑΣΤΡΟΪΟΙ



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση δομής του Άστροϊού

#### 3.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ανάμεσα στα χαρακτηριστικά των αστροϊών είναι η μορφολογία τους, η απουσία τομέα που να κωδικοποιεί την RNA-ελικάση στο γονιδίωμα τους και η χρήση ενός ριβοσωματικού μηχανισμού για τη μετάφραση της RdRp [480]. Σε ό,τι αφορά στην οργάνωση του γονιδιώματος, το ORF που κωδικοποιεί τις μη δομικές πρωτεΐνες εντοπίζεται στο 5' άκρο, και το ORF που κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες στο 3' άκρο.

Αρχικά, οι αστροϊοί ταξινομούνταν σε γένη και είδη με βάση τον ξενιστή στον οποίο εντοπίζονταν. Ωστόσο, ο πρόσφατος χαρακτηρισμός του νέου AstV έδειξε ότι στελέχη που παρουσιάζουν γενετική ομοιότητα απομονώθηκαν από διαφορετικά ζωικά είδη, και στελέχη που παρουσιάζουν γενετικές διαφορές απομονώθηκαν από τα ίδια ζωικά είδη [481–483]. Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν σε ένα νέο σχήμα ταξινόμησης που βασίζεται στην αλληλουχία αμινοξέων του ORF2 (Ομάδα μελέτης αστροϊών, 9η έκθεση ICTV, 2010), [484] το οποίο κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη του καψιδίου και αντιπροσωπεύει την πλέον μεταβλητή περιοχή του γονιδιώματος.

Στην οικογένεια *Astroviridae* διακρίνονται δύο γένη, τα *Mamastrovirus* και *Anastrovirus*. Οι ιοί που ανήκουν στο γένος *Mamastrovirus* περιλαμβάνουν στελέχη που απομονώθηκαν από θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, του χοίρου (PAstV), της γάτας (FeAstV), των μινκ (MAstV), των προβάτων (OAstV), των μόσχων (BoAstV), του σκύλου (CaAstV), των νυχτερίδων (BAstV), των αρουραίων (RAstV), των ελαφιών (CcAstV) και των θαλάσσιων θηλαστικών, όπως μεταξύ άλλων τα θαλάσσια λιοντάρια (CSIAstV) και τα δελφίνια (BdAstV). Αυτό το γένος περιλαμβάνει δύο ομάδες, τις GI και GII, στις οποίες ανήκουν 10 και 9 είδη γονότυπου, αντίστοιχα. Και οι δύο ομάδες περιλαμβάνουν ιούς που απομονώθηκαν

από ανθρώπους και ζώα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πρόσφατα απομονώθηκαν ιοί από ανθρώπους οι οποίοι είναι παρόμοιοι με ιούς που απομονώθηκαν από ζώα όπως μινκ και πρόβατα [481]. Ο HAstV ταξινομούνται προηγουμένως σε ένα είδος που περιλάμβανε τους ορότυπους 1 έως 8 (με βάση την αντιδραστικότητα τους σε υπεράνοσους ορούς, HAstV-1 έως -8) ενώ πλέον ταξινομείται στον προτεινόμενο γονότυπο G1 της ομάδας I. Με βάση τη γενετική ποικιλομορφία που παρουσιάζουν, τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από χοίρους [482], νυχτερίδες [483] και ανθρώπους [481], τοποθετούνται σε αποκλινουσες ομάδες, υποδεικνύοντας την ύπαρξη διαφορετικών προγόνων που κατά πάσα πιθανότητα προέκυψαν κατά τη μετάδοση μεταξύ ειδών [482].

Οι ιοί του γένους *Anastrovirus* περιλαμβάνουν στελέχη από γαλοπούλες (TAstV), πάπιες (DAstV), κοτόπουλα (CAstV) και φραγκόκοτες. Αυτό το γένος περιλαμβάνει δύο προτεινόμενα είδη στη γενετική ομάδα GI (GIA, GIB) και ένα στη γενετική ομάδα II (GIIA). Όπως συμβαίνει και με τον HAstV, τα μέλη κάποιων από αυτά τα είδη μπορούν να διακριθούν με ορολογικές μεθόδους, υποδεικνύοντας την ύπαρξη ικών οροτύπων σε μερικά, όπως στο TAstV-2 και στο ANV [485,486]. Γενικά, οι ιοί του γένους *Anastrovirus* παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε σχέση με τους ιούς του γένους *Mamastrovirus*.

### 3.2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΒΙΡΙΟΥ

Μετά από ανάλυση αστροϊών που προέρχονταν από κυτταροκαλλιέργεια παρουσία θρυψίνης στο EM, φάνηκε ότι τα ιικά σωματίδια παρουσιάζουν εικοσαεδρική συμμετρία, έχουν διάμετρο 41 nm και προεξέχουσες αιχμές στην επιφάνεια τους [487].

Μόνο μετά από αλκαλική επεξεργασία παρατηρήθηκε η μορφή τύπου αστεριού των ικών σωματιδίων. Πρόσφατες μελέτες με cryo-EM και επεξεργασία της εικόνας των σωματιδίων HAstV που έχουν υποστεί επεξεργασία με θρυψίνη και των σωματιδίων χωρίς επεξεργασία με θρυψίνη, επιβεβαίωσαν την εικοσαεδρική δομή με προεξέχουσες αιχμές των ικών σωματιδίων. Μεταξύ των δύο τύπων σωματιδίων παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές. Τα σωματίδια που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία με θρυψίνη, έχουν διάμετρο 46 nm, διαθέτουν 180 αντίγραφα μίας πρωτεΐνης μεγέθους 70kd διατεταγμένων σε εικοσαεδρική συμμετρία  $T = 3$ . Σε αυτά τα σωματίδια μπορούν να παρατηρηθούν δύο είδη αιχμών, που εντοπίζονται σε διπλές και πενταπλές κορυφές. Επίσης διακρίνονται δύο πρωτεϊνικές στιβάδες. Το εσωτερικό στρώμα σχηματίζει τον πυρήνα του καψιδίου και είναι σχεδόν ταυτόσημο με αυτό των επεξεργασμένων σωματιδίων. Ωστόσο, το περιφερικό στρώμα που σχηματίζει τις αιχμές παρουσιάζει δραματικές μεταβολές μετά από επεξεργασία με θρυψίνη. Η επεξεργασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση της πρωτεΐνης μεγέθους 70 kd σε τρία πολυπεπτίδια γεγονός που απαιτείται για την εξασφάλιση

της μολυσματικότητας του ιού. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο τύπων σωματιδίων είναι ο αριθμός των παρατηρούμενων αιχμών, πιθανότατα λόγω αναδιάταξης των προεξοχών που βρίσκονται γύρω από τις πενταπλές κορυφές των βιρίων που έχουν υποστεί επεξεργασία με θρυψίνη.

### 3.3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΒΙΡΙΟΥ

Τα σωματίδια του αστροϊού αποτελούνται από το γονιδίωμα του ιού το οποίο περιβάλλεται από ένα εικοσαεδρικό καψίδιο. Το καψίδιο σχηματίζεται από μία απλή πρωτεΐνη 70 έως 90 kd ή από τουλάχιστον τρεις πρωτεΐνες μεταξύ 25 έως 34 kd, ανάλογα με την έκταση της πρωτεολυτικής επεξεργασίας του βιρίου [488–490]. Τα εξωκυτταρικά ιικά σωματίδια, που απελευθερώνονται από κύτταρα που είναι μολυσμένα με HAstV-8, αποτελούνται από την πρωτεΐνη VP70. Η VP70 προκύπτει μετά από την ενδοκυτταρική επεξεργασία της VP90, δηλαδή του πρωτογενούς πρωτεϊνικού προϊόντος που κωδικοποιείται από το ORF2 [491]. Τα πλήρως μολυσματικά σωματίδια που λαμβάνονται μετά από εξαντλητική επεξεργασία του ιού με θρυψίνη αποτελούνται από τρεις πρωτεΐνες, με εύρος 32-34, 27-29 και 25-26 kd, ανάλογα με το στέλεχος του ιού, με τις δύο τελευταίες πρωτεΐνες να παρουσιάζουν αλληλεπικάλυψη στην αλληλουχία τους [489,490]. Έτσι, στα σωματίδια του HAstV μπορούν να βρεθούν πρωτεΐνες διαφορετικού μεγέθους (μεταξύ 24 και 90 kd) που πιθανώς αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα τελικής και ενδιάμεσης διάσπασης [488]. Το μέγεθος μερικών από τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται σε ιούς του ζώων είναι παρόμοιο με εκείνο των πρωτεϊνών που βρίσκονται στα ανθρώπινα στελέχη. Έτσι, ο PAstV περιέχει πρωτεΐνες των 31, 30 και 36 kd, [492] και ο OAstV περιέχει δύο πρωτεΐνες περίπου 33 kd 58. Ωστόσο, ο PAstV περιέχει επίσης πρωτεΐνες των 39 και 13 kd, [492] που συνήθως δεν ανιχνεύονται σε ώριμα σωματίδια του HAstV. Υπάρχει μια μεμονωμένη αναφορά ότι τα σωματίδια του HAstV μπορεί να περιέχουν μια μικρή πρωτεΐνη των 5.2kd, αλλά η φύση της δεν έχει εξακριβωθεί [493].

Επιπλέον των πρωτεϊνών που προέρχονται από το ORF2, έχει προταθεί ότι στα ιικά σωματίδια υπάρχουν επίσης πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το ORF1a, καθώς τα αντισώματα έναντι των σωματιδίων HAstV-1 αναγνωρίζουν μια ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που περιέχει τα αμινοξέα 757 έως 899 της nsp1a [494].

### 3.4. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Οι αστροϊοί έχουν γονιδίωμα ssRNA θετικής πολικότητας που ποικίλει σε μήκος από 6.17 kb για το ανθρώπινο στέλεχος MLB-133 έως 7.72 kb για το DAstV-2 [495]. Το

RNA που εξάγεται από τα σωματίδια του AstV, καθώς και το RNA που μεταγράφεται από γονιδιωματικό αντίγραφο πλήρους μήκους συμπληρωματικού κλώνου DNA (cDNA), είναι ικανό, αν και με διαφορετική αποτελεσματικότητα, να προκαλέσει παραγωγική μόλυνση σε κυτταροκαλλιέργειες [496]. Το ιικό γονιδίωμα περιλαμβάνει μη μεταφράσιμες περιοχές (UTRs) στο 5' και 3' άκρο και τρία ORFs μεταβλητού μήκους στα διαφορετικά στελέχη. Τα δύο ORFs που βρίσκονται προς το 5' άκρο του γονιδιώματος, που ονομάζονται ORF1a και ORF1b, κωδικοποιούν μη δομικές πρωτεΐνες οι οποίες με βάση τα μοτίβα αλληλουχίας που περιέχουν, θεωρείται ότι εμπλέκονται στη μεταγραφή και στην αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού. Η μεταβολή του μήκους του ORF1a του HAstV οφείλεται κυρίως σε εισαγωγές ή διαγραφές που υπάρχουν κοντά στο 3' άκρο του ORF1a [497,498]. Το τρίτο ORF, που βρέθηκε στο 3' άκρο του γονιδιώματος και ονομάζεται ORF2, κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη του καψιδίου. Τα ORF1a και ORF1b αλληλεπικαλύπτονται σε 10 έως 148 νουκλεοτίδια (nt) στο γονιδίωμα των ιών των θηλαστικών και μεταξύ 10 και 45 nt στους ιούς των πτηνών. Η περιοχή αλληλεπικάλυψης περιέχει ένα απαραίτητο σήμα για τη μετάφραση της RNA πολυμεράσης του ιού (που κωδικοποιείται από το ORF1b) [480].

Σε κύτταρα μολυσμένα με αστροϊό έχουν ταυτοποιηθεί δύο είδη RNA θετικής πολικότητας, το γονιδιωματικό RNA πλήρους μήκους (gRNA) και το υπογονιδιωματικό RNA (sgRNA) μεγέθους περίπου 2.4 kb [499]. Με βάση τη θέση έναρξης της μεταγραφής που προσδιορίστηκε για το sgRNA στους HAstV-1 και HAstV-2, [500,501], τα ORF1b και ORF2 αλληλοεπικαλύπτονται σε 8 nt. Ωστόσο, το μήκος αυτής της αλληλεπικάλυψης μπορεί να ποικίλει ενώ δεν έχει εντοπιστεί στον DAstV [495]. Η εξαιρετικά συντηρημένη αλληλουχία γύρω από το κωδικόνιο έναρξης του ORF2 έχει προταθεί ότι είναι τμήμα του προαγωγού μορίου για τη σύνθεση του sgRNA [502]. Ωστόσο, αυτή η περιοχή διαφέρει ως προς το μήκος και την αλληλουχία μεταξύ των ιών των θηλαστικών και των πτηνών. Μοιάζει αρκετά κατά ένα μέρος με το 5' άκρο του gRNA, υποδεικνύοντας ότι έχει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση τόσο του gRNA όσο και του sgRNA. Η γονιδιακή ανάλυση του ανασυνδυασμένου AstV που απομονώθηκε από διαφορετικά είδη, έχει αναδείξει τη σημασία αυτής της περιοχής για τον ανασυνδυασμό [485,503,504]. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα τελευταία 19 nt του ORF2 και το γειτονικό 3'-UTR είναι πολύ συντηρημένες περιοχές στους περισσότερους AstV και έχουν παρατηρηθεί ομοιότητες στην αλληλουχία και στην αναδίπλωση του 3'-UTR με ιούς άλλων οικογενειών, όπως ο ιός της λοιμώδους βρογχίτιδας των πτηνών (κοροναϊός), ο νοροϊός του σκύλου και ο ορότυπος 2 του ρινοϊού των ιπποειδών (πικροναϊός), [482,505] υποδηλώνοντας ότι είναι σχετικός με την αντιγραφή του γονιδιώματος του αστροϊού.

### 3.4.1. ORF1a και ORF1b

Στους περισσότερους ιούς των θηλαστικών, το πολυπεπτίδιο που κωδικοποιείται από το ORF1a (nsp1a) είναι 874 έως 936 αμινοξέα (aa) σε μήκος. Παρ'όλα αυτά, το μήκος του παρουσιάζει διακύμανση μεταξύ των διαφορετικών ιών καθώς μπορεί να κυμαίνεται από 787 aa σε ένα ανθρώπινο στέλεχος μέχρι και 1.240 aa όπως στους ιούς των πτηνών. Το ORF1b κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο από 515 έως 539 aa το οποίο περιέχει μοτίβα για την RdRp [480,506]. Στο γονιδίωμα του αστροϊού δεν έχουν ταυτοποιηθεί περιοχές που θα μπορούσαν ενδεχομένως να κωδικοποιούν την RNA ελικάση και την μεθυλοτρανσφεράση. Δεδομένης της υποθετικής ύπαρξης μιας VPg, η απουσία της μεθυλοτρανσφεράσης είναι κατανοητή. Ωστόσο, η απουσία μιας RNA ελικάσης είναι ασυνήθιστη για έναν ιό RNA θετικής πολικότητας με μήκος γονιδιώματος μεγαλύτερο από 6.000 nt, όπως ο αστροϊός. Το αμινοτελικό άκρο του nsp1a δείχνει ομοιότητα με ένα μοτίβο σύνδεσης NTP ορισμένων ελικάσων<sup>3</sup> αλλά στερείται άλλων μοτίβων, όπως οι τομείς δεσμεύσεως υποστρώματος και υδρόλυσης NTP που υπάρχουν σε αυτά τα ένζυμα [507].

### 3.4.2. ORF2

Η μεγαλύτερη ποικιλομορφία ως προς την αλληλουχία του γονιδιώματος του αστροϊού βρίσκεται στο ORF2, το οποίο κωδικοποιεί τη δομική πολυπρωτεΐνη του ιού. Αυτό το πολυπεπτίδιο κυμαίνεται από 672 έως 851 aa σε μήκος στον TastV-1 και σε ένα στέλεχος χοίρου, αντίστοιχα. Γενικά, το ORF2 των ιών των πτηνών κωδικοποιεί πολυπρωτεΐνες μικρότερες σε μήκος. Ο μισός N-τερματικός τομέας της πολυπρωτεΐνης είναι πιο συντηρημένος σε σχέση με τον C-τερματικό τομέα. Περιλαμβάνει μια συντηρημένη περιοχή μεταξύ των αστροϊών, [508,509] και θεωρείται ότι αλληλεπιδρά με το γονιδιωματικό RNA στο βίριο [510]. Από την άλλη πλευρά, το μισό C-τερματικό της πρωτεΐνης παρουσιάζει σημαντική ποικιλομορφία ως προς την αλληλουχία μεταξύ των αστροϊών που έχουν απομονωθεί από διαφορετικά είδη, ακόμη και μεταξύ διαφορετικών στελεχών από τα ίδια ζωικά είδη. Η ακολουθία αυτής της περιοχής ορίζει τους ορότυπους στον HAstV. Επίσης στο μισό καρβοξύ της πρωτεΐνης του καψιδίου υπάρχει μια περιοχή με άφθονες εισαγωγές ή διαγραφές μεταξύ των διαφόρων αστροϊών [509]. Τα τελευταία πέντε κατάλοιπα αμινοξέων στο C-τερματικό άκρο είναι συντηρημένα, ιδιαίτερα μεταξύ στελεχών των ανθρώπων και ορισμένων άλλων στελεχών θηλαστικών. Η συντηρημένη περιοχή της δομικής πρωτεΐνης σχηματίζει τον καψιδικό πυρήνα του σωματιδίου, ενώ ο υπερμεταβλητός τομέας του C-τερματικού σχηματίζει τις αιχμές του βιρίου. Έτσι, αυτός ο τομέας συμμετέχει στις αρχικές αλληλεπιδράσεις του ιού με το κύτταρο ξενιστή [511].

Σε όλους τους ιούς HAstV και μερικούς άλλους ιούς θηλαστικών έχει περιγραφεί η παρουσία ενός εναλλακτικού ORF (ονομαζόμενο ORF-X) από 91 έως 122 κωδικόνια που επικαλύπτει το ORF2 [512]. Το κωδικόνιο έναρξης του, που βρίσκεται συνήθως 41-50 nt μετά το AUG του ORF2 και είναι τοποθετημένο σε μια καλύτερη ακολουθία του Kozak από εκείνη του ORF2. Απομένει να καθοριστεί εάν το ORFX μεταφράζεται πραγματικά και, αν μεταφράζεται, ποια είναι η σημασία του για την αντιγραφή του ιού.

### 3.5. ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ

#### 3.5.1. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΚΑΙ ΕΙΣΟΔΟΣ

Οι μελέτες που αφορούν στην κατανόηση των αρχικών αλληλεπιδράσεων των αστροϊών με τα κύτταρα ξενιστές τους είναι περιορισμένες. Ωστόσο, υπάρχει μια γενική άποψη του κύκλου αντιγραφής. Τα μόρια του υποδοχέα του κυττάρου για αυτούς τους ιούς δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα. Τα διαφορετικά στελέχη του HAstV παρουσιάζουν διαφορετικό τροπισμό σε καλλιεργημένα κύτταρα [513]. Επομένως, είναι πιθανό οι αρχικές αλληλεπιδράσεις τους με τα κύτταρα ξενιστές να είναι διαφορετικές.

Η μολυσματικότητα των ανθρώπινων αστροϊών ενισχύεται σε μεγάλο βαθμό (3 έως 5 λογαρίθμους) και πιθανόν απαιτεί την επεξεργασία των σωματιδίων του ιού με θρυψίνη [489,490,514]. Αν και η πρωτεολυτική οδός της επεξεργασίας της VP70 που υπάρχει στο βίριο έχει διαλευκανθεί για τον HAstV-8, [490] ο μηχανισμός με τον οποίο αυτή η επεξεργασία ενισχύει τη μολυσματικότητα του ιού είναι ακόμα άγνωστος. Η διάσπαση της πρόδρομης πολυπρωτεΐνης με θρυψίνη προκαλεί δραστικές δομικές μεταβολές στα σωματίδια 8 και οδηγεί στην παραγωγή τριών προϊόντων στον HAstV-8, τις VP34, VP25 και VP27. Η VP34 αντιπροσωπεύει την συντηρημένη περιοχή και σχηματίζει τον πυρήνα του καψιδίου, ενώ αμφότερες οι VP25 και VP27 σχηματίζουν τις αιχμές στην επιφάνεια του βιρίου. Παρά την μεγάλη ποικιλομορφία της, η VP25 περιέχει δύο συντηρημένα δομικά μοτίβα τα οποία έχει προταθεί ότι εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του ιού με το κύτταρο ξενιστή, ένα εκ των οποίων περιλαμβάνει τα κατάλοιπα Lys455, Ser554, Thr575 και Glu610, που προβλέπεται ότι αλληλεπιδρούν με τμήματα ολιγοσακχαριτών που θα μπορούσαν να δράσουν ως υποδοχείς κυττάρων ή συν-υποδοχείς. Τα αντισώματα που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες VP25 και VP27 των αιχμών, είναι εξουδετερωτικά, [489,514] και πιθανώς παρεμποδίζουν την προσρόφηση του ιού.



Οι αρχικές μελέτες για την είσοδο του HAstV στα κύτταρα HEK-293 Graham με τη χρήση παραγόντων αποκλεισμού της ενδοκυττάρωσης (χλωριούχο αμμώνιο, μεθυλαμίνη και δανσυλκαδαβερίνη), έδειξαν ότι η είσοδος του ιού στα κύτταρα γίνεται μέσω ενδοκυττάρωσης [515]. Πρόσφατα, επιβεβαιώθηκε ότι η εξαρτώμενη από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωση είναι μια λειτουργική οδός για την είσοδο του HAstV-8 σε κύτταρα Caco-2.

Η αλληλεπίδραση του HAstV με το κύτταρο ξενιστή προκαλεί την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης ERK1 / 2 εντός των πρώτων 15 λεπτών μετά την προσρόφηση του ιού [516]. Αν και ο μηχανισμός αυτής της ενεργοποίησης είναι άγνωστος, ήταν ανεξάρτητος από την αντιγραφή του ιού, υποδηλώνοντας ότι αυτή η οδός ενεργοποιείται κατά τη δέσμευση ή την εισαγωγή του ιού στο κύτταρο. Συνεπώς, φαίνεται ότι η ERK1 / 2 απαιτείται σε πρώιμους χρόνους για την επίτευξη παραγωγικής μόλυνσης, αφού οι αναστολές αυτής της κινάσης παρεμπόδισαν τη σύνθεση των πρωτεϊνών του ιού και του RNA και, κατά συνέπεια, την μειωμένη απόδοση του ιού.

### 3.5.2. ΑΠΕΚΔΥΣΗ

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου απελευθερώνεται το ιικό γονιδιωματικό RNA από το μολυσματικό σωματίδιο του ιού στο κυτταρόπλασμα για μετάφραση, η κυτταρική θέση όπου εμφανίζεται και οι κυτταρικοί και ιικοί παράγοντες που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία είναι άγνωστοι.

### 3.5.3. ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Κατά τη μόλυνση με HAstV, δεν παρατηρούνται ανιχνεύσιμες αλλαγές στην πρωτεϊνική σύνθεση του κυττάρου. Όπως και τα περισσότερα κυτταρικά mRNAs, το RNA του αστροϊού περιέχει μια polyA ουρά στο 3' άκρο, αλλά δεν έχει περιγραφεί η παρουσία δομής καλύμματος στο 5' άκρο. Επειδή προτείνεται ότι από το ORF1a του αστροϊού κωδικοποιείται μια VPg, αυτή η πρωτεΐνη θα μπορούσε να ρυθμίζει τη μετάφραση των ιικών mRNAs μέσω αλληλεπίδρασης με τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης [517,518].

### 3.5.4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΗ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μετά την απέκδυση, το gRNA μεταφράζεται σε μη δομικές πρωτεΐνες που παράγονται ως πρόδρομοι πολυπρωτεϊνών και στη συνέχεια μετατρέπονται σε

πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους μέσω πρωτεόλυσης. Το ORF1a κατευθύνει τη σύνθεση της πρωτεΐνης nsP1a (περίπου 100kd), ενώ η πρωτεΐνη nsP1ab (160 kd) προέρχεται και από το ORF1a και από το ORF1b. Οι πρωτεΐνες nsP1a και nsP1ab επεξεργάζονται συν-μεταφραστικά στο αμινοτερματικό τους άκρο, με αποτέλεσμα οι αναμενόμενες πρωτεΐνες πλήρους μήκους να μην παρατηρούνται ή να παρατηρούνται πολύ σπάνια σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί με HAstV. Οι πληροφορίες σχετικά με την επεξεργασία των μη δομικών πολυπρωτεϊνών έχουν ληφθεί μετά από *in vitro* μετάφραση, παροδική έκφραση κλώνων cDNA και ανάλυση κυττάρων που έχουν μολυνθεί με HAstV, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι διαφορετικών περιοχών των nsP1a και nsP1ab [519–522]. Κατά την *in vitro* μετάφραση των προερχόμενων από cDNA μεταγραφών, δεν παρατηρήθηκε καμία ειδική επεξεργασία, υποδεικνύοντας ότι είναι αναγκαία η παρουσία κυτταρικών παραγόντων. Η μετάφραση της RdRp λαμβάνει χώρα μέσω ενός μηχανισμού μετατόπισης πλαισίου ριβοσώματος-1 στην επικαλυπτόμενη περιοχή μεταξύ του ORF1a και του ORF1b. Το σήμα που ρυθμίζει αυτό το συμβάν έχει δύο βασικά χαρακτηριστικά, που είναι συντηρημένα μεταξύ όλων των αστροϊών: μία επταμερική αλληλουχία (AAAAAAC) και τη δυνατότητα σχηματισμού μιας δομής stem-loop στο τέλος [523].

Οι πρωτεΐνες των 27, 20, 19, 6.5 και 5.5 kd, καθώς και τα φωσφορυλιωμένα πολυπεπίδια 21 έως 27 kd, αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα επεξεργασίας της πολυπρωτεΐνης nsP1a, ενώ η πρωτεΐνη 57 έως 59 kd αντιπροσωπεύει την ώριμη πρωτεΐνη που προέρχεται από ORF1b. Οι παρατηρούμενες πρωτεΐνες των 145, 88, 85, 75 και 34 kd πιθανότατα αντιπροσωπεύουν ενδιάμεσα προϊόντα της επεξεργασίας της μη δομικής πρωτεΐνης. Με την εξαίρεση της διάσπασης που απελευθερώνει το 20 kd αμινοτερματικό πολυπεπίδιο, όλες οι άλλες διασπάσεις στις πολυπρωτεΐνες nsP1a και nsP1ab πιστεύεται ότι εξαρτώνται από τη δράση της ν-Pro, αν και μόνο αυτές που αναγνωρίζονται στα κατάλοιπα αμινοξέων 410 και 651 του nsP1a έχουν επιβεβαιωθεί [519].

### 3.5.5. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι δομικές πρωτεΐνες του HAstV, που κωδικοποιούνται από το ORF2, συντίθενται από το sgRNA ως πρόδρομο μόριο πολυπρωτεΐνης 87 έως 90 kd. Μελέτες με τον HAstV-8 έδειξαν ότι το πρωτογενές προϊόν μετάφρασης μεγέθους 90kd διασπάστηκε για να δώσει ένα προϊόν 70 kd (ονομαζόμενο VP70) 7 μέσω ενδιάμεσων ενώσεων των 75 έως 85 kd, 94 των οποίων η βιολογική σχέση, αν υπάρχει, είναι άγνωστη. Η επεξεργασία της VP90 σε VP70 γίνεται μέσω κυτταρικών ενζύμων (caspases) που εμπλέκονται στις αποπτωτικές διεργασίες 7 και των οποίων η δράση ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της ιογενούς μόλυνσης από έναν άγνωστο μηχανισμό [524,525].

Ο αναστολέας Z-VAD-fmk όλων των κασπασών αναστέλλει έντονα αυτή την επεξεργασία ενώ οι ειδικοί αναστολείς της δραστηριότητας της κασπάσης την εμποδίζουν κατά ένα μέρος. Αντίθετα, μερικοί προαποπτωτικοί παράγοντες (π.χ. TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL και η σταυροσπορίνη) ενισχύουν τη διάσπαση της VP90 σε VP70 [491]. Πιστεύεται ότι οι κασπάσες είναι σημαντικές για την επεξεργασία της δομικής πρόδρομης πολυπρωτεΐνης στους περισσότερους, αν όχι σε όλους, τους αστροϊούς, αφού τα μοτίβα αναγνώρισης κασπάσης που υπάρχουν στην καρβοξυτερματική περιοχή της VP90 είναι εξαιρετικά συντηρημένα μεταξύ των διαφόρων στελεχών. Για τον HAstV-8, η κασπάση-3 και η κασπάση-9 φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την επεξεργασία της VP90. Ωστόσο, άλλες κασπάσες μπορεί επίσης να εμπλέκονται, καθώς η VP90 είναι υπόστρωμα κασπάσης-8 και κασπάσης-4 *in vitro* [524]. Επίσης, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι διαφορετικές κασπάσες είναι υπεύθυνες για τη διάσπαση της VP90 σε διαφορετικά στελέχη αστροϊού, καθώς τα μοτίβα που αναγνωρίζονται από τις κασπάσες σε αυτήν την πρόδρομη πρωτεΐνη διαφέρουν μεταξύ των ιών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η επεξεργασία της VP90 σε VP70 είναι σημαντική για την έξοδο του ιού από μολυσμένα κύτταρα [524,526].

Τα εξωκυτταρικά σωματίδια του HAstV-8 που σχηματίζονται από την VP70 είναι ασθενώς μολυσματικά, αλλά η μολυσματικότητά τους ενισχύεται σημαντικά με την επεξεργασία των ιικών σωματιδίων με θρυψίνη, [490,514] που υπάρχει στον εντερικό αυλό. Η πρωτεΐνη VP70 που υπάρχει στο εξωκυτταρικό βίριο διασπάται αρχικά για να δώσει πολυπεπίδια 41kd (VP41, το N-τερματικό προϊόν) και 28kd (VP28, το C-τερματικό προϊόν). Η VP41 στη συνέχεια διασπάται στο καρβοξυτελικό της άκρο για να δώσει μια ώριμη πρωτεΐνη 34 kd (VP34), ενώ η VP28 διασπάται σε προϊόντα 27 και 25kd (VP27 και VP25, αντίστοιχα) που μοιράζονται το καρβοξυτελικό τους άκρο. Έτσι, ο πλήρως μολυσματικός ιός αποτελείται από τις VP34, VP27 και VP25.

Οι VP25 και VP27 (ή VP26 και VP29 στον HAstV-2) αναγνωρίζονται από εξουδετερωτικά αντισώματα, [489,527] ενώ η VP34 (VP32 στον HAstV-2) περιέχει επίτοπους που επιτρέπουν τη διασταυρούμενη αντίδραση και έχουν χρησιμοποιηθεί για διάγνωση [528]. Αν και δεν έχει εξεταστεί, η μολυσματικότητα άλλων αστροϊών μπορεί επίσης να εξαρτάται από την επεξεργασία με θρυψίνη, εφόσον οι θέσεις που είναι ευαίσθητες στη διάσπαση με θρυψίνη, είναι συντηρημένες στην πρωτεΐνη του καψιδίου των ιών των πτηνών και των θηλαστικών.

### 3.5.6. ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ / ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ

Η σύνθεση του RNA του αστροϊού έχει μελετηθεί ελάχιστα. Δεδομένης της δομής και της οργάνωσης του γονιδιώματος του αστροϊού, πιστεύεται ότι αυτοί οι ιοί ακολουθούν μια στρατηγική παρόμοια με εκείνη των αλφαϊών για την αντιγραφή και τη μεταγραφή του γονιδιώματός τους [529]. Με βάση αυτή την υπόθεση, το gRNA θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός πλήρους γονιδιώματος αρνητικής πολικότητας, gRNA (-), το οποίο με τη σειρά του θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την παραγωγή τόσο του πλήρους μήκους gRNA όσο και του sgRNA. Αυτά τα μόρια RNA θετικής πολικότητας αρχικά παρατηρούνται σε κύτταρα Caco-2 μολυσμένα με HAstV-8 στις 8 ώρες μετά τη μόλυνση, υποδεικνύοντας ότι αυτή τη στιγμή το gRNA (-) έχει ήδη συντεθεί, αν και σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Σε μια διαφορετική μελέτη το gRNA (-) ανιχνεύθηκε ξεκινώντας από τις 9 ώρες μετά τη μόλυνση και συσσωρεύτηκε στο 0,7% έως 4% του gRNA [530]. Παρόμοια με τον αλφαϊό, πιστεύεται ότι η μεταγραφάση του ιού αναγνωρίζει ένα cis-στοιχείο που δρα ως υποκινητής στο gRNA (-) για τη σύνθεση του sgRNA, το οποίο στην περίπτωση του HAstV μπορεί να φθάσει σε πέντε με δέκα φορές υψηλότερη μοριακή αφθονία σε σχέση με το πλήρες μήκος του gRNA [499]. Μια αλληλουχία που βρίσκεται γύρω από το κωδικόνιο έναρξης του ORF2 που είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των περισσότερων γνωστών αστροϊών, μπορεί να αντιπροσωπεύει αυτόν τον υποκινητή.

Η σύνθεση του gRNA (-) και η συσσώρευση του gRNA απαιτούν τη σύνθεση κυτταρικής πρωτεΐνης, αλλά όχι την κυτταρική μεταγραφή του DNA.[530] Τα v-Pro, RdRp, VP90, gRNA (-) και τα ιικά σωματίδια έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με εσωτερικές κυτταρικές μεμβράνες. Αυτό υποδηλώνει ότι η αντιγραφή του RNA και τα πρώτα στάδια μορφογένεσης διεξάγονται σε σχέση με τις παρατηρούμενες μεμβρανώδεις δομές που πιθανώς προέρχονται από το ER, αφού οι ιικές φωσφοπρωτεΐνες των 21 έως 27kd, οι οποίες αλληλεπιδρούν με την RdRp, [531] και είναι πιθανόν εμπλεκόμενες στην αντιγραφή του RNA, εντοπίζονται σε αυτό το οργανίδιο [532]. Εκτός από τα v-Pro και RdRp, καμία άλλη λειτουργία δεν έχει αποδοθεί στα υπόλοιπα προϊόντα των ORF1a και ORF1b.

### 3.5.7. ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ

Η έκφραση του ORF2 σε καλλιεργημένα κύτταρα χρησιμοποιώντας ως φορείς τον ανασυνδυασμένο ιό της δαμαλίτιδας [533] ή τον βακουλοϊό [534], οδηγεί στη συγκρότηση ιικών σωματιδίων που μοιάζουν με ιούς, υποδεικνύοντας ότι η κωδικοποιημένη πρωτεΐνη είναι ικανή να συντεθεί απουσία ιικού RNA. Ωστόσο, αυτά τα σωματίδια είναι ασταθή και εμφανίζουν άτυπη μορφολογία, υποδεικνύοντας ελαττωματική συγκρότηση [534,535].

Η συγκρότηση του ιού ανέχεται κάποια διαγραφή ή αλλαγές στα 70 N-τερματικά βασικά αμινοξέα της VP90 / VP70, τα οποία πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν με το gRNA στα ιικά σωματίδια. Για παράδειγμα, η μολυσματικότητα ενός ανασυνδυασμένου ιού μειώθηκε περίπου κατά 50% όταν τα υπόλοιπα 11 έως 30 αα αντικαταστάθηκαν από 8 ή 9 αα μίας ξένης αλληλουχίας. Αντιθέτως, οι ιοί που φέρουν την ίδια ξένη αλληλουχία στη θέση των υπολοίπων 31 έως 50 αα της καψιδικής πρωτεΐνης, έδειξαν δραστική μείωση στο 0,1% της μολυσματικότητας. Η αντικατάσταση του 5' άκρου του C-τερματικού αα του ORF2 ήταν επίσης πολύ επιβλαβής για τη μολυσματικότητα του ιού [510].

Μια θανατηφόρα μονοσημειακή μετάλλαξη περιγράφηκε στη VP34 του HAstV-1 (Thr-227 σε Ala ή Ser), [536]. Ωστόσο, δεν μελετήθηκε αν το ελάττωμα της μολυσματικότητας οφειλόταν σε ελαττωματική συγκρότηση.

Το πρωτογενές προϊόν του ORF2 του HAstV-8, η VP90, σχηματίζει ενδοκυτταρικά σωματίδια τα οποία σχετίζονται με μεμβράνες ή με το κυτοσόλιο. Προφανώς, η VP90 συγκροτείται σε σωματίδια που συνδέονται με μεμβρανώδεις δομές, όπου οι μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού και το γονιδίωμα RNA θετικής και αρνητικής πολικότητας είναι επίσης παρόντα [526]. Επομένως, η αντιγραφή του RNA θεωρείται ότι συμβαίνει και σχετίζεται με αυτές τις δομές. Πιστεύεται ότι η αναδιάταξη των εσωτερικών μεμβρανών επάγεται από τη μόλυνση με τον AstV, καθώς παρατηρείται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου σε αρνιά που έχουν μολυνθεί με OAstV αλλά όχι σε μη μολυσμένα κύτταρα [537].

Η μόλυνση με HAstV επάγει την ενεργοποίηση των κασπασών στα κύτταρα Caco2 μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού. Η δραστηριότητα του εκκνηκτικών (caspase 8, 9, και 4), και των εκτελεστικών (κασπάσες 3 και 7) κασπασών ανιχνεύεται στις 12 ώρες μετά τη μόλυνση. Στις 12 ώρες μετά τη μόλυνση ανιχνεύονται επίσης αποπτωτικοί δείκτες αν και ο κυτταρικός θάνατος δεν παρατηρείται μέχρι τις 48 ώρες μετά τη μόλυνση [524].

Η πρωτεολυτική επεξεργασία από κασπάσες της VP90 που έχει συγκροτηθεί σε ιικά σωματίδια, για να δώσει VP70, απαιτείται για την έξοδο του ιού από τα κύτταρα, καθώς οι αναστολείς αυτών των πρωτεασών το αποτρέπουν, ενώ προωθείται από προ-αποπτωτικούς παράγοντες, όπως το TRAIL [491]. Πιστεύεται ότι μετά την αρχική συναρμολόγησή τους όπου συνδέονται με μεμβράνες, τα ιικά σωματίδια που σχηματίζονται από την VP90 διαχωρίζονται από αυτές τις δομές, έτσι ώστε να είναι διαθέσιμα για διάσπαση από κασπάσες [526]. Εκτός από το ρόλο της στη διάσπαση του VP90 σε VP70, η Cap-3 φαίνεται να είναι αναγκαία για την έξοδο του ιού από το κύτταρο [524]. Η κυτταρική διαδικασία που προκαλείται από αυτή την κασπάση για να επιτραπεί η έξοδος του ιού δεν είναι γνωστή. Ωστόσο, δεν φαίνεται να είναι απαραίτητος ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από την Cap-3. Έτσι, ένας μη

ελλειμματικός μηχανισμός φαίνεται να εμπλέκεται στην απελευθέρωση του HAstV. Από την άλλη πλευρά, παρατηρήθηκε κυτταροπαθογόνος δράση μετά από μόλυνση με στελέχη αστροϊών χοίρων [492] και κοτόπουλου [516]. Επομένως, περισσότεροι από ένας μηχανισμοί μπορεί να εμπλέκονται στην έξοδο των αστροϊών από το κύτταρο.

### 3.6. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Ως παθογόνος παράγοντας του γαστρεντερικού συστήματος, η μετάδοση του HAstV γίνεται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού όπως αναδείχθηκε σε μελέτες εθελοντών. Παρ'όλα αυτά, η μετάδοση μπορεί επίσης να γίνει από άνθρωπο σε άνθρωπο όπως όπως διαπιστώθηκε σε μια έξαρση κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας στην Καλιφόρνια [538]. Η νόσος στους ενήλικες μπορεί επίσης να οφείλεται από έκθεση σε μεγαλύτερη δόση αστροϊού ή σε μικροσταγονίδια και μολυσμένα τρόφιμα ή νερό [539,540].

Οι αστροϊοί των θηλαστικών προσβάλλουν κυρίως τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Οι ιστοπαθολογικές εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν σε ένα ανοσοκατεσταλμένο παιδί που ήταν μόνιμα μολυσμένο και παρουσίαζε έντονη διάρροια, έδειξαν ότι η μόλυνση από τον αστροϊό περιοριζόταν στο λεπτό έντερο. Η μόλυνση περιελάμβανε τα ώριμα επιθηλιακά κύτταρα κοντά στις κορυφές των μικρολαχνών και ήταν πιο εκτεταμένη στη νήσιτιδα σε σχέση με το δωδεκαδάκτυλο, αλλά δεν επεκτεινόταν στο στομάχι [541].

Οι μορφολογικές αλλοιώσεις στο έντερο έδειξαν ότι, παρά την έντονη διάρροια, δεν υπάρχει φλεγμονώδης αντίδραση. Μελέτες με άλλους αστροϊούς των θηλαστικών έδειξαν ότι ο AstV μπορεί να μολύνει επιθηλιακά κύτταρα (OAstV και BOAstV) καθώς και υποεπιθηλιακά μακροφάγα (OAstV) και M κύτταρα (BOAstV) του λεπτού εντέρου [542,543]. Τα σωματίδια OAstV παρατηρήθηκαν σε κενοτόπια των εντεροκυττάρων, παρόμοια με εκείνα που βρέθηκαν κατά τη μόλυνση καλλιεργημένων κυττάρων με τον HAstV. Η μόλυνση με OAstV οδήγησε σε διάρροια στις ημέρες 2 έως 4 μετά τη μόλυνση και σε παροδική ατροφία των λαχνών και υπερτροφία της κρύπτης [537]. Παρόλο που ο BOAstV θεωρήθηκε μη παθογόνος επειδή δεν προκάλεσε διάρροια σε γνωστοβιοτικά ζώα, μετά από μόλυνση με αυτόν τον ιό παρατηρήθηκαν φλεγμονώδη μονοπύρνα κύτταρα πάνω από τις λάχνες του θόλου. Επιπρόσθετα, ο συνδετικός ιστός της μεμβράνης του βλενογόνου διηθήθηκε με ουδετερόφιλα και περιείχε κύτταρα με εκφυλισμένους πυρήνες. Στην κεντρική περιοχή των βλαστικών κέντρων, κάτω από τις μολυσμένες λάχνες του θόλου, παρατηρήθηκε καταστροφή των λεμφοειδών κυττάρων [543].

Ο αστροϊός βρέθηκε πρόσφατα ως ο μόνος παθογόνος μικροοργανισμός στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) ενός ανοσοκατεσταλμένου ασθενή ο οποίος πέθανε από εγκεφαλίτιδα [544]. Η έκφραση δομικών πρωτεϊνών εντοπίστηκε σε αστροκύτταρα, αλλά όχι σε μακροφάγα ή νευρώνες. Στο ΚΝΣ του ασθενούς βρέθηκε διήθηση από μακροφάγα και στοιχεία φλεγμονής. Ωστόσο, δεν υπήρχαν ενδείξεις μόλυνσης από αστροϊό στα δείγματα του γαστρεντερικού συστήματος που εξετάστηκαν μεταθανάτια. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ανθρώπινο στέλεχος που συσχετίστηκε με εγκεφαλίτιδα παρουσιάζει γενετική συγγένεια με ένα νέο ανθρώπινο αστροϊό που συνδέθηκε με μια έξαρση κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας (στελέχη VA1) [545] και με κοιλιοκάκη [546]. Βρέθηκε επίσης σε κόπρανα παιδιών με χαλαρή παράλυση η οποία δεν οφειλόταν σε πολιοϊό, [481] αλλά και σε ένα υγιές παιδί. Επιπλέον, με μεταγονιδιωματική ανάλυση βρέθηκε ένα στέλεχος αστροϊού στο ΚΝΣ μινκ που έπασχαν από ασθένεια του νευρικού συστήματος [547]. Σε αυτή την τελευταία περίπτωση, η μετάδοση έγινε από μολυσμένα σε υγιή ζώα με ενοφθαλμισμό ομογενοποιημάτων εγκεφάλου. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι το AstV μπορεί να προκαλέσει νόσο του νευρικού συστήματος στα θηλαστικά. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο μπορεί να φτάσει στο ΚΝΣ μετά από μόλυνση του γαστρεντερικού σωλήνα είναι άγνωστος.

Η απουσία φλεγμονής μετά από εντερική μόλυνση από αστροϊό σε ανθρώπους [541] και γαλοπούλες [548] και η ικανότητα του HAstV να επάγει απόπτωση σε κυτταροκαλλιέργεια [491,525] υποδηλώνουν ότι αυτή η μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, στην οποία δεν παρατηρείται συχνά φλεγμονή, μπορεί να συμβάλει στη γαστρεντερική νόσο. Εντούτοις, περισσότεροι από ένας μηχανισμοί μπορεί να συμμετέχουν στην πρόκληση νόσου από αυτούς τους ιούς δεδομένου ότι, για παράδειγμα, παρατηρήθηκε φλεγμονή στο ΚΝΣ κατά την μόλυνση με AstV [544]. Η φλεγμονή παρατηρήθηκε επίσης σε παιδιά που γεννήθηκαν πρόωρα με νεκρωτική εντεροκολίτιδα που σχετίζεται με HAstV, αν και στην περίπτωση αυτή δεν ήταν σαφές εάν η φλεγμονή οφειλόταν σε βακτήρια ή τη διασπορά του HAstV [549,550].

Οι δομικές πρωτεΐνες μπορεί επίσης να εμπλέκονται στην παθογένεση, καθώς η πρωτεΐνη του καψιδίου είναι ικανή να αυξήσει τη διαπερατότητα των μονοστιβάδων των επιθηλιακών κυττάρων στην καλλιέργεια [535]. Προφανώς, δεν χρειάζεται αντιγραφή του ιού για να έχει η πρωτεΐνη του καψιδίου αυτή την επίδραση, αλλά είναι πιθανόν να εμπλέκονται σήματα μεταγωγής αφού η διαπερατότητα του φραγμού αυξήθηκε σαφώς στις 20 ώρες μετά την επεξεργασία με τον αδρανοποιημένο ιό ή την καθαρισμένη πρωτεΐνη, αλλά όχι νωρίτερα.

Η πρωτεΐνη καψιδίου HAstV1 δεσμεύει την C1q και τη λεκτίνη, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση του συμπληρώματος μέσω των κλασικών οδών και των οδών λεκτίνης, αντίστοιχα. Η αλληλεπίδραση του βίριου με την C1q πιθανώς είναι συντηρημένη μεταξύ των αστροϊών, δεδομένης της υψηλής συντήρησης του συστήματος

συμπληρώματος στα ζώα καθώς και της περιοχής μέσω της οποίας η καψιδική πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τη C1q (υπολείμματα αα 79 έως 108).

### 3.7. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

Οι παράγοντες που προσδιορίζουν την ανοσολογική απόκριση έναντι των αστροϊών δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί. Η συμπτωματική μόλυνση εμφανίζεται κυρίως σε δύο ηλικιακές ομάδες, τα μικρά παιδιά και τους ηλικιωμένους ασθενείς που βρίσκονται σε ιδρύματα. Υπάρχουν έμμεσες ενδείξεις ότι τα αντισώματα έναντι του αστροϊού μπορεί να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στον περιορισμό της λοίμωξης στον ξενιστή. Η ύπαρξη ορότυπων του αστροϊού σε διαφορετικά ζωικά είδη, που ταξινομούνται κυρίως με βάση την εξουδετερωτική δράση των αντισωμάτων έναντι της περιοχής του καρβοξέος της καψιδικής πρωτεΐνης, δείχνει ότι τα αντισώματα ασκούν ανοσολογική πίεση στον ιό [551]. Η κατανομή της συμπτωματικής μόλυνσης σε ακραίες ηλικιακές ομάδες, υποδηλώνει ότι τα αντισώματα που αποκτώνται σε μικρή ηλικία παρέχουν κάποιο είδος προστασίας έναντι της νόσου κατά το μεγαλύτερο μέρος της ενήλικης ζωής και ότι η ανοσία έναντι του αστροϊού μειώνεται αργά με τον χρόνο. Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με επίμονη μόλυνση από αστροϊό, η θεραπεία με ανοσοσφαιρίνες είχε ως αποτέλεσμα την κάθαρση του ιού και την εξάλειψη της διάρροιας [552]. Ωστόσο, ο ρόλος των ειδικών για τον αστροϊό αντισωμάτων για την εξάλειψη του ιού δεν είχε προσδιοριστεί επειδή στο παρασκεύασμα ανοσοσφαιρίνης που χρησιμοποιήθηκε δεν μετρήθηκαν τα εξουδετερωτικά αντισώματα. Από την άλλη πλευρά, οι ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση μυελού των οστών και παρουσίαζαν χρόνια διάρροια, δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με ανοσοσφαιρίνες, αν και αυτό το παρασκεύασμα αποδείχθηκε ότι είχε αντισώματα για ομόλογο ορότυπο αστροϊού [553]. Έτσι, η ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία με ανοσοσφαιρίνη για την εξάλειψη του ιού μπορεί να εξαρτάται περισσότερο από επιπρόσθετους μη ειδικούς παράγοντες σε σχέση με τα ειδικά αντισώματα για τον αστροϊό.

Το φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα του βλεννογόνου μπορεί παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία από επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις με τον αστροϊό [554]. Τα T κύτταρα τα οποία αναγνωρίζουν τα αντιγόνα του αστροϊού κυρίως μέσω του ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου (HLA) βρέθηκαν στον συνδετικό ιστό του βλεννογόνου του εντέρου υγιών ενηλίκων. Αυτά τα CD4 + T κύτταρα που είναι ειδικά για τον αστροϊό όταν ενεργοποιήθηκαν, παρήγαγαν κυτοκίνες τύπου TH1, ιντερφερόνη γάμα και παράγοντα νέκρωσης όγκου.

Το σύστημα του συμπληρώματος είναι μία από τις αρχικές αποκρίσεις του ξενιστή έναντι των παθογόνων παραγόντων, και παίζει σημαντικό ρόλο τόσο για την έμφυτη



όσο και την επίκτητη ανοσία. Ο ΗΑstV θα μπορούσε να μεταβάλει μια αποτελεσματική ανοσοαπόκριση του ξενιστή μέσω της παρεμπόδισης του συστήματος συμπληρώματος [555,556]. Από την άλλη πλευρά, η δέσμευση της C1q στην πρωτεΐνη του καψιδίου που έχει ήδη συναρμολογηθεί στο βίριο, αν συμβεί, θα μπορούσε να διευκολύνει τη φαγοκυττάρωση και την εξάλειψη του ιού από τη C1q καθώς δρα ως οψονίνη.

### 3.8. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι λοιμώξεις από ΗΑstV έχουν παγκόσμια κατανομή και αφορούν κυρίως, αλλά όχι αποκλειστικά, μικρά παιδιά που παρουσιάζουν διάρροια. Σε αρκετές μελέτες οι αστροϊοί έχουν συσχετιστεί με διάρροια σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, συμπεριλαμβανομένων των ενηλίκων, [552,553,557–560] και με νεκρωτική εντεροκολίτιδα σε παιδιά που έχουν γεννηθεί πρόωρα [549,550]. Σποραδικά κρούσματα γαστρεντερίτιδας από αστροϊό έχουν αναφερθεί σε ηλικιωμένους ασθενείς [561] και σε στρατόπεδα [540]. Στην Ιαπωνία σημειώθηκαν μεγάλες εξάρσεις κρουσμάτων μετά από τροφιμογενή μετάδοση του ιού, που έπληξαν χιλιάδες άτομα, από παιδιά σχολικής ηλικίας μέχρι και ενήλικες [562]. Σε μελέτες που έγιναν σε παιδιά, σε διάφορους πληθυσμούς [563,564] έδειξαν ότι ο ΗΑstV η δεύτερη πιο σημαντική αιτία γαστρεντερίτιδας μετά τον ροταϊό. Η επίπτωση κυμαίνονταν από 4,2% έως 7,3%, αν και έχει επίσης αναφερθεί επίπτωση μικρότερη από 1%. Σπάνια έχει αναφερθεί υψηλότερη επίπτωση του ΗΑstV σε παιδιά με διάρροια, όπως σε γηγενείς πληθυσμούς της Βραζιλίας και του νοτιοανατολικού Μεξικού, με ποσοστό 56% 39 και 28%, 87 αντίστοιχα. Η κατανομή του ΗΑstV με βάση την ηλικία μπορεί να ποικίλλει, εξαρτώμενη από διάφορους παράγοντες. Ωστόσο, σε μία μελέτη που διεξήχθη στην Ισπανία, περίπου το 80% των λοιμώξεων από αστροϊούς εμφανίστηκαν σε παιδιά ηλικίας κάτω των 3 ετών [565]. Η επίπτωση του ΗΑstV σύμφωνα με την ηλικία (επεισόδια ανά έτος) που βρέθηκε σε μια μελέτη στην Αίγυπτο (0,38 για βρέφη <6 μηνών, 0,40 για βρέφη 6 έως 11 μηνών και 0,16 για παιδιά μεταξύ 12 και 23 μηνών) ήταν παρόμοια με αυτή που βρέθηκε για τον ροταϊό [566].

Οι περισσότερες λοιμώξεις από αστροϊούς ανιχνεύονται τους χειμερινούς μήνες σε εύκρατες περιοχές και σε περίοδο βροχών σε πιο τροπικά κλίματα [564,567]. Τόσο οι μολύνσεις που έχουν συμβεί στην κοινότητα όσο και οι νοσοκομειακές μολύνσεις, έχουν παρατηρηθεί κυρίως μεταξύ ανοσοκατασταλμένων ασθενών [557,558] και παιδιών που έχουν γεννηθεί πρόωρα.

Κυρίως οκτώ ορότυποι έχουν περιγραφεί να κυκλοφορούν στον πληθυσμό. Ο ορότυπος 1 του ΗΑstV είναι αυτός που αναφέρεται πιο συχνά στα παιδιά [568].

Ωστόσο, ο κυρίαρχος ορότυπος μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον χρόνο και την τοποθεσία. Έτσι, σε μια μελέτη που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο, το 72% των αστροϊών που συνδέθηκαν με λοιμώξεις μεταξύ 1975 και 1987, ανήκαν στον ορότυπο 1 [178]. Στην Αυστραλία οι ορότυποι 1, 3 και 4 περιγράφονταν σε τακτική βάση σε διάστημα 18 ετών [569]. Αντίθετα, σε μια μελέτη που έγινε στο Μεξικό και αφορούσε σε μια ομάδα παιδιών που παρουσίασαν διάρροια, διαπιστώθηκε ότι ο ορότυπος 2 (35%) ήταν ο πιο συνήθης [570]. Σε άλλη μελέτη που έγινε σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του Μεξικού, βρέθηκαν όλοι οι ορότυποι, εκτός από τον ορότυπο 5. Ο ορότυπος 8 αναφέρθηκε στην ίδια συχνότητα με τον ορότυπο 1 σε μία από τις περιοχές μελέτης [571]. Σε μελέτη που έγινε σε διάφορες περιοχές της Ινδίας, θεωρήθηκε ότι οι ανασυνδυασμένοι ιοί ήταν οι πλέον διαδεδομένοι σε παιδιά ηλικίας κάτω των 24 μηνών [572]. Οι ανασυνδυασμένοι ιοί που διαθέτουν RdRp και πρωτεΐνη καψιδίου από διαφορετικό HAstV έχουν επίσης αναγνωριστεί σε διαφορετικούς πληθυσμούς της Κένυας [504].

Οι επιδημιολογικές μελέτες για τον AstV στους ανθρώπους έχουν περιοριστεί μέχρι στιγμής στους ορότυπους 1 έως 8 του HAstV. Ωστόσο, η πρόσφατη ταυτοποίηση, με εξαιρετικά ευαίσθητες μεθόδους, νέων AstV σε ανθρώπους [87,545,573] υπογραμμίζουν την ανάγκη διερεύνησης του επιπολασμού αυτών των νέων ιών προκειμένου να προσδιοριστεί ο πραγματικός τους αντίκτυπος στη δημόσια υγεία. Άλλωστε διαπιστώθηκε ότι σχετίζονται γενετικά με ιούς των ζώων και μερικοί έχουν απομονωθεί από ασθενείς με πιο σοβαρές νόσους, όπως η εγκεφαλίτιδα. Περιορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι αυτοί οι ιοί, όπως και ο HAstV, μπορούν να έχουν παγκόσμια κατανομή στον ανθρώπινο πληθυσμό [481,574]. Δεδομένης της γενετικής σχέσης τους με τους ιούς των ζώων και της πιθανότητας μετάδοσής τους μεταξύ διαφορετικών ειδών, είναι πιθανό τα άγρια ζώα να παίζουν κάποιο ρόλο στην επιδημιολογία αυτών των ιών.

### 3.8.1. ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

Η γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από τον HAstV είναι συνήθως μια ήπια, αυτοπεριοριζόμενη νόσος που δεν απαιτεί νοσηλεία. Παρ'όλα αυτά έχει επίσης αναφερθεί σοβαρή νόσος του γαστρεντερικού που μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο [562]. Η μόλυνση από αστροϊό έχει συσχετιστεί και με άλλες παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος όπως η νόσος της κοιλιοκάκης [546] και ο εγκελευασμός, [575,576]. Επίσης, σε ένα παιδί που παρουσίαζε εγκεφαλίτιδα, ο αστροϊός ήταν ο μοναδικός παθογόνος παράγοντας που ανιχνεύθηκε στο ΚΝΣ [544]. Κατά τη διάρκεια μιας προοπτικής μελέτης σε έναν πληθυσμό βρεφών των Μάγια, στην οποία μελετήθηκε η ανοσολογική απόκριση έναντι του πολιοϊού, ο αστροϊός ήταν ο πιο κοινός παθογόνος παράγοντας του εντέρου που ανιχνεύθηκε στα δείγματα

κοπράνων που συλλέχθηκαν [577]. Στο 61% των βρεφών, ο αστροϊός ανιχνεύθηκε με ΕΙΑ σε τουλάχιστον ένα δείγμα κοπράνων κατά τη διάρκεια των 18 εβδομάδων που παρακολουθήθηκε κάθε βρέφος. Από τα 305 επεισόδια διάρροιας που αναφέρθηκαν, το 26% συσχετίστηκε με τον αστροϊό. Τα αποτελέσματα των ανοσολογικών δοκιμών (ΕΙΑ) επιβεβαιώθηκαν με RT-PCR σε ένα υποσύνολο των ΕΙΑ θετικών και αρνητικών δειγμάτων. Ο λόγος για τον υψηλό επιπολασμό μόλυνσης από αστροϊό και τον χαμηλό ρυθμός λοίμωξης από ροταϊό (4%) σε αυτήν την κοινότητα δεν είναι γνωστός, αλλά μπορεί να σχετίζεται με τη βροχόπτωση, την υγρασία ή άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Ο ΗΑstV αποδείχθηκε ότι αποτελεί σημαντική αιτία εμφάνισης εξάρσεων κρουσμάτων διάρροιας σε κέντρα φροντίδας παιδιών. Τα παιδιά ηλικίας έως 36 μηνών που βρίσκονται σε τέτοια κέντρα διατρέχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης διάρροιας [578]. Μια έρευνα 8 εξάρσεων κρουσμάτων διάρροιας από αστροϊούς σε έξι κέντρα φροντίδας παιδιών έδειξε ότι το 20% των παιδιών με διάρροια απέκκριναν τον ιό [579].

### 3.8.2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ

Τα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι τα μολυσμένα τρόφιμα αποτελούν την κύρια πηγή μόλυνσης από τον ΗΑstV. Ο ΗΑstV έχει ανιχνευθεί σε δίθυρα μαλάκια, [580] και σε νερό, συμπεριλαμβανομένου του πόσιμου νερού, τα ποτάμια, τα φράγματα, τα λύματα και τα απόβλητα από εγκαταστάσεις επεξεργασίας νερού [581–584]. Η ανάλυση της αλληλουχίας των στελεχών ΗΑstV που ανακτήθηκαν από το νερό και κλινικά δείγματα ασθενών που νοσηλεύονταν, έδειξε ότι τα στελέχη του ιού και από τις δύο προελεύσεις ήταν ταυτόσημα, επιβεβαιώνοντας ότι τα αποθέματα νερού αποτελούν μια σημαντική πηγή μόλυνσης με ΗΑstV. Στα υπόγεια ύδατα, η μολυσματικότητα του αστροϊού μπορεί να διατηρηθεί για μήνες. Άλλωστε, είναι εν μέρει ανθεκτικός στη χλωρίωση, [585] που χρησιμοποιείται ευρέως για την επεξεργασία των λυμάτων σε πολλές χώρες.

Η αναγνώριση αστροϊών στον πληθυσμό - διαφορετικών από τον ΗΑstV αλλά γενετικά συγγενών με τον AstV που απομονώθηκε από τους αρουραίους, [586] τα μινκ, [481] τα θαλάσσια θηλαστικά, [587] και τους χοίρους [482]– οδήγησε στην πρόταση ότι τα άγρια θηλαστικά θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως δεξαμενές του ανθρώπινου AstV και ότι είναι δυνατή η μετάδοση του ιού μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Η ταυτοποίηση ενός ανασυνδυασμένου ιού που περιέχει αλληλουχίες που προέρχονται από τον ΗΑstV-4 και τον CslAstV σε θαλάσσια λιοντάρια υποστηρίζει αυτή την υπόθεση [587]. Επιπλέον, έχει βρεθεί μεγάλη ποικιλία AstV σε θηλαστικά,

όπως οι νυχτερίδες [483] και οι χοίροι, [482] υποδηλώνοντας ότι η εμφάνιση νέων ιών σε ανθρώπους είναι πιθανή.

### 3.8.3. ΟΡΟΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ

Τα αντισώματα έναντι του HAstV αποκτώνται στην πρώιμη παιδική ηλικία, γεγονός που είναι σε συμφωνία με την ηλικία κυρίως κατά την οποία τα παιδιά είναι μολυσμένα. Μια έρευνα σε 87 παιδιά ηλικίας μικρότερης των 10 ετών στο Ηνωμένο Βασίλειο, έδειξε ότι ο επιπολασμός των αντισωμάτων αυξάνεται ραγδαία από 7% σε βρέφη ηλικίας 6 έως 12 μηνών στο 70% κατά τη σχολική ηλικία [588]. Η μελέτη αυτή επικεντρώθηκε στην ανίχνευση αντισωμάτων HAstV με ανοσοφθορισμό σε κύτταρα μολυσμένα με αστροϊό. Επομένως, ο επιπολασμός των αντισωμάτων έναντι του αστροϊού σε αυτόν τον πληθυσμό μπορεί να έχει υποτιμηθεί. Η παρουσία υψηλών τίτλων αντισωμάτων έναντι του HAstV στις Ηνωμένες Πολιτείες, ιδιαίτερα έναντι της πρωτεΐνης του καψιδίου του HAstV1, [553] δείχνει ότι η μόλυνση με αυτόν τον ορότυπο του HAstV είναι πολύ συχνή. Όπως αναμενόταν με βάση τον ορότυπο του HAstV που διαπιστώθηκε ότι προκαλεί λοίμωξη πιο συχνά σε διαφορετικές μελέτες, σε μία ορολογική μελέτη μεταξύ παιδιών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία σε νοσοκομείο στο Ηνωμένο Βασίλειο βρέθηκε ποσοστό οροθετικότητας 86% για τον ορότυπο 1, 1% για τον ορότυπο 2, 8% για τον ορότυπο 3 και 6% για τον ορότυπο 4 [589]. Σε ένα στρωματοποιημένο δείγμα ηλικίας από την Ολλανδία, ο οροεπιπολασμός ήταν και πάλι υψηλότερος για τον ορότυπο 1 (91%), αλλά ήταν διαφορετικός για τους άλλους ορότυπους.[590] Η διεξαγωγή μελετών για τον προσδιορισμό του οροεπιπολασμού έναντι των προσφάτως αναγνωρισμένων ανθρώπινων στελεχών -όπως τα HAstV-HMO, -MLB και -VA1- εξακολουθεί να εκκρεμεί. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες μελέτες που αφορούν στο στέλεχος του ιού τύπου HAstV-MLB που δείχνουν ότι είναι επίσης ευρέως καταναμημένα στον ανθρώπινο πληθυσμό [481,573].

### 3.9. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από τη μόλυνση με αστροϊό επηρεάζει κυρίως τα μικρά παιδιά. Ωστόσο, τα συμπτώματα μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τον πληθυσμό που μελετάται. Για παράδειγμα, στην Αργεντινή το 12,4% των ασθενών ηλικίας κάτω των 36 μηνών που είχαν μολυνθεί με HAstV παρουσίασε διάρροια, το 41,6% είχε πυρετό και το 16,6% χρειάστηκε να νοσηλευτεί [591]. Στην Αίγυπτο, η διάρροια που προκλήθηκε από HAstV σε παιδιά κάτω των 3 ετών ήταν παρόμοια με αυτή που προκλήθηκε από τον ροταϊό και στο 17% αυτών των ασθενών εμφανίστηκε σοβαρή αφυδάτωση [566]. Επιπλοκές όπως αφυδάτωση μπορεί να εμφανιστούν σε

ασθενείς με υποκείμενη γαστρεντερική νόσο, κακή θρεπτική κατάσταση και μικτή λοίμωξη [564].

Μελέτες εθελοντών σε ενήλικες έδειξαν ότι η περίοδος επώασης είναι 3 έως 4 ημέρες και η υψηλότερη αποβολή του ιού συμβαίνει την 6η ημέρα, η οποία φαίνεται να είναι ανάλογη με τη σοβαρότητα της νόσου. Η ορομετατροπή συμβαίνει την ημέρα 28 [538]. Η εκδήλωση της νόσου σε αυτούς τους ασθενείς ήταν περιορισμένη και εξαρτώμενη από τη δόση ενοφθαλμισμού. Κατά τη διάρκεια έξαρσης κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας σε νηπιαγωγείο στην Ιαπωνία, βρέθηκε ότι η περίοδος επώασης για τη δευτερογενή εξάπλωση του ιού ήταν συντομότερη, από 24 έως 36 ώρες [592]. Γενικά, η διάρροια από αστροϊό είναι ηπιότερη από αυτή που προκαλείται από τον ροταϊό και δεν οδηγεί σε σοβαρή αφυδάτωση ή νοσηλεία [567]. Η επίμονη γαστρεντερίτιδα από αστροϊό έχει συσχετιστεί με στελέχη που ανήκουν στον ορότυπο 3 [593]. Αν και σπάνια, έχουν επίσης αναφερθεί θάνατοι που συνδέονται με γαστρεντερική λοίμωξη από αστροϊό [594]. Άλλες ασθένειες του γαστρεντερικού συστήματος που συνδέονται με τον HAstV είναι ο εγκολεασμός [575,576] η νεκρωτική εντεροκολίτιδα, [549,550] ενώ πρόσφατα ο HAstV- H VA1 εντοπίστηκε σε κοιλιοκάκη [546]. Ο HAstV βρέθηκε σε 3 από τους 6 παιδιατρικούς ασθενείς (μεταξύ 4 και 7 μηνών) με ειλεοκολικό εγκολεασμό. Στους δύο παιδιατρικούς ασθενείς, ο HAstV ήταν ο μόνος παθογόνος παράγοντας που ανιχνεύθηκε ενώ ένας από αυτούς κατέληξε [575] Επίσης ήταν ο ιογενής παθογόνος παράγοντας που σχετίστηκε πιο συχνά με νεκρωτική εντεροκολίτιδα σε παιδιά που γεννιούνται πρόωρα [549].

Ο HAstV έχει βρεθεί ότι είναι η αιτία χρόνιας διάρροιας μεταξύ ανοσοκατασταλμένων ασθενών, παιδιών και ενηλίκων και σε εξάρσεις κρουσμάτων σε παιδιατρικούς ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση μυελού των οστών [553] και σε παιδιατρικές μονάδες πρωτοπαθούς ανοσοανεπάρκειας [558]. Ανάμεσα στους ιούς του γαστρεντερικού συστήματος, ο HAstV έχει βρεθεί πιο συχνά σε ασθενείς με παθήσεις του ανοσοποιητικού, όπως η ανοσοκαταστολή λόγω HIV, η συνδυασμένη ανοσοκαταστολή, η συγγενής ανοσοκαταστολή των T κυττάρων, η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, η μακροσφαιριναιμία του Waldenström, και η ανοσοκαταστολή από πολυενδοκρिनοπάθεια [552,558-560]. Οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με fludarabine, η οποία είναι γνωστό ότι καταστρέφει τα CD4 + T κύτταρα, ανέπτυξαν επίμονη διάρροια προκαλούμενη από τον HAstV [552].

Οι αστροϊοί έχουν ανιχνευθεί σε κόπρανα παιδιών με χαλαρή παράλυση που δεν οφειλόταν σε πολιοϊούς [481] και σε βιοψία του μετωπιαίου φλοιού ενός ασθενούς με X-linked ή α-γαμασφαιριναιμία που ανέπτυξε εγκεφαλίτιδα [544].

### 3.10. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

#### 3.10.1. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Οι αστροϊοί έχουν ανιχνευθεί με άμεση εξέταση δειγμάτων κοπράνων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετά από αρνητική χρώση. Η ευαισθησία αυτής της μεθόδου εκτιμάται ότι είναι  $10^6$  έως  $10^7$  σωματίδια ιού ανά γραμμάριο κοπράνων. Συνήθως, οι ασθενείς με διάρροια απεκκρίνουν μεγάλη ποσότητα ιικών σωματιδίων αστροϊού (ισοδύναμα με περίπου  $10^{10}$  ή  $10^{11}$  γονιδιώματα ιού ανά γραμμάριο κοπράνων) [497]. Ωστόσο, σε εκείνους τους ασθενείς που απεκκρίνουν μικρότερη ποσότητα ιικών σωματιδίων, η χρήση αντιϊκών αντισωμάτων για την ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία διευκολύνει την ταυτοποίηση του ιού.

#### 3.10.2. ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Οι Herrmann et al. ανέπτυξαν μια ΕΙΑ που βασίζεται σε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αντιδρά έναντι της ομάδας (8E7) που αντιστοιχεί στη συντηρημένη περιοχή της πρωτεΐνης του καψιδίου των οροτύπων 1 έως 8 του HAstV (υπολείμματα αμινοξέων 71 έως 260) για τη σύνδεση του ιικού αντιγόνου και σε ένα πολυκλωνικό αντιγόνο ως αντίσωμα ανιχνευτή [595]. Αυτή η ΕΙΑ είχε συγκρίσιμη ευαισθησία (91%) και ειδικότητα (98%) με την ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία. Η ΕΙΑ ήταν χρήσιμη για την ταχεία ανίχνευση του αντιγόνου του αστροϊού σε μελέτες στις οποίες εξετάστηκε ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπινων δειγμάτων. Ωστόσο, τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν από τον Herrmann δεν αναγνωρίζουν τα πρόσφατα ανιχνευθέντα νέα στελέχη HAstV.

#### 3.10.3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Καθώς έγιναν διαθέσιμες περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την αλληλουχία του γονιδιώματος του αστροϊού, αναπτύχθηκαν τεχνικές ανίχνευσης που χρησιμοποιούν μοριακούς ανιχνευτές και η RT – PCR. Επί του παρόντος, έχει προσδιοριστεί η πλήρης αλληλουχία γονιδιώματος αρκετών ανθρώπινων και ζωικών στελεχών AstV, καθώς και οι αλληλουχίες ORF2 από ένα μεγάλο αριθμό απομονώσεων. Η υψηλή ποικιλομορφία της αλληλουχίας που υπάρχει μεταξύ αυτών των ιών δεν επιτρέπει τη χρήση καθολικών εκκινητών για όλα τα μέλη της οικογένειας Astroviridae. Ωστόσο, με βάση αυτές τις αλληλουχίες, ολιγονουκλεοτίδια από επιλεγμένες περιοχές του γονιδιώματος έχουν χρησιμοποιηθεί ως εκκινητές για τη διάγνωση συγγενών ιών με RT-PCR και αλληλούχιση. Ιδιαίτερα, εκκινητές που προέρχονται από διαφορετικές

περιοχές κατά μήκος του γονιδιώματος έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην RT-PCR για την ανίχνευση τυπικών ΗΑstV και των ιών των ζώων. Η ευαισθησία αυτής της μεθόδου αυξήθηκε όταν συζεύχθηκε με ένα σύστημα κυτταροκαλλιέργειας σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα ύδατος. Δεδομένου ότι διάφοροι παθογόνοι παράγοντες σχετίζονται με λοιμώξεις του εντέρου σε ανθρώπους και ζώα, έχουν αναπτυχθεί πρόσφατα μέθοδοι βασισμένες σε RT-PCR για τη διάγνωση πολλαπλών ανθρώπινων ή ζωικών ιών, συμπεριλαμβανομένων των αστροϊών [596–599].

Η μεταγονιδιωματική ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη νέων αστροϊών σε δείγματα από ασθενείς με νόσους που δεν είχαν προηγουμένως συνδεθεί με αυτούς τους ιούς, [481,544] συμβάλλοντας στην αλλαγή της άποψης σχετικά με τη συμπεριφορά και τη σημασία τους. Αυτή η ισχυρή τεχνολογία μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό αναδυόμενων αστροϊών, καθώς και πολλών άλλων νέων παθογόνων, και θα αποτελέσει τη βάση για το σχεδιασμό βιολογικών αντιδραστηρίων για συγκεκριμένη διάγνωση.

Οι μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση προηγουμένως άγνωστων ιών που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες. Αυτή η μεθοδολογία έχει αξιολογηθεί για την ανίχνευση και του ΗΑstV χρησιμοποιώντας ιικό cDNA ή RNA από στελέχη αναφοράς προσαρμοσμένα σε καλλιεργημένα κύτταρα ή στελέχη άγριου τύπου από κόπρανά [600]. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για τον προσδιορισμό της χρησιμότητας και ευαισθησίας αυτής της μεθοδολογίας με κλινικά δείγματα.

#### 3.10.4. ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ

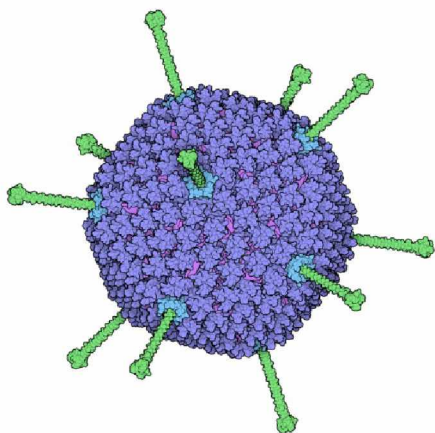
Η γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από τον αστροϊό είναι γενικά μια ήπια αυτοπεριοριζόμενη νόσος που μπορεί να διαταράξει τις δραστηριότητες ενός ατόμου για μερικές ημέρες αλλά δεν απαιτεί ειδική θεραπεία. Σε νεογέννητα παιδιά ή ενήλικες ασθενείς που παρατηρείται αφυδάτωση, μπορεί να χρειαστεί από του στόματος ή ενδοφλέβια χορήγηση θεραπείας. Η χορήγηση ανοσοσφαιρίνης ενδοφλέβια μπορεί να είναι χρήσιμη προσθήκη σε σοβαρά ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται σε συντηρητικά μέτρα, [552] αλλά απαιτούνται περισσότερες μελέτες για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητάς της. Αξίζει να σημειωθεί ότι η θεραπεία με ανοσοσφαιρίνη έχει προταθεί ως πιθανή αιτία εγκεφαλίτιδας σε έναν ανοσοκατεσταλμένο ασθενή, [544] αν και αυτό δεν επιβεβαιώθηκε.

Η διακοπή της μετάδοσης είναι ο βασικός παράγοντας για την πρόληψη της μόλυνσης από αστροϊό. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στα νοσοκομεία και άλλα ιδρύματα, στα κέντρα ημερήσιας φροντίδας και στις οικογένειες, όπου είναι πιθανό

να συμβεί η μετάδοση από άτομο σε άτομο. Ο αστροϊός είναι ανθεκτικός σε μια σειρά επεξεργασιών, συμπεριλαμβανομένων των κανονικών απολυμαντικών, [601,602] και μπορεί να επιβιώσει στο νερό μετά την χλωρίωση [581,603]. Συνεπώς, οι γενικές διαδικασίες υγιεινής πρέπει να επιβληθούν σε αυτά τα ιδρύματα. Δεν έχουν αναπτυχθεί εμβόλια για τον αστροϊό σε οποιοδήποτε ζώο ξενιστή. Εν τούτοις, ο εμβολιασμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης του καψιδίου που εκφράζεται σε βακουλιοϊό σε όρνιθες προστατεύει μερικώς τους απογόνους από την παρουσία αλλοιώσεων στο έντερο και την απώλεια σωματικού βάρους μετά από πρόκληση μόλυνσης με τον ιό [604]. Έτσι, αυτό το είδος αντιγόνου τελικά θα μπορούσε να είναι χρήσιμο στην αξιολόγηση υποψηφίων εμβολίων σε άλλα είδη ζώων, καθώς και στους ανθρώπους.



## 4. ΑΔΕΝΟΪΟΙ



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση δομής του Αδενοϊού

### 4.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι ιοί που ανήκουν στην οικογένεια Adenoviridae αν και έχουν απομονωθεί μόνο από σπονδυλωτά, αφορούν κάθε μεγάλη κατηγορία από τα ψάρια μέχρι τα θηλαστικά. Η βιοπληροφορική ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδιώματος [605] ανέδειξε τέσσερεις μεγάλους κλάδους που αντιστοιχούν σε τέσσερα γένη: το γένος Mastadenovirus, στο οποίο ανήκουν οι ιοί που έχουν απομονωθεί από θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων όλων των ανθρώπινων αδενοϊών, το γένος Aviadenovirus, στο οποίο ανήκουν οι ιοί που έχουν απομονωθεί από πτηνά, το γένος Atadenovirus, που ονομάστηκε έτσι λόγω της ασυνήθιστα υψηλής περιεκτικότητάς των ιών σε A + T, και περιλαμβάνει ιούς που έχουν απομονωθεί από ερπετά, πτηνά, μαρσιποειδή και θηλαστικά και το γένος Siadenovirus, στο οποίο ανήκουν ιοί που έχουν απομονωθεί από ερπετά και πτηνά. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί 57 τύποι αδενοϊού του ανθρώπου [606] και έχουν ταξινομηθεί σε επτά είδη (A-G) με βάση ορολογικές μεθόδους, την αιμοσυγκόλληση, την ογκογένεση στα τρωκτικά, τον μετασχηματισμό των πρωτογενών κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες και την αλληλούχιση του γονιδιώματος [607]. Πρόσφατα, προτάθηκε η συστηματική ονοματολογία των τύπων των αδενοϊών του ανθρώπου να γίνεται με βάση τις αλληλουχίες του γονιδιώματος αντικαθιστώντας τον όρο «ορότυπος». Έτσι, οι τύποι θα προσδιορίζονται με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων του εξονίου της μείζονος πρωτεΐνης του καψιδίου η οποία περιλαμβάνει τους μείζονες επίτοπους εξουδετέρωσης. Έχει επίσης προταθεί τα ανασυνδυασμένα στελέχη των αδενοϊών του ανθρώπου να χαρακτηρίζονται με

βάση το γονίδιο του εξονίου (H) και το γονίδιο του ινιδίου (F) που κωδικοποιούν το δεύτερο σημαντικότερο επίτοπο εξουδετέρωσης. Για παράδειγμα, το στέλεχος HAdV-H7 / F3 θα αφορά τον ιό με εξόνιο τύπου 7 και ινίδιο τύπου 3 [608]. Αυτός ο τύπος ονοματολογίας καθιστά αχρείαστη την εκχώρηση νέου αριθμού για τους νέους τύπους αδενοϊού σε κάθε νέο ανασυνδυασμένο στέλεχος μεταξύ των προηγουμένως καθιερωμένων τύπων που έχουν απομονωθεί από ασθενείς που έχουν μολυνθεί ταυτόχρονα με δύο ή περισσότερους ιούς.

Στο εξής θα χρησιμοποιήσουμε τον όρο «ορότυπο» όταν αναφερόμαστε στον τύπο του ιού καθώς ο ορότυπος έχει χρησιμοποιηθεί σχεδόν σε όλη τη βιβλιογραφία. Υπάρχουν 57 ορότυποι στα επτά είδη αδενοϊού του ανθρώπου, στο είδος A (Ad12,18,31), B (Ad3, 7, 11, 14, 16, 34, 35, 50, 55), C (Ad1, 2, 5, 6), D (Ad8 έως 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 έως 30, 32, 33, 36 έως 39, 42 έως 49, 51,53,54,56), E (Ad4), F (Ad40 και 41) και G (Ad52). Το είδος B μπορεί να χωριστεί περαιτέρω στα είδη B1 (Ad3, 7, 11, 16, 21, 50) και B2 (Ad11, 14, 34, 35). Οι Ad52 έως 57 απομονώθηκαν πρόσφατα. Ο Ad52 (είδος G) απομονώθηκε από έναν ασθενή με γαστρεντερίτιδα, οι Ad53 [609] και Ad54 ανήκουν στο είδος D και σχετίζονται με επιδημική κερατοεπιπεφυκίτιδα (epidemic keratoconjunctivitis, EKC). Ο Ad56, είδος D, έχει συνδεθεί με σπάνιο νεογνικό θάνατο και κερατοεπιπεφυκίτιδα και φαίνεται να είναι ένα πολύπλοκο ανασυνδυασμένο στέλεχος των Ad9, 15, 26 και 29. Ο Ad55, είδος B, που απομονώθηκε από μια έξαρση κρουσμάτων αναπνευστικής νόσου στην Κίνα, είναι ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος μεταξύ των Ad14 (97% του γονιδιώματος) και του Ad11. Πρόσφατα προτάθηκε ότι το στέλεχος που απομονώθηκε από τα κόπρανα ασθενή ηλικίας τεσσάρων ετών είναι το Ad57, είδος C καθώς έχει ινίδιο παρόμοιο με τον Ad6 αλλά ένα μοναδικό εξόνιο.

#### 4.2. ΔΟΜΗ ΒΙΡΙΟΥ

Τα ιικά σωματίδια των αδενοϊών δεν διαθέτουν φάκελο, έχουν εικοσαεδρική δομή, διάμετρο 90 nm και προεξέχοντα ινίδια. Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στη δομή των αδενοϊών εστίαστηκαν σε αδενοϊούς τύπου 2 και 5 του ανθρώπου που παρουσιάζουν στενή συγγένεια. Τα ιικά σωματίδια έχουν μάζα περίπου  $150 \times 10^6$  D και περιέχουν DNA (13% της μάζας), πρωτεΐνη (87% της μάζας), δεν έχουν μεμβράνη ή λιπίδιο και μικρή ποσότητα υδατανθράκων καθώς η πρωτεΐνη του ινιδίου του βίριου τροποποιείται με την προσθήκη γλυκοζαμίνης. Τα βίρια αποτελούνται από ένα κέλυφος πρωτεΐνης (καψίδιο) που περιβάλλει τον πυρήνα που περιέχει το DNA. Αρχικά, ο χαρακτηρισμός των πολυπεπτιδίων των βιρίων έγινε με διάσπαση των απομονωμένων ικών σωματιδίων με δωδεκυλοθειικό νάτριο και ηλεκτροφόρηση. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης με τα γονιδιωματικά ανοικτά

πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) έδειξε ότι υπάρχουν 12 πρωτεΐνες του βιρίου, οι πρωτεΐνες II-IX, IIIα, IVα, μ, η τερματική πρωτεΐνη και η ιική πρωτεάση p23.

Το εικοσαεδρικό κέλυφος αποτελείται κατά κύριο λόγο από 240 καψομερίδια τριμερών του εξονίου (12 ανά τριγωνική όψη του εικοσαέδρου), 12 πενταμερικά καψομερίδια του πεντονίου σε κάθε κορυφή του εικοσαέδρου και 12 ινίδια που εκτείνονται από τα πεντόνια. Οι βρόγχοι στην εξωτερική επιφάνεια των εξονίων, έχουν υπερμεταβλητή αλληλουχία και είναι σημαντικοί για την ανοσογονικότητα και την εξουδετέρωση που είναι ειδικές ως προς τον τύπο του ιού.

Οι περισσότεροι αδenoϊοί του ανθρώπου κωδικοποιούν έναν μόνο τύπο ινιδίου. Ωστόσο, οι τύποι 40,41 [610] και 52 [607] κωδικοποιούν δύο πρωτεΐνες ινιδίου, με το ένα ή το άλλο να συνδέεται προς κάθε πεντονική βάση. Αντίθετα, οι αδenoϊοί των πτηνών κωδικοποιούν επίσης δύο πρωτεΐνες ινιδίου, αλλά κάθε ινίδιο συνδέεται με κάθε πεντονική βάση. Καθώς το ινίδιο αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη του κυτταρικού υποδοχέα, η ενσωμάτωση δύο πρωτεϊνών του ινιδίου μπορεί να επεκτείνει το εύρος των κυτταρικών τύπων στους οποίους δεσμεύονται αυτοί οι ιοί.

Οι δευτερεύουσες πρωτεΐνες του καψιδίου IIIα, VIII και IX σταθεροποιούν μη ισοδύναμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τριμέρων των εξονίων, επιτρέποντας την χρήση του ίδιου τριμερούς του εξονίου σε τέσσερα διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα στην επιφάνεια του καψιδίου. Τα δίκτυα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δευτερευουσών πρωτεϊνών του καψιδίου σταθεροποιούν δύο ομάδες καψομερών και τις συγκρατούν μεταξύ τους: μια ομάδα εννέα τριμερών του εξονίου σε κάθε τριγωνική επιφάνεια του εικοσαέδρου και μια ομάδα έξι καψομερών σε κάθε κορυφή που αποτελείται από πέντε τριμερή του εξονίου με ένα κεντρικό πενταμερές πεντονικής βάσης.

Ο πυρήνας του βιρίου περιέχει επτά γνωστές ικές πρωτεΐνες και το ικό γονιδίωμα. Τα πολυπεπτίδια VII (174 αμινοξέα), η μείζων πρωτεΐνη του πυρήνα με πάνω από 800 αντίγραφα ανά βίριο, τα πολυπεπτίδια V (368 αμινοξέα) και η μ (36 αμινοξέα) είναι βασικές πρωτεΐνες, πλούσιες σε αργινίνη [611] που έρχονται σε επαφή με το ικό DNA και πιθανώς το συμπυκνώνουν εντός του πυρήνα. Η πρωτεΐνη VI σχετίζεται με μια κοιλότητα στην εσωτερική επιφάνεια των τριμερών του εξονίου [612] και με την πρωτεΐνη V, που προσδένει το εξαιρετικά διατεταγμένο καψίδιο στον λιγότερο διατεταγμένο πυρήνα DNA-πρωτεΐνης. Μια βασική μη διατεταγμένη περιοχή 115 υπολειμμάτων στη μέση κάθε πολυπεπτιδίου VI έχει προταθεί ότι συμβάλλει σε μια αλληλεπίδραση με τον πυρήνα. Το N-τελικό άκρο κάθε μονομερούς πεντονικής βάσης στο πενταμερές αλληλεπιδρά επίσης με τον πυρήνα και το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης IIIα γεγονός που είναι σε συμφωνία με τις αναφορές ότι αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν επίσης με την πρωτεΐνη V και ότι η IIIα είναι υπεύθυνη για τη συσκευασία του ικού DNA στα βίρια που είναι ειδική ως προς τον τύπο. Η

πρωτεΐνη IVa2 υπάρχει μόνο σε λίγα αντίγραφα σε μία κορυφή του εικοσαέδρου, δεσμεύεται στην αλληλουχία της συσκευασίας στο αριστερό άκρο του γονιδιώματος και απαιτείται για τη συσκευασία του ιικού DNA στο καψίδιο. Η έκτη πρωτεΐνη στον πυρήνα είναι η τερματική πρωτεΐνη, η οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το 5' άκρο του ιικού DNA και επομένως υπάρχει μόνο σε δύο αντίγραφα ανά ιικό σωματίδιο. Η τερματική πρωτεΐνη χρησιμεύει ως εκκινητής για την αντιγραφή του DNA. Ο πυρήνας περιέχει επίσης περίπου 10 μόρια της p23 ικής πρωτεΐνης της κυστεΐνης που λειτουργεί για τη διάσπαση αρκετών προδρόμων πρωτεϊνών του βιρίου κατά τη διάρκεια της συγκρότησης και της ωρίμανσης του ιικού σωματιδίου και στην αποσυναρμολόγηση του ιικού σωματιδίου και την έξοδο από τα ενδοσώματα κατά τη διαδικασία μόλυνσης [613].

#### 4.3. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Το γονιδίωμα του αδενοϊού είναι γραμμικό dsDNA που κυμαίνεται σε μέγεθος από 26 έως 45 kb [605]. Ένας πρωτεϊνικός εκκινητής της αντιγραφής του DNA που ονομάζεται τερματική πρωτεΐνη συνδέεται ομοιοπολικά με το φωσφορικό άλας στο 5' άκρο κάθε κλώνου. Σε όλους τους αδενοϊούς υπάρχουν ομόλογα γονίδια που κωδικοποιούν τις τρεις ικές πρωτεΐνες οι οποίες απαιτούνται για την αντιγραφή του ιικού DNA δηλαδή την τερματική πρωτεΐνη, την DNA πολυμεράση του ιού και την πρωτεΐνη δέσμευσης του μονόκλωνου DNA (ssDNA) του ιού και τα κύρια δομικά συστατικά του βιρίου. Ωστόσο, τα γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη V του πυρήνα βρίσκονται μόνο στους mastadenoviruses που έχουν απομονωθεί από θηλαστικά [605]. Αυτά τα κοινά γονίδια κωδικοποιούνται στο κεντρικό τμήμα του γονιδιώματος. Άλλα γονίδια που είναι ειδικά για τους αδενοϊούς διαφορετικών σπονδυλωτών κωδικοποιούνται κυρίως στα άκρα του γονιδιώματος. Επίσης, τα γονιδιώματα όλων των αδενοϊών έχουν ανεστραμμένες τερματικές αλληλουχίες επανάληψης που κυμαίνονται σε μέγεθος από 36 έως πάνω από 200 bp [605]. Οι ανεστραμμένες τερματικές αλληλουχίες χρησιμοποιούνται για την έναρξη της αντιγραφής του DNA σε κάθε άκρο του ιικού γονιδιώματος και επιτρέπουν στις μονές αλυσίδες του ιικού DNA που μετατοπίζονται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης ασύμμετρων κλώνων, να δημιουργούν ένα κυκλικό μόρφωμα λόγω του σχηματισμού ζευγών βάσεων στις τελικές αλληλουχίες τους. Οι μορφές που προκύπτουν από αυτά τα ζεύγη βάσεων («ranhandles») στις κατά τα άλλα μονές αλυσίδες DNA, λειτουργούν ως σημεία έναρξης της αντιγραφής των μονών αλυσίδων.

Το γονιδίωμα των αδενοϊών του ανθρώπου περιλαμβάνει αρκετές επαναλήψεις μιας cis-acting ακολουθίας που εντοπίζονται μεταξύ της αριστερής τερματικής επανάληψης και της πρώτης περιοχής κωδικοποίησης της πρωτεΐνης (E1A) και χρησιμεύουν για τη συγκρότηση του βιρίου. Αυτή η ακολουθία πρέπει να βρίσκεται

μεταξύ αρκετών εκατοντάδων ζευγών βάσεων ενός άκρου του χρωμοσώματος για να κατευθύνει τη συσκευασία του ιικού DNA στα μολυσματικά βίρια.

Το γονιδίωμα των αδενοϊών του ανθρώπου περιέχει πέντε πρώιμες μεταγραφικές μονάδες (E1A, E1B, E2, E3 και E4), τέσσερις ενδιάμεσες που μεταγράφονται στην αρχή της αντιγραφής του ιικού DNA (IX, IVa2, ενδιάμεση L4 και όψιμη E2), και μία μονάδα όψιμη μεταγραφής (μείζονα όψιμη) η επεξεργασία της οποίας έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία πέντε οικογενειών όψιμων mRNAs (L1-L5), τα οποία μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Νωρίς κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, μεταγράφεται σε χαμηλά επίπεδα και ο κύριος όψιμος προαγωγός, δημιουργώντας ένα από τα mRNA της οικογένειας L1 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p52 / 55 kD. Επίσης, μετά την έναρξη της αντιγραφής του ιικού DNA, η μονάδα μεταγραφής E2 μεταγράφεται από έναν εναλλακτικό προαγωγό που ονομάζεται όψιμος E2 υποκινητής καθώς επίσης και από τον πρώιμο E2 προαγωγό που είναι ενεργός πριν και μετά την έναρξη της αντιγραφής του ιικού DNA. Το χρωμόσωμα φέρει επίσης ένα ή δύο γονίδια (ανάλογα με τον τύπο) που σχετίζονται με τον ιό και μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση III. Συμβατικά, το γονίδιο E1A θεωρείται ότι βρίσκεται στο αριστερό άκρο. Και οι δύο κλώνοι του ιικού DNA μεταγράφονται με τον δεξιό κλώνο ανάγνωσης ως πρότυπο για τις μονάδες μεταγραφής E1A, E1B, IX, τη μείζονα όψιμη, τη VA RNA και την E3 και το αριστερό σκέλος ανάγνωσης ως πρότυπο για τις μονάδες E4, E2 και IVa2.

Εκτός από τις μονάδες μεταγραφής IVa2 και pIX, καθένα από τα γονίδια του αδενοϊού που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II δημιουργεί πολλαπλά mRNAs που διαφοροποιούνται με εναλλακτικό μάτισμα και στην περίπτωση των μείζονων όψιμων μονάδων μεταγραφής, της E2 και E3 επίσης με τη χρήση εναλλακτικών θέσεων πολυ (A). Τα L4 ενδιάμεσα mRNA που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες L4 22K και L4 33K (το ματισμένο mRNA) συνάγονται από την πρόσφατη ανακάλυψη ενός προαγωγού σε περίπου 72 μονάδες map και την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών σε ενδιάμεσους χρόνους μετά τη μόλυνση.

Η μονάδα E1A κωδικοποιεί δύο βασικές πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη μεταγραφή και προκαλούν το κύτταρο ξενιστή να εισέλθει στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η E1B κωδικοποιεί δύο πρωτεΐνες που εμποδίζουν την απόπτωση, η E2 κωδικοποιεί τρεις πρωτεΐνες που λειτουργούν άμεσα στην αντιγραφή του DNA, η E3 κωδικοποιεί προϊόντα που ρυθμίζουν την απόκριση του ξενιστή στη μόλυνση και η όψιμη οικογένεια mRNA αφορά την παραγωγή και τη συναρμολόγηση των στοιχείων του καψιδίου. Η μονάδα E4 είναι η μοναδική κωδικοποιεί ένα προφανώς διαφορετικό σύνολο λειτουργιών. Τα προϊόντα της E4 διαμεσολαβούν τη μεταγραφή, το μάτισμα του RNA και τη ρύθμιση της μετάφρασης που περιλαμβάνει την εξαγωγή πυρηνικού mRNA και την τροποποίηση της αντιγραφής του DNA και της απόπτωσης. Η ομαδοποίηση αυτή μπορεί να οφείλεται εν μέρει στο πλεονέκτημα που προκύπτει

από τη χρήση ενός μοναδικού στοιχείου ελέγχου της μεταγραφής για τη ρύθμιση της έκφρασης πολλαπλών πολυπεπτιδίων που απαιτούνται ταυτόχρονα για την εκτέλεση μιας λειτουργίας όπως η αντιγραφή του DNA.

#### 4.4. ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ

Ο κύκλος αντιγραφής αποτελείται από δύο φάσεις οι οποίες διαχωρίζονται από την έναρξη της αντιγραφής του ιικού DNA. Οι πρώιμες διεργασίες αρχίζουν μόλις ο ιός αλληλεπιδρά με το κύτταρο ξενιστή. Περιλαμβάνουν την προσρόφηση, τη διείσδυση, την κίνηση μερικώς απεκδυμένων ιικών σωματιδίων σε ένα σύμπλεγμα πυρηνικών πόρων (nuclear pore complex, NPC), τη μεταφορά του ιικού DNA μέσω των NPC στον πυρήνα και την έκφραση ενός πρώιμου συνόλου γονιδίων. Τα πρώιμα ιικά γονιδιακά προϊόντα προκαλούν την περαιτέρω έκφραση γονιδίων του ιού και την αντιγραφή του ιικού DNA, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (πιθανώς για να ενεργοποιήσουν γονίδια των κυττάρων ξενιστών για σύνθεση νουκλεοτιδίων και πρωτεϊνών), αποκλείουν την απόπτωση και ανταγωνίζονται μια ποικιλία αντιϊικών μέτρων του ξενιστή.

Σε κύτταρα HeLa που έχουν μολυνθεί MOI (multiplicity of infection) 10 βιρίων ανά κύτταρο, η πρώιμη φάση διαρκεί περίπου 6 ώρες, μετά την οποία, ανιχνεύεται για πρώτη φορά η αντιγραφή του ιικού DNA. Συγχρόνως με την έναρξη της αντιγραφής του ιικού DNA, αρχίζει η όψιμη φάση του κύκλου με την έκφραση των όψιμων ιικών γονιδίων και τη συγκρότηση των απογόνων βιρίων. Ο κύκλος μόλυνσης ολοκληρώνεται μετά από 24 έως 36 ώρες σε κύτταρα HeLa. Στο τέλος του κύκλου, παράγονται περίπου  $10^5$  απόγονα ιικά σωματίδια ανά κύτταρο καθώς και μια σημαντική περίσσεια ιικών πρωτεϊνών και DNA που δεν συγκροτούνται σε βίρια. Τα κύτταρα που είναι μολυσμένα σε υψηλό MOI σπάνια διαιρούνται. Επομένως, κατά την ολοκλήρωση του κύκλου αντιγραφής, το περιεχόμενο του μολυσμένου κυττάρου σε DNA και πρωτεΐνη έχει αυξηθεί μια με δύο φορές.

Οι μελέτες που αφορούν στον κύκλο αντιγραφής του αδενοϊού του ανθρώπου εστιάστηκαν κυρίως στους στενά συγγενείς ιούς HAdV-2 και HAdV-5 (Ad2, Ad5). Αυτοί οι τύποι έχουν μελετηθεί περισσότερο καθώς καλλιεργούνται εύκολα και έχουν αναπτυχθεί εκτεταμένες συλλογές μεταλλαγμένων ιών. Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί μετά από μόλυνση κυττάρων HeLa ή KB σε αρκετά υψηλό MOI (περισσότερες από 10 μονάδες σχηματισμού πλακών ανά κύτταρο). Έχουν χρησιμοποιηθεί υψηλές πολλαπλότητες μόλυνσης έτσι ώστε όλα τα κύτταρα της καλλιέργειας να είναι ταυτόχρονα μολυσμένα, επιτρέποντας την παρατήρηση της σειράς των βιοχημικών συμβάντων κατά τη διάρκεια του κύκλου μόλυνσης σε χρονική σειρά. Τα κύτταρα HeLa και KB έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο καθώς

πολλαπλασιάζονται εύκολα σε μεγάλες ποσότητες και επειδή οι Ad2 και Ad5 αναπτύσσονται γρήγορα σε αυτά και σε υψηλή απόδοση. Αυτά τα νεοπλασματικά κύτταρα υποστηρίζουν την ταχύτερη ανάπτυξη ιού σε σχέση με τους διπλοειδείς ινοβλάστες του ανθρώπου, στους οποίους ο κύκλος αντιγραφής παρατείνεται μέχρι περίπου δύο φορές περισσότερο λόγω της επέκτασης της πρώιμης φάσης της μόλυνσης.

#### 4.4.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ

Ο αδενοϊός χρησιμοποιεί συγκεκριμένους κυτταρικούς υποδοχείς για την προσκόλληση και την είσοδο στο κύτταρο ξενιστή. Η αρχική προσκόλληση των HAdVs που ανήκουν στα είδη A, C, D, E και F (αλλά όχι το είδος B) προκαλείται λόγω της υψηλής συγγένειας σύνδεσης του τομέα του ινιδίου 75 στη διαμεμβρανική πρωτεΐνη CAR (Coxsackie B, adenovirus receptor) του κυττάρου ξενιστή [614]. Η πρωτεΐνη CAR εκφράζεται άφθονα σε όργανα όπως είναι η καρδιά, το πάγκρεας, το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, ο προστάτης, οι όρχεις, ο πνεύμονας, το ήπαρ και το έντερο, αλλά λίγο ή καθόλου στα αιμοποιητικά κύτταρα ή στους μύες των ενήλικων ατόμων. Για να συμβεί η μόλυνση δεν απαιτούνται οι κυτταροπλασματικές ή διαμεμβρανικές περιοχές της CAR, υποδεικνύοντας ότι η λειτουργία της στη διαδικασία της μόλυνσης έγκειται κυρίως στην δράση της ως μέσο για την πραγματοποίηση δέσμωσης υψηλής συγγένειας.

Στις τρεις διασυνδέσεις μεταξύ των μονομερών του ινιδίου, δεσμεύονται τρία μόρια της CAR μέσω της ίδιας επιφάνειας που χρησιμοποιείται από την CAR για ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις. Οι ελεύθερες πρωτεΐνες του ινιδίου που παράγονται κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης της μόλυνσης σε περίσσεια σε σχέση με τις πρωτεΐνες του ινιδίου που ενσωματώνονται στα βίρια, απελευθερώνονται με τα απόγονα βίρια από τη βασική επιφάνεια των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών και παρεμβάλλονται με ολιγομερισμό της CAR σε στενές ενώσεις. Αυτό πιθανώς προάγει την απελευθέρωση των απόγονων βιρίων προς τον αυλό του αεραγωγού. Με τον τρόπο αυτό, η αλληλεπίδραση ινιδίου-CAR εξυπηρετεί δύο λειτουργίες, την αρχική προσρόφηση των βιρίων στα κύτταρα-ξενιστές κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και τη διασπορά των απόγονων βιρίων σε νέα κύτταρα-ξενιστές και οργανισμούς-ξενιστές.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι HAd40 και 41 ενσωματώνουν ένα από τα δύο διαφορετικά ινίδια σε κάθε κορυφή του βιρίου. Το μεγαλύτερο από αυτά συνδέεται με την CAR. Ο υποδοχέας της δεύτερης, βραχύτερης πρωτεΐνης του ινιδίου των HAdV-40 και -41 δεν είναι γνωστός, αλλά θεωρείται ότι συμβάλλει στον τροπισμό αυτών των ιών προς το επιθήλιο του εντέρου και ως εκ τούτου στην εντερίτιδα με

την οποία έχουν συνδεθεί. Η σταθερότητα των HAdV40 και 41 σε χαμηλό pH συμβάλλει αναμφισβήτητα σε αυτόν τον τροπισμό.

Το ινίδιο του HAdV του είδους D του τύπου 37 και πιθανώς και άλλα είδη τύπου D μπορούν να δεσμεύσουν τρία μόρια σιαλικού οξέος κοντά στην κορυφή 39 σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση της CAR και του CD46 με την πλευρική επιφάνεια του ινιδίου. Συνεπώς, αυτός ο τερματικός σακχαρίτης που υπάρχει σε πολλές γλυκοπρωτεΐνες μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως μια αρχική θέση πρόσδεσης για τα είδη HAdV του τύπου D. Η λοίμωξη από τους HAdVs προκαλεί μια ισχυρή, μακροχρόνια χυμική ανοσοαπόκριση. Ενώ τα περισσότερα εξουδετερωτικά αντισώματα δεσμεύονται με το κύριο πρωτεϊνικό εξόνιο του ιού και είναι κυρίως υπεύθυνα για την ταξινόμηση των HAdVs σε ορότυπους [615,616] δημιουργούνται επίσης εξουδετερωτικά αντισώματα προς το ινίδιο 90 τα οποία δρουν σε συνέργια με αντισώματα προς την πεντονική βάση, η οποία αλληλεπιδρά με τον δευτερεύων υποδοχέα των HAdV.

#### 4.4.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΚΑΙ ΑΠΕΚΔΥΣΗΣ

Μετά την πρόσδεση υψηλής συγγένειας του ινιδίου του HAdV-5 στην CAR, οι περιοχές του βρόγχου των τομέων RGD της βάσης του πεντονίου συνδέονται με τις ιντεγκρίνες ανβ3 και ανβ5 στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή με 50 φορές χαμηλότερη συγγένεια σε σχέση με την αλληλεπίδραση του ινιδίου με την CAR. Η αλληλεπίδραση της πεντονικής βάσης με τις ιντεγκρίνες θεωρείται ότι διευκολύνεται από την υψηλή τοπική συγκέντρωσή τους που προκύπτει από τη σύνδεση υψηλής συγγένειας του ινιδίου με τη διαμεμβρανική CAR. Η συσσωμάτωση των ιντεγκρινών μέσω της δέσμωσης διαφόρων ιντεγκρινών στις υπομονάδες μίας πενταμερούς βάσης πεντόνης πυροδοτεί τη σηματοδότηση της διαμεμβρανικής ιντεγκρίνης, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των οικογενειών των GTPases PI3K, p130CAS και Rho. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον τοπικό πολυμερισμό της ακτίνης ο οποίος απαιτείται κατά τη διαδικασία της κλασικής ενδοκυττάρωσης του βιρίου μέσω των επικαλυμμένων με κλαθρίνη κοιλοτήτων, που επάγεται από υποδοχέα που περιλαμβάνει τους προσαρμογείς κλαθρίνης και την μεγάλη GTPase, τη δυναμίνη. Η δυναμίνη πολυμερίζεται σε σπειροειδή δομή που προάγει τη σύντηξη της μεμβράνης που απαιτείται για το διαχωρισμό του ενδοσώματος από τη μεμβράνη του πλάσματος [617].

Η απέκδυση του βιρίου ξεκινά στην κυτταρική επιφάνεια. Η αλληλεπίδραση της πεντονικής βάσης με ιντεγκρίνες στην κυτταρική επιφάνεια και κατά την ενδοκυττάρωση, οδηγεί στην αποσύνδεση των ινιδίων, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η ενδοκυττάρωση του ιικού σωματιδίου χωρίς ινίδια [618]. Δομικές



μελέτες αποκάλυψαν σημαντικές μορφολογικές αλλαγές που οδηγούν στην αύξηση της διαμέτρου του κεντρικού πόρου της πεντονικής βάσης η οποία διευκολύνει την απελευθέρωση του ινιδίου. Μελέτες αποσυναρμολόγησης του βιρίου έδειξαν ότι ο χρόνος απόσπασης του ινιδίου είναι 3 λεπτά μετά την προσρόφηση στους 4°, ακολουθούμενη από θέρμανση στους 37°.

Μετά την ενδοκυττάρωση των επικαλυμμένων με κλαθρίνη κυστιδίων που περιέχουν το ιικό σωματίδιο HAdV-2, τα κυστίδια ωριμάζουν σε ενδοσώματα και υποϊικά σωματίδια που στερούνται ινιδίων και διαφεύγουν από τα ενδοσώματα εντός του κυτοσολίου 15 λεπτά μετά τη δέσμευση στην κυτταρική επιφάνεια. Μετά την ενδοκυττάρωση, η απελευθέρωση από τα ενδοσώματα μπορεί να απαιτεί περαιτέρω σηματοδότηση από αν ιντεγκρίνες. Αυτό συμβαίνει διότι η απελευθέρωση παρεμποδίζεται από αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης C, οι οποίοι εμποδίζουν τη μεταφορά των κυστιδίων που περιέχουν τα ιικά σωματίδια διαμέσου του φλοιού ακτίνης κάτω από τη μεμβράνη του πλάσματος, στο κυτοσόλιο [618,619]. Η απελευθέρωση της πεντονικής βάσης, των τριμερών του περιπεντονεϊκού εξονίου και των πρωτεϊνών IIIa, VI και VIII του εσωτερικού καψιδίου, πραγματοποιείται στο ενδόσωμα. Η διαδικασία αυτή θεωρείται ότι ενεργοποιείται εν μέρει μέσω της οξίνισης κατά τη διάρκεια της ενδοσωματικής ωρίμανσης. Η έκθεση σε ένα περιβάλλον μείωσης στο ενδόσωμα που είναι σε φάση ωρίμανσης, έχει επίσης ως αποτέλεσμα την εκ νέου ενεργοποίηση της ιικής πρωτεάσης που σχετίζεται με το ιικό σωματίδιο, η οποία δρα κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης του βιρίου και της διάσπασης της πρωτεΐνης VI. Αυτό είναι απαραίτητο για την τελική αποσυναρμολόγηση των υποϊικών σωματιδίων στα σύμπλοκα πυρηνικών πόρων και την εισαγωγή του DNA στον πυρήνα. Η λύση του ενδοσώματος και η απελευθέρωση των μερικώς μη επικαλυμμένων βιρίων στο κυτοσόλιο διαμεσολαβείται από τον αμφιπαθητικό ελικοειδή λυτικό τομέα της μεμβράνης της πρωτεΐνης VI που φαίνεται να είναι απομονωμένος στο ανέπαφο βίριο σε κοιλότητες στην εσωτερική επιφάνεια των τριμερών του εξονίου. Έτσι, το ιικό σωματίδιο, το οποίο είναι πολύ σταθερό έξω από το κύτταρο, αποσυναρμολογείται με απομάκρυνση των δομικών πρωτεϊνών κατά την είσοδο στο κύτταρο έτσι ώστε να μπορεί να μεταφερθεί το DNA του στον πυρήνα.

Τα υποϊικά σωματίδια απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στον πυρήνα μέσω των μικροσωληναρίων. Η διάμετρος των υποϊικών σωματιδίων που συνδέονται με τους NPC (περίπου 90nm) είναι πολύ μεγάλη για να περάσουν διαμέσου των διαύλων διάχυσης στον πόρο, που είναι περίπου 5 έως 9 nm. Η απέκδυση λαμβάνει χώρα στον πυρηνικό πόρο. Η σύνδεση των ακέραιων υποϊικών σωματιδίων με τους NPCs συμβαίνει περίπου 60 λεπτά μετά τη μόλυνση και η αποσυναρμολόγηση των σωματιδίων συμβαίνει περίπου 120 λεπτά μετά τη μόλυνση [620].

Το ικό DNA που δεσμεύεται από τη μείζονα βασική πρωτεΐνη VII του πυρήνα [621] εισέρχεται στον πυρήνα περίπου 120 λεπτά μετά τη μόλυνση, ενώ τα περισσότερα εξόνια και η πρωτεΐνη IX παραμένουν συνδεδεμένα με τους NPCs, υποδεικνύοντας ότι το σύμπλεγμα ικού DNA-πρωτεΐνης VII διαχωρίζεται από το καψίδιο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εισόδου στον πυρήνα. Η πρωτεΐνη VII και το ικό DNA με το οποίο δεσμεύεται, εισάγονται στον πυρήνα μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από Ran, που συνεπάγεται δέσμευση της πρωτεΐνης VII από την ιμπορτίνη που βρίσκεται σε αφθονία, την τρανσπορτίνη. Η πρωτεΐνη VII παραμένει συνδεδεμένη με το ικό DNA μετά την εισαγωγή του στον πυρήνα μέχρις ότου αποσυνδεθεί κατά τη μεταγραφή του ικού γονιδιώματος.

#### 4.4.3. ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, το DNA του αδενοϊού μεταφέρεται στον πυρήνα ενώ είναι δεσμευμένο με την πρωτεΐνη VII [621]. Η πρωτεΐνη VII διαδραματίζει τον κρίσιμο ρόλο της καταστολής της ενεργοποίησης της κυτταρικής θραύσης του dsDNA (dsDNA break response, DSBR) όταν το ικό DNA που είναι συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη VII εισέρχεται στον πυρήνα [622]. Ελλείψει τέτοιας προστασίας, το κυτταρικό σύμπλεγμα MRE11-RAD50-NBS1 ενεργοποιείται από τα άκρα του ικού DNA και αποικοδομεί τα άκρα του γονιδιώματος, αναστέλλοντας την αντιγραφή του ικού DNA [622].

Η απελευθέρωση της πρωτεΐνης VII για τη διευκόλυνση της μεταγραφής του ικού γονιδιώματος, διεγείρεται από την αλληλεπίδρασή της με διάφορες όξινες πυρηνικές πρωτεΐνες που βρίσκονται σε αφθονία, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα ενεργοποίησης εκμαγείου I.

Αν και οι όροι πρώιμη και όψιμη χρησιμοποιούνται συμβατικά για την περιγραφή των γεγονότων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του κύκλου αντιγραφής, η λειτουργική διάκριση μεταξύ των πρώιμων και των όψιμων γεγονότων δεν είναι σαφής. Τα πρώιμα γονίδια συνεχίζουν να εκφράζονται μετά τη μόλυνση, και ο προαγωγός που ελέγχει την έκφραση της μείζονος όψιμης μεταγραφικής μονάδας κατευθύνει ένα χαμηλό επίπεδο μεταγραφής νωρίς μετά τη μόλυνση. Επίσης, τα ικά γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες IVa2, IX, 28L4-22K και L4-33K226 αρχίζουν να εκφράζονται σε έναν ενδιάμεσο χρόνο, δημιουργώντας έτσι μια κατηγορία όψιμης- πρώιμης φάσης.

#### 4.4.4. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ E1A

Υπάρχουν τρεις κύριοι στόχοι της πρώιμης γονιδιακής έκφρασης του αδενοϊού. Ο πρώτος στόχος είναι να εισαχθεί το κύτταρο ξενιστής στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, παρέχοντας το βέλτιστο περιβάλλον για την αντιγραφή του ιού. Τα γονιδιακά προϊόντα E1A και E4 παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία. Ο δεύτερος στόχος είναι η δημιουργία ικών συστημάτων που προστατεύουν το μολυσμένο κύτταρο από διάφορες αντι-ικικές άμυνες του οργανισμού-ξενιστή. Τα γονίδια E1A, E1B, E3 και VA RNA συμβάλλουν σε αυτή τη διαδικασί. Ο τρίτος στόχος είναι η σύνθεση των ικών γονιδιακών προϊόντων που απαιτούνται για την αντιγραφή του ιικού DNA. Και οι τρεις αυτοί στόχοι εξαρτώνται από την ενεργοποίηση της μεταγραφής του ιικού γονιδιώματος και την εισαγωγή των κυττάρων στη φάση S προκειμένου να παρασχεθούν τα πρόδρομα dNTP που απαιτούνται για τη σύνθεση του ιικού DNA, τις πρωτεΐνες επεξεργασίας NTP και RNA που απαιτούνται για τη σύνθεση του ιικού mRNA και την ενεργοποίηση των διαδρομών που είναι απαραίτητες για τη σύνθεση πρωτεϊνών.

Η περιοχή E1A είναι η αυτή που μεταγράφεται μετά την μόλυνση. Νωρίς μετά τη μόλυνση εκφράζονται δύο μείζονα E1A mRNAs και κωδικοποιημένες πρωτεΐνες από εναλλακτικά ματισμένα mRNAs. Η μεγάλη πρωτεΐνη E1A ενεργοποιεί αυτόματα τη μεταγραφή της περιοχής E1A κατά περίπου πέντε φορές και διεγείρει τη μεταγραφή από τις θέσεις εκκίνησης E1B, E2, E3 και E4 κατά περισσότερο από δέκα (E1B) έως περίπου 100 φορές (E2early, E3 και E4) [623,624]. Η περιοχή E3 εκφράζει διάφορα εναλλακτικά ματισμένα mRNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αναστέλλουν την έμφυτη και την επίκτητη ανοσοαπόκριση έναντι της ιογενούς μόλυνσης. Κατά συνέπεια, η ενεργοποίηση της E3 μέσω του NFκB, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί πολλαπλά κυτταρικά γονίδια που εμπλέκονται στην έμφυτη και την επίκτητη ανοσολογική απόκριση, πιθανότατα προστατεύει τα μολυσμένα κύτταρα από αυτούς τους αντι-ιικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Οι δύο κύριες πρωτεΐνες E1B αναστέλλουν την εξαρτώμενη από την p53 επαγωγή της απόπτωσης. Τα E4orf1 και E4orf4 είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης mTOR απουσία θρεπτικής και μιτογενούς σηματοδότησης [625]. Η E2 κωδικοποιεί τις τρεις ιικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αντιγραφή του DNA του αδενοϊού, την προτερματική πρωτεΐνη (pTP) η οποία εκκινεί τη σύνθεση DNA στο 5' άκρο κάθε θυγατρικού κλώνου, της DNA πολυμεράσης του αδενοϊού (Ad Po) και της πρωτεΐνης δέσμευσης του ssDNA του αδενοϊού (ssDNA binding protein, DBP).

Είναι αξιοσημείωτο ότι η έκφραση των ικών πρωτεϊνών που απαιτούνται για την αντιγραφή του ιικού DNA ρυθμίζεται με τέτοιο τρόπο, ώστε εν μέρει να ενεργοποιείται η ίδια οικογένεια E2F παραγόντων μεταγραφής που ρυθμίζουν τα κυτταρικά γονίδια που απαιτούνται για την είσοδο του κυττάρου στη φάση S. Κατά

αυτόν τον τρόπο, η E1A ενεργοποιεί αμφότερα τα ιικά και κυτταρικά γονίδια, μια διαδικασία που πιθανώς είναι αποτέλεσμα εξέλιξης προκειμένου για λόγους «οικονομίας» να συγχρονιστεί η σύνθεση του DNA των ιών με την ενεργοποίηση των κυτταρικών γονιδίων που απαιτούνται για τη σύνθεση των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων και άλλων πτυχών της φυσιολογίας των κυττάρων που ευνοούν την αντιγραφή του DNA.

#### 4.4.5. ΟΨΙΜΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης της μόλυνσης, ο κύριος όψιμος προαγωγός (major late promoter, MLP) είναι ενεργός, αλλά εκφράζεται μόνο το μεγαλύτερο L1 mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 52 / 55K. Τα όψιμα γονίδια του αδενοϊού που κωδικοποιούν πολυπεπτίδια του βιρίου και η πρωτεΐνη L4-100K που εμπλέκεται στη ρύθμιση της όψιμης φάσης της μετάφρασης και στη συναρμολόγηση του βιρίου, αρχίζουν να εκφράζονται αποτελεσματικά κατά την έναρξη της αντιγραφής του ιικού DNA.

Οι όψιμες περιοχές κωδικοποίησης του αδενοϊού είναι οργανωμένες σε μια μεγάλη μονάδα μεταγραφής με τον MLP. Αυτή η μονάδα μεταγραφής υποβάλλεται σε επεξεργασία για να δημιουργηθούν τουλάχιστον 14 διαφορετικά mRNAs. Αυτά τα mRNAs ομαδοποιούνται σε πέντε οικογένειες, τις L1 έως L5. Κάθε οικογένεια αποτελείται από εναλλακτικά ματισμένα mRNAs που περιέχουν όλα ένα μη μεταφρασμένο τριμερή οδηγό 201 νουκλεοτιδίων που παράγεται από το μάτισμα τριών βραχέων εξονίων σε ένα μακρύτερο εξόνιο το οποίο περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης που γενικά δεν διακόπτεται από ιντρόνια, εκτός από την περίπτωση του L4-33K mRNA. Διαφορετικά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης σε κάθε όψιμη οικογένεια mRNA προσεγγίζονται με εναλλακτικό μάτισμα RNA του 3' άκρου του τρίτου τριμερούς οδηγού εξονίου σε διαφορετικές θέσεις ματίσματος. Ο οδηγός στο 5' άκρο των L1-53 / 55K mRNAs που εκφράζεται σε πρώιμη φάση, περιέχει ένα επιπλέον εξόνιο 440 νουκλεοτιδίων που ονομάζεται i-leader και το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 135 αμινοξέων. Αυτή η πρωτεΐνη δεν απαιτείται για την αντιγραφή του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια, αλλά η παρουσία του i-leader μειώνει δραματικά την ημιζωή των L1 mRNAs από 26 ώρες για τα L1 mRNA που στερούνται το i-leader σε περίπου τέσσερις ώρες για τα L1 mRNAs που το περιέχουν.

Η έκφραση αυτής της μεγάλης οικογένειας των όψιμων mRNAs ελέγχεται από τον MLP. Αυτός ο υποκινητής εμφανίζει χαμηλό επίπεδο δραστηριότητας νωρίς μετά τη μόλυνση, αλλά γίνεται αρκετές εκατοντάδες φορές πιο δραστήριος ανά μόριο DNA στην όψιμη φάση [626]. Φαίνεται ότι υπάρχουν τουλάχιστον δύο διακριτά συστατικά που συμβάλλουν στην όψιμη ενεργοποίηση του MLP: μια cis-acting αλλαγή στο ιικό

χρωμόσωμα που εξαρτάται από την αντιγραφή του ιικού DNA, και η έκφραση δύο δραστικών παραγόντων που κωδικοποιούνται από τον ιό σε ενδιάμεσους χρόνους μετά τη μόλυνση. Μέχρι τώρα, δεν υπάρχει μοριακή εξήγηση για την απαίτηση για αντιγραφή του ιικού DNA. Οι πρωτεΐνες IVa2 και L4-22K διεγείρουν σε μεγάλο βαθμό τη μεταγραφή από τον MLP. Αυτές οι δύο πρωτεΐνες δεσμεύονται επίσης συνεργατικά με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο αριστερό άκρο του γονιδιώματος, προωθώντας τη συσκευασία του ιικού DNA σε υποϊικά σωματίδια.

#### 4.4.6. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ

Κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης της μόλυνσης, τα ιικά πρώιμα mRNAs μεταφράζονται ταυτόχρονα με τη συνεχιζόμενη μετάφραση των mRNA του κυττάρου ξενιστή. Ωστόσο, κατά την τελευταία φάση της μόλυνσης, η μετάφραση των mRNA των κυττάρων αναστέλλεται και ουσιαστικά ολοκληρωμένος ο μηχανισμός μετάφρασης του κυττάρου ξενιστή αφορά στη μετάφραση των όψιμων ιικών mRNAs. Αργότερα κατά τη μόλυνση, τα ιικά mRNA μεταφράζονται όταν φτάνουν στο κυτταρόπλασμα. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, όταν τα ιικά mRNAs αποτελούν περίπου το 20% της συνολικής κυτταροπλασματικής δεξαμενής, μεταφράζονται με τον αποκλεισμό των mRNA του ξενιστή.

#### 4.4.7. ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ DNA

Καθώς τα προϊόντα του γονιδίου E2 συσσωρεύονται μετά την ενεργοποίηση της μεταγραφής του πρώιμου προαγωγού E2 μέσω της μεγάλης E1A και τη διέγερση της δέσμευσης του παράγοντα μεταγραφής του E2F από το E4orf6/7, ξεκινά η αντιγραφή του ιικού DNA. Η αντιγραφή του DNA των Ad2 και Ad5 ξεκινά περίπου 6 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων HeLa σε πολλαπλότητα 10 μονάδων σχηματισμού πλάκας ανά κύτταρο και συνεχίζεται μέχρι το θάνατο του κυττάρου ξενιστή.

Για την αντιγραφή του DNA του αδενοϊού απαιτείται η παρουσία ενός ελάχιστου συνόλου πρωτεϊνών αντιγραφής συμπεριλαμβανομένου του τερματικού πρωτεϊνικού εκκινητή της σύνθεσης DNA (pTP), της DNA πολυμεράσης του ιού (Ad Pol) και της πρωτεΐνη δέσμευσης του ssDNA (DBP). Οι ανεστραμμένες τερματικές επαναλήψεις του ιικού χρωμοσώματος λειτουργούν ως σημεία έναρξης της αντιγραφής. Η αντιγραφή του ιικού DNA λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Η σύνθεση ξεκινά σε κάθε άκρο του γραμμικού DNA και προχωρά με συνεχή τρόπο στο άλλο άκρο του γονιδιώματος. Μόνο ένας από τους δύο κλώνους του DNA χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη σύνθεση. Έτσι, τα προϊόντα αυτού του σταδίου αντιγραφής αποτελούνται από έναν προγονικό και έναν απόγονο κλώνο καθώς και από έναν μετατοπισμένο κλώνο



σύμπλοκο pTP-AdPol στην αρχή. Συνεπώς, το σύμπλεγμα προ-εκκίνησης αποτελείται από το άκρο του ιικού DNA που δεσμεύεται από τρεις ιικές πρωτεΐνες, τις pTP, AdPol και DBP και δύο παράγοντες μεταγραφής του κυττάρου ξενιστή, τους NF1 και OCT1.

Ως πρωτεΐνη εκκινήτης, η pTP διατηρεί την ακεραιότητα της τελικής αλληλουχίας του ιικού χρωμοσώματος κατά τη διάρκεια πολλαπλών γύρων αντιγραφής του DNA. Η αντιγραφή και η όψιμη μεταγραφή λαμβάνουν χώρα σε μεγάλες περιοχές του πυρήνα που ονομάζονται κέντρα αντιγραφής.

Η επιμήκυνση της αλυσίδας απαιτεί την παρουσία των ιικών AdPol και DBP, καθώς και της κυτταρικής τοποϊσομεράσης I. Η DBP που εκφράζεται σε αφθονία, είναι μια φωσφοπρωτεΐνη μεγέθους 59 kD η οποία συνδέεται στενά με το ssDNA ανεξάρτητα από την αλληλουχία του. Ο πολυμερισμός της DBP στο ssDNA οδηγεί στον διαχωρισμό των κλώνων, γεγονός που είναι σε συμφωνία με την έλλειψη απαίτησης για την παρουσία DNA ελικάσης για την εκτύλιξη της διπλής έλικας του εκμαγείου. Παρουσία της DBP, η AdPol αφού έχει διαχωριστεί από την pTP, είναι εξαιρετικά δραστική ως προς την επεξεργασία της αλληλουχίας και μπορεί να «ταξιδέψει» σε όλο το μήκος του χρωμοσώματος. Η τοποϊσομεράση I ενισχύει τη σύνθεση των αλυσίδων με μέγεθος μεγαλύτερο από 9 kb. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη για να ξεπεραστεί το δομικό πρόβλημα του DNA που προκύπτει μόνο μετά από εκτεταμένη αντιγραφή.

Συνοπτικά, έχει αναγνωριστεί ένα σύνολο πρωτεϊνών που μεσολαβεί στην έναρξη της αντιγραφής του DNA του αδενοϊού (pTP, AdPol, DBP, NFI και OCT1) και στην επιμήκυνση της αλυσίδας (AdPol, DBP και τοποϊσομεράση I). Αυτά τα πολυπεπίδια, μαζί με το εκμαγείο που περιέχει την περιοχή έναρξης της αντιγραφής, αρκούν για την ανασύσταση της πλήρους αντίδρασης αντιγραφής του DNA in vitro. Η απλότητα αυτού του μηχανισμού αντιγραφής του DNA και η θέση των αλληλουχιών της συσκευασίας του ιικού DNA στο αριστερό άκρο του γονιδιώματος, επέτρεψαν την ανάπτυξη βοηθητικών εξαρτώμενων φορέων αδενοϊού στους οποίους σχεδόν όλο το ικό DNA έχει υποκατασταθεί από τις αλληλουχίες DNA ενδιαφέροντος, ενώ οι πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αντιγραφή του DNA και τη συσκευασία του DNA του φορέα παρέχονται από το γονιδίωμα ενός βοηθητικού ιού από τον οποίο έχει αφαιρεθεί η αλληλουχία της συσκευασίας του.

#### 4.4.8. ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΡΙΩΝ

Η αντιγραφή του ιικού DNA, σε συνδυασμό με την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων των δομικών πολυπεπτιδίων του αδενοϊού, θέτει την έναρξη του σταδίου της συγκρότησης των ιικών σωματιδίων. Εκτός από την καταστολή της μετάφρασης των mRNA του κυττάρου ξενιστή και τη διέγερση της μετάφρασης των όψιμων mRNA, η

L4-100K συμμετέχει στην αναδίπλωση του εξονίου και στη συγκρότηση των τριμερών. Τα καψομερίδια του πεντονίου που αποτελούνται από μια πενταμερική βάση πεντονίου και το τριμετρικό ινίδιο, συγκροτούνται στο κυτταρόπλασμα, και εν συνεχεία ενώνονται για να σχηματίσουν ένα πλήρες καψομερίδιο πεντόνης. Μετά την παραγωγή τους, το εξόνιο και τα καψομερίδια της πεντόνης εισάγονται στον πυρήνα, όπου πραγματοποιείται η συγκρότηση του βιρίου.

Το DNA του αδενοϊού συσκευάζεται σε καψίδια με πολωμένο τρόπο ξεκινώντας από το αριστερό άκρο του γονιδιώματος. Επτά πλούσιες σε AT αλληλουχίες με την συναινετική αλληλουχία 5'-TTTG-N8-GC-3' που βρίσκεται μεταξύ των ζευγών βάσεων 200 έως 400bp του Ad5, συμμετέχουν στην ενκάψωση του ιικού DNA [632]. Αυτή η αλληλουχία περίπου 200 bp για τη συσκευασία, λειτουργεί επίσης για τη συγκρότηση του βιρίου όταν βρίσκεται στο δεξιό άκρο του γονιδιώματος. Οι ικές IVa2, L4-22K και L1 52/55K δεσμεύουν την αλληλουχία συσκευασίας και προάγουν τη συσκευασία του ιικού DNA σε προ-καψίδια [633]. Η πρωτεΐνη IIIa αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 52/555K και συμμετέχει στη διαδικασία της συσκευασίας. Οι IVa2 και L4-22K λειτουργούν επίσης στην ενεργοποίηση της όψιμης φάσης του MLP όπου δεσμεύουν αλληλουχίες παρόμοιες με την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία που είναι πλούσια σε AT και αφορά τη συσκευασία, σε στοιχεία ελέγχου της μεταγραφής στο πρώτο ιντρόνιο των όψιμων mRNAs.

Η μείζον πρωτεΐνη του πυρήνα που μοιάζει με ιστόνη, η πρωτεΐνη VII, συντίθεται ως πρόδρομο μόριο, την pVII 7, η οποία σχετίζεται με το ικό DNA κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης. Η pVII αλληλεπιδρά με τις IVa2 και 52 / 55K. Συνεπώς, το ικό DNA-με τις σχετιζόμενες προ-τερματικές πρωτεΐνες-συσκευάζεται ως σύμπλεγμα με την pVII και τις άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες του βιρίου και ένα πρόδρομο μόριο της μ.

Τελικά, η διάσπαση των προδρόμων των πρωτεϊνών VI, VII, VIII, μ και της τερματικής πρωτεΐνης από μία ική πρωτεάση που περιλαμβάνεται στα σωματίδια, ολοκληρώνει τη συγκρότηση των μολυσματικών ιικών σωματιδίων. Η ική πρωτεάση μεγέθους 23-kD που κωδικοποιείται από την L3, [613] μια πρωτεάση της κυστεΐνης που απαιτεί DNA και ένα C-τελικό τμήμα της pVI ως συμπαραγόντες, [634–637] λειτουργεί αργά στη διαδικασία της συγκρότησης. Η δράση της είναι απαραίτητη για την απομάκρυνση της πρωτεΐνης 52 / 55K από τα καψίδια που ωριμάζουν καθώς και για την ωρίμανση των ιικών πρωτεϊνών. Αυτές οι διασπάσεις σταθεροποιούν το σωματίδιο και το καθιστούν μολυσματικό.

#### 4.4.9. ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΤΩΝ ΙΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Υπάρχουν αρκετές διαδικασίες που διευκολύνουν την απελευθέρωση των απογόνων βιρίων από τα μολυσμένα κύτταρα και την εξάπλωση τους στους μολυσμένους



ιστούς. Αργότερα στον κύκλο μόλυνσης, η ιική πρωτεάση L3-23K διασπά την κυτταρική κυτταροκερατίνη K18. Αυτή η διάσπαση λαμβάνει χώρα στο αμινοξύ 74 της κυτταροκερατίνης, με αποτέλεσμα να μην μπορεί πλέον να πολυμεριστεί και να σχηματίσει νήματα. Αντίθετα, συσσωρεύεται σε κυτταροπλασματικές συστάδες. Ένα σύνθετο σύστημα ενδιάμεσων νημάτων βοηθά στη διατήρηση της μηχανικής ακεραιότητας των κυττάρων και οι διαταραχές στο δίκτυο κάνουν το μολυσμένο κύτταρο πιο ευπαθές στη λύση.

Το δεύτερο σύστημα που διευκολύνει την απελευθέρωση των απογόνων βιρίων περιλαμβάνει την πρωτεΐνη E3 (11.6-kD). Αυτή η πρωτεΐνη, νεκρώνει τα κύτταρα καθώς συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου μόλυνσης και προάγει τη λύση τους [638] Αν και εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα από mRNAs που μεταγράφονται από τον προαγωγό της E3 κατά την πρώιμη φάση, εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα αργά κατά τη μόλυνση.

Το σύμπλεγμα E1B-55K-E4orf6-Elongins B / C-Cul5-RBX1 που προέρχεται από τον ιό, επάγει την αποικοδόμηση της ιντεγκρίνης  $\alpha 3$ , το οποίο φαίνεται να μειώνει την προσκόλληση των μολυσμένων κυττάρων στο υπόστρωμα τους. Αυτό πιθανότατα αυξάνει την εξάπλωση του ιού στο αναπνευστικό σύστημα. Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης E4orf1 με τον τομέα PDZ διακόπτει τις στενές συνδέσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και, κατά συνέπεια, πιθανώς βοηθά στη διασπορά των απογόνων ιών [639] Τέλος, οι στενές συνδέσεις διαταράσσονται επίσης από τα ελεύθερα τριμερή των ινιδίων που απελευθερώνονται από τα μολυσμένα κύτταρα τα οποία παρεμβαίνουν στον ολιγομερισμό της CAR. Αυτό πιθανότατα προωθεί επίσης την απελευθέρωση των απογόνων βιρίων στον αυλό του αεραγωγού στο αναπνευστικό σύστημα.

#### 4.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα (human embryonic kidney cells, HEK) είναι πιθανώς ο καλύτερος ξενιστής για όλους του αδενοϊούς του ανθρώπου αλλά τα κύτταρα αυτά έχουν αυξημένο κόστος και μπορεί να είναι μολυσμένα με ιούς που σχετίζονται με τους αδενοϊούς. Οι συνεχείς κυτταρικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων όπως είναι η HEp-2, HeLa, KB, HEK 293 και A549, είναι επίσης πολύ ευαίσθητες. Οι αδενοϊοί προκαλούν χαρακτηριστικό κυτταροπαθητικό αποτέλεσμα (cytopathic effect, CPE) σε μονοστοιβάδες κυτταροκαλλιέργειας. Τα κύτταρα παρουσιάζονται στρογγυλεμένα, διογκώνονται και αποσπώνται από την επιφάνεια της καλλιέργειας, είναι σε συστάδες που μοιάζουν με «σταφύλια» και οι πυρήνες διευρύνονται. Τελικά τα κύτταρα λύνονται, αφήνοντας κυτταρικά υπολείμματα. Αυτό το κυτταροπαθητικό αποτέλεσμα οφείλεται στη μετάβαση στο «τελευταίο» στάδιο της μόλυνσης, όταν το

DNA του αδενοϊού, το mRNA και οι πρωτεΐνες παράγονται σε μεγάλες ποσότητες και τα βίρια συγκροτούνται στον πυρήνα των κυττάρων. Οι αδενοϊοί αυξάνουν τη γλυκόλυση σε συνεχείς κυτταρικές σειρές και έτσι προκαλούν την παραγωγή μεγάλης ποσότητας οξέος από τα κύτταρα. Η ταχεία κυτταροπαθογόνος δράση μπορεί να προκληθεί μερικές ώρες μετά από ενοφθαλμισμό παρασκευάσματος συμπυκνωμένου ακατέργαστου ιού και δεν σχετίζεται με την αντιγραφή του ιού. Αντίθετα, προκαλείται από συστατικά της πεντονικής βάσης των ελεύθερων ικών πεντονικών καψομεριδίων.

Οι μορφολογικές μεταβολές του πυρήνα στα μολυσμένα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικούς σκοπούς. Οι μεταβολές αυτές περιλαμβάνουν τη συνολική διεύρυνση του πυρήνα και την παρουσία ενδοπυρηνικών έγκλειστων τα οποία αρχικά είναι Feulgen αρνητικά και εωσινόφιλα, αλλά γίνονται Feulgen θετικά και βασεόφιλα καθώς η μόλυνση εξελίσσεται. Τα έγκλειστα που είναι Feulgen θετικά περιέχουν αδενοϊούς όπως φαίνεται με ηλεκτρονική μικροσκοπία και το DNA των ιών συμβάλλει στη χρώση Feulgen. Επιπλέον, υπάρχουν παρακρυσταλλικά συσσωματώματα που περιέχουν ική πρωτεΐνη χωρίς νουκλεϊνικό οξύ.

#### 4.6. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Η λοίμωξη από αδενοϊούς προκαλεί αναστολή της σύνθεσης του DNA, των mRNA και των πρωτεϊνών του κυττάρου. Το μολυσμένο κύτταρο εκφυλίζεται με ειδικούς τρόπους που βοηθούν στη διάγνωση της λοίμωξης από αδενοϊούς μετά από βιοψία ή αυτοψία του ιστού. Τα προσβεβλημένα αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα στην πνευμονία που οφείλεται σε αδενοϊό, έχουν διευρυμένους πυρήνες που περιέχουν αμφίφιλα ή βασεόφιλα έγκλειστα.

Μία από τις δομικές πρωτεΐνες των αδενοϊών, η πεντονική βάση, που παράγεται σε πολύ μεγαλύτερη περίσσεια από ό,τι απαιτείται για τη συγκρότηση των ικών σωματιδίων, δεσμεύεται με τις ιντεγκρίνες ανβ3 και ανβ5 μέσω ενός μοτίβου αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού (arginine-glycine-aspartate, RGD) στην πεντονική βάση 28 και προκαλεί ταχεία αποκόλληση των κυττάρων στα τρυβλία της μονοστοιβάδας της κυτταροκαλλιέργειας. Έχει προταθεί ότι αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεση.

Σε κάποιες περιπτώσεις ο λεμφικός ιστός είναι υπερτροφικός και υπάρχουν ενεργά βλαστικά κέντρα. Αυτές οι μεταβολές των λεμφοκυττάρων βρίσκονται συχνά σε άμεση γειτνίαση με περιοχές όπου υπάρχουν εκφυλισμένα επιθηλιακά κύτταρα στα οποία βρίσκονται τα τυπικά ικά έγκλειστα. Τα έγκλειστα περιέχουν ικά σωματίδια σε κρυσταλλικές συστοιχίες που απεικονίζονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Μερικά από τα λεμφοκύτταρα είναι πιθανώς CD8 + CTL τα οποία αναγνωρίζουν πρωτεολυτικά πεπτιδικά προϊόντα των ικών πρωτεϊνών.

#### 4.7. ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ

Οι αδενοϊοί εισέρχονται σε ευπαθείς ξενιστές από το στόμα, το ρινοφάρυγγα ή τον επιπεφυκότα. Πρόσφατα πειράματα έχουν προσδιορίσει τους υποδοχείς των αδενοϊών [640]. Η κυτταρική πρωτεΐνη που ονομάζεται CAR (υποδοχέας coxsackie-αδενοϊού) είναι ένας υποδοχέας που μοιράζονται αυτές οι δύο ομάδες μη σχετιζόμενων ιών και είναι ο στόχος του ινιδίου σε πολλούς αν όχι σε όλους τους ορότυπους των ειδών A, C, D, E και F. Η CAR βρίσκεται στις στενές συνδέσεις των πολωμένων κυττάρων όπου επάγει την προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων. Οι αδενοϊοί του είδους B μπορούν να διαφοροποιηθούν με βάση τη χρήση των υποδοχέων τους. Οι ιοί που ανήκουν στο είδος B, ομάδα 1, (Ad16, 21, 35, 50) χρησιμοποιούν σχεδόν αποκλειστικά το CD46 ως υποδοχέα [632,641]. Αρχικά, θεωρούνταν ότι ο Ad37, ένα αδενοϊός που ανήκει στο είδος D, χρησιμοποιεί το CD46, αλλά πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι ο πιο πιθανός κύριος υποδοχέας για αυτόν τον ιό είναι η GD1a γλυκάνη. Το CD46 εκφράζεται ουσιαστικά σε όλα τα κύτταρα όπου δρα ως συν-παράγοντας για την αδρανοποίηση των συστατικών του συμπληρώματος C3b και C4b. Οι ιοί του είδους B, ομάδα 2 (Ad3, Ad7, 14) μοιράζονται τη δεσμογλεΐνη 2 ως υποδοχέα υψηλής συγγένειας [640] Η δεσμογλεΐνη 2 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που δεσμεύεται με ασβέστιο. Όταν το ινίδιο των αδενοϊών δεσμεύεται με τη δεσμογλεΐνη 2, συμβαίνει «διάνοιξη» των διακυτταρικών συνδέσεων που οδηγεί σε αυξημένη πρόσβαση στους υποδοχείς που είναι παγιδευμένοι βαθιά μέσα στη σύνδεση (δηλ. CD46 και Her2 / neu) [640]. Μια τέτοια διάσπαση των διακυτταρικών συνδέσεων μπορεί να διευκολύνει την πλευρική εξάπλωση του ιού στα επιθηλιακά κύτταρα και, ενδεχομένως, τη διείσδυση των αδενοϊών σε στρώματα υποεπιθηλιακών κυττάρων και στην κυκλοφορία του αίματος. Τέλος, οι ιοί του είδους B, της ομάδας 3 (Ad11) αλληλεπιδρούν κατά προτίμηση με το CD46 αλλά επίσης χρησιμοποιούν τη δεσμογλεΐνη 2 εάν το CD46 είναι αποκλεισμένο [640].

Οι γλυκοζαμινογλυκάνες θειικής ηπαρίνης, μπορούν να διεγείρουν την προσρόφηση των Ad2 και Ad5 στα κύτταρα, ανεξάρτητα από τον υποδοχέα CAR. Επίσης, το μόριο MHC της κατηγορίας I έχει προταθεί ως δεύτερος υποδοχέας για τον Ad5 αλλά δεν έχει επιβεβαιωθεί για άλλες ομάδες. Τρία είδη D, οι Ad8, Ad19 και Ad37, που προκαλούν EKC, φαίνεται να συνδέονται με το 2,3 συνδεδεμένο σιαλικό οξύ που βρίσκεται στο γαγγλιοζίτη GD1a στην επιφάνεια του κερατοειδούς. Αρκετές ιντεγκρίνες συμμετέχουν στην πρόσληψη των αδενοϊών στα κύτταρα αλληλεπιδρώντας με το μοτίβο RGD στην πεντονική βάση.

Οι περισσότερες από τις μελέτες που περιγράφηκαν προηγουμένως διεξήχθησαν in vitro. Πρόσφατες μελέτες μετά από συστηματική χορήγηση φορέων αδενοϊών σε ποντίκια έδειξαν ότι υπάρχει αυξημένη πιθανότητα η λοίμωξη των ιστών in vivo να είναι διαφορετική. Αυτές οι μελέτες προτείνουν ένα μοντέλο ανεξάρτητο από τον

υποδοχέα CAR, στο οποίο η μόλυνση των ηπατικών κυττάρων ποντικού από αδενοϊούς συμβαίνει μέσω της δέσμησης των αδενοϊών με παράγοντες του αίματος, ειδικά τον παράγοντα Χ, κατευθύνοντας τα σύμπλοκα στους ηπατοκυτταρικούς υποδοχείς συμπεριλαμβανομένων των πρωτεογλυκανών της θεικής ηπαρίνης. Η πιθανότητα αυτή η οδός να λειτουργεί στον άνθρωπο αποτελεί μια βασική ερώτηση. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν σαφώς ότι όλα τα είδη αδενοϊών εκτός από το είδος D, μπορούν να δεσμευτούν επιτυχώς στον παράγοντα Χ. Η αλληλεπίδραση υψηλής συγγένειας των αδενοϊών με τον παράγοντα Χ μπορεί να διευκολύνει τη "γεφύρωση" της πρωτεΐνης του εξονίου που βρίσκεται στο καψίδιο των αδενοϊών με τις πρωτεογλυκάνες της θεικής ηπαρίνης που εκφράζονται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων. Το σύμπλοκο Ad-παράγοντα Χ δεσμεύεται στην κυτταρική επιφάνεια μέσω της περιοχής της πρωτεΐνης της σερίνης του παράγοντα Χ και όχι μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης του ιού με την κυτταρική επιφάνεια [642]. Μόλις συνδεθεί στην κυτταρική επιφάνεια, η αποτελεσματική και γρήγορη ενδοκυτταρική μεταφορά του αδενοϊού, παραμένει εξαρτώμενη από τη δέσμηση των αν ιντεγκρινών μέσω της πρωτεΐνης της πεντονικής βάσης [605].

Οι οροτύποι Ad1, 2, 5 και 6 ανιχνεύονται σε αφθονία, ιδιαίτερα σε μικρά παιδιά και μπορούν να απεκκρίνονται για μήνες ειδικά μέσω των κοπράνων. Σε αυτό πιθανότατα οφείλεται η ενδημική εξάπλωση αυτών των παραγόντων μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Ο επιδημικός τύπος κερατοεπιπεφυκίτιδας που προκαλείται από αδενοϊούς (EKC), έχει διαδοθεί σε πισίνες μέσω του μολυσμένου νερού και σε ιατρικά περιβάλλοντα μέσω των μολυσμένων οφθαλμολογικών οργάνων. Ένα τρίτο μοτίβο εξάπλωσης ήταν μοναδικό, αφορούσε σε στρατιωτικό περιβάλλον και εμφανίστηκε κατά την αρχική περίοδο μετά την έναρξη λειτουργίας του στρατοπέδου. Οι Ad4 και Ad7 προκάλεσαν στους στρατιώτες οξεία αναπνευστική δυσφορία (acute respiratory distress, ARD), συμπεριλαμβανομένης της πνευμονίας, ως αποτέλεσμα ενοφθαλμισμού των ιών στο αναπνευστικό σύστημα μέσω του αέρα καθώς και μετά από επαφή με μολυσμένες επιφάνειες.

#### 4.8. ΘΕΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ

Από την αρχική εντόπιση των αδενοϊών στις αμυγδαλές και τους αδένες, έγινε σαφές ότι αυτοί οι ιστοί του οροφάρυγγα αποτελούν τις μείζονες θέσεις πρωτογενούς αντιγραφής των αδενοϊών. Για τους ορότυπους που προκαλούν αναπνευστική νόσο, η αρχική αντιγραφή πιθανότατα συμβαίνει στο αναπνευστικό επιθήλιο, αν και περιορισμένη αντιγραφή και επιμονή λοίμωξη μπορούν επίσης να συμβούν στα λεμφοκύτταρα [643]. Αυτά τα συμπεράσματα δεν βασίζονται σε παρατηρήσεις των κυττάρων *in situ* αλλά σε κύτταρα στα οποία οι αδενοϊοί αντιγράφονται σε ιστοκαλλιέργεια. Το αναπνευστικό επιθήλιο του κατώτερου αεραγωγού είναι

δύσκολο να μολυνθεί με αδενοϊούς μέσω των κορυφαίων επιφανειών καθώς δεν περιέχουν τον υποδοχέα CAR. Εντούτοις, η μεταβολή της ακεραιότητας των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων επιτρέπει τη βασοπλευρική μόλυνση τέτοιων πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων μέσω του υποδοχέα CAR.

#### 4.9. ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΚΑΙ ΤΡΟΠΙΣΜΟΣ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ

Οι περισσότερες από τις εκδηλώσεις της λοίμωξης από αδενοϊούς αφορούν στα μάτια και στο φάρυγγα τοπικά, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει επέκταση και στους πνεύμονες. Ένας πιθανός μοριακός μηχανισμός που διευκολύνει την εξάπλωση του ιού από το αναπνευστικό επιθήλιο είναι ότι η πρωτεΐνη του ινιδίου, η οποία συντίθεται σε μεγάλη περίσσεια στο μολυσμένο κύτταρο και απελευθερώνεται όταν το κύτταρο λυθεί, συνδέεται με τον υποδοχέα CAR στη βασοπλευρική επιφάνεια. Αυτή η δέσμευση διασπά τα ομοδιμερή της CAR στις στενές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων, αυξάνοντας έτσι την παρακυτταρική διαπερατότητα. Αυτό με τη σειρά του επιτρέπει στον ιό να διαφύγει στην κορυφαία επιφάνεια του αναπνευστικού επιθηλίου, καθιστώντας έτσι δυνατή τη μόλυνση άλλων περιοχών της αναπνευστικής οδού [644]. Παρομοίως, για τους ιούς του είδους Β που δεσμεύονται με τη δεσμογλεΐνη 2, αυτή η δέσμευση έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των διακυτταρικών συνδέσεων και μπορεί να διευκολύνει την εξάπλωση του ιού τοπικά και σε βαθύτερα στρώματα του ιστού, επιτρέποντας την πρόσβαση στην κυκλοφορία του αίματος [640]. Ακόμη και στο μοντέλο ποντικού μη αναπαραγόμενης μόλυνσης από τον αδενοϊό του ανθρώπου, ο ιός μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή στους πνεύμονες, γεγονός που αποτελεί ισχυρό αποδεικτικό στοιχείο για την επέκταση σε αυτά τα όργανα-στόχους [629]. Οι αδενοϊοί έχουν καλλιεργηθεί από το αίμα κατά τη διάρκεια θανατηφόρου αναπνευστικής νόσου, γεγονός που υποδηλώνει την διάδοση λόγω της αιμίας σε κάποιες καταστάσεις. Καθώς η CAR βρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η αιμία μπορεί να προάγεται από την πρωτεΐνη του ινιδίου μέσω του μηχανισμού που περιγράφηκε προηγουμένως. Η επιτυχής χρήση στους στρατιωτικούς ζωντανών, μικροενθυλακωμένων εμβολίων έναντι των αδενοϊών που λαμβάνονται από το στόμα για την πρόληψη του ARD, υποδηλώνει ότι εάν η αναπνευστική οδός μπορεί να παρακαμφθεί φυσικά από τους Ad4 και Ad7, η αντιγραφή του ιού στο έντερο οδηγεί μάλλον σε ανοσοποίηση παρά σε λοίμωξη. Αν και οι περισσότεροι αδενοϊοί αντιγράφονται στο έντερο χωρίς να προκαλούν γαστρεντερίτιδα, οι Ad40 και 41 είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση εντερικής νόσου. Η νόσος που προκαλείται στην ουροδόχο κύστη από αδενοϊούς, προκαλείται κατά κύριο λόγο από τα είδη Β σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και υποδεικνύει ότι πιθανώς ο ιός φθάνει σε αυτό το όργανο λόγω της αιμίας. Για αυτούς τους ορότυπους του είδους Β, οι οποίοι βρίσκονται λιγότερο συχνά στο έντερο και είναι πιο συχνόι στους νεαρούς άνδρες από ό,τι στις γυναίκες, δεν υπάρχουν στοιχεία για

αύξουσα μόλυνση. Η οδός μόλυνσης του ήπατος, ειδικά σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με μεταμόσχευση ήπατος, είναι άγνωστη, αλλά ορισμένοι ενδέχεται να μολυνθούν από αδenoϊούς που βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση σε κύτταρα όπως τα λεμφοκύτταρα στο μόσχευμα.

#### 4.10. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

Στους αεραγωγούς, ο ιός πρέπει να διεισδύσει στο υγρό της επιφάνειας και το σιαλικό οξύ που υπάρχει στην βλέννα μπορεί να δεσμεύσει και να αναστείλει τους αδenoϊούς του είδους D που χρησιμοποιούν το σιαλικό οξύ ως υποδοχέα [645]. Ο ιός πρέπει επίσης να επιβιώσει από τις χυμικές άμυνες του ξενιστή. Αυτές περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία αντιμικροβιακών πεπτιδίων που είναι σε θέση να εξουδετερώνουν άμεσα τα μικρόβια. Μεταξύ αυτών των πεπτιδίων είναι οι ντεφενσίνες, μια οικογένεια μικρών κατιονικών αμφιπαθητικών πεπτιδίων που χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις α- και τις β-ντεφενσίνες. Οι α-ντεφενσίνες HNP1 και HD5 αποδείχθηκε ότι εξουδετερώνουν τους οροτύπους αδenoϊού των ειδών A, B1, B2, C και E, αλλά όχι των ειδών D και F [646,647]. Οι ντεφενσίνες δεσμεύουν τα σωματίδια των αδenoϊών εξωκυτταρικά, εμποδίζουν την απέκδυση τους, και περιορίζουν την απελευθέρωση τους από τα ενδοκυτταρικά κυστίδια [646]. Σε έναν ευαίσθητο ορότυπο δεσμεύονται χιλιάδες μόρια α-ντεφενσινών και η εξουδετέρωση του ιού εξαρτάται από τη δέσμευση τους σε μια περιοχή που καλύπτει τις πρωτεΐνες του ινιδίου και της πεντονικής βάσης [647]. Έχει προταθεί ότι η δέσμευση τους σε αυτούς τους καθοριστικούς παράγοντες αποτρέπει την απελευθέρωση του ινιδίου από το βίριο που αποτελεί το πρώτο βήμα στη διαδικασία απέκδυσης του ιικού σωματιδίου στο εσωτερικό του ενδοσώματος [647]. Η HNP1 εκφράζεται πρωτίστως σε ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και φυσικά φονικά κύτταρα (Natural killing cells, NK), ενώ η HD5 εκφράζεται κυρίως από τα κύτταρα Paneth στο έντερο [646]. Δεν είναι γνωστό εάν αυτές ή άλλες ντεφενσίνες παίζουν κάποιο ρόλο στις λοιμώξεις από αδenoϊούς στους ανθρώπους.

Όσον αφορά στην κυτταρική άμυνα, τα κυψελιδικά μακροφάγα και τα κύτταρα Kupffer παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη των φορέων αδenoϊών από τον πνεύμονα και το ήπαρ, αντίστοιχα, σε μοντέλα ποντικού. Αυτά τα κύτταρα προσλαμβάνουν γρήγορα τους φορείς και εκκρίνουν τις κυτταροκίνες φλεγμονής όπως ο TNF, η IL-6 και η IL-8. Στο μοντέλο του ποντικού, σε πνευμονία μετά από λοιμώξεις με τους αδenoϊούς του είδους C, έχει περιγραφεί ισχυρή, φλεγμονώδης απόκριση που χαρακτηρίζεται από την πρώιμη απελευθέρωση κυτταροκίνης (IL-1b, IL-6, ιντερφερόνη-g [IFN-g], IL-12 και TNF) και χημειοκίνης καθώς και διήθηση ουδετερόφιλων και μονοκυτταρων [629].

Η μόλυνση από αδενοϊό στα παιδιά έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα IL-6, IL-8 και TNF. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι μπορεί να υπάρχουν συγκεκριμένες κυτοκίνες σε παιδιατρικούς ασθενείς που έλαβαν μόσχευμα βλαστοκυττάρων με εντοπισμένη και επεμβατική-οφειλόμενη μόλυνση από αδενοϊούς. Οι ασθενείς με επεμβατική-οφειλόμενη λοίμωξη είχαν αυξημένα επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-γ, και TNF-α, καθώς επίσης και IL-17, φλεγμονώδους πρωτεΐνης των μακροφάγων 1α (MIP1α), ογκοστατίνης M (OSM) και πρωτεΐνης 10 που επάγεται από την IFN-γ- (IP10). Η επεμβατική λοίμωξη από αδενοϊούς σχετίστηκε επίσης με την ταυτόχρονη απελευθέρωση κυτταροκινών IL-1β, IL-17, IL-18, OSM, MIP-1α και IP10.

Η μόλυνση από αδενοϊούς σε καλλιεργημένα καρκινικά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος, ηπατοκύτταρα και κύτταρα παρουσίας αντιγόνου, ενεργοποιεί τις οδούς κινάσης NF-κΒ και MAP. Η επαγωγή της IL-6 και της IL-8 δεν απαιτεί έκφραση του γονιδίου του αδενοϊού και πιθανώς συμβαίνει μέσω της αλληλεπίδρασης του ιικού σωματιδίου με ιντεγκρίνες στην κυτταρική επιφάνεια. Σε ζωικό μοντέλο (αρουραίος) η διφασική κυτταρική απόκριση των μονοκύτταρων έδειξε ότι συμβαίνει πρόωγη εμφάνιση μονοκυττάρων και κυττάρων NK ακολουθούμενη από ειδικά T και B λεμφοκύτταρα. Μετά από απαλοιφή των αντι-TNF γονιδίων της E3 του αδενοϊού (14.7k, rida, ridb), η διήθηση των κυττάρων μεταβλήθηκε από απόκριση μονοκύτταρων σε απόκριση πολυμορφοκύτταρων λευκοκυττάρων. Η διαγραφή της αντι-MHC E3-grp19K πρωτεΐνης του αδενοϊού αύξησε την ένταση της φλεγμονώδους απόκρισης στο ζωικό μοντέλο του αρουραίου αλλά όχι του ποντικού [627]. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η ανοσοπαθολογία παίζει κάποιο ρόλο στην ανταπόκριση του ξενιστή στη λοίμωξη από αδενοϊό και αυτή η διαδικασία βελτιώνεται από τους αναστολείς E3 της φλεγμονώδους απόκρισης του ξενιστή [627]. Μια άλλη πρωτεΐνη του αδενοϊού, η πρωτεΐνη L4-100K, η οποία εκφράζεται στα τελευταία στάδια της μόλυνσης, αναστέλλει τον θάνατο με τη μεσολάβηση του granzyme B με τη CTL16. Επομένως, δεν είναι σαφές σε αυτό το σημείο εάν οι επιζήμιες επιδράσεις της λοίμωξης από αδενοϊό στο κύτταρο ή οι ανοσοαποκρίσεις του ξενιστή στον παθογόνο παράγοντα είναι υπεύθυνες για την παθολογία των ιστών και τις κλινικές εκδηλώσεις.

Η επαγωγή των ιντερφερονών τύπου I (α και β) είναι μέρος της έμφυτης απόκρισης στη λοίμωξη από αδενοϊό. Οι αδενοϊοί έχουν τουλάχιστον δύο μηχανισμούς για να εξουδετερώσουν αυτές τις ιντερφερόνες. Πρώτον, οι πρωτεΐνες E1A αποκλείουν τη συναρμολόγηση των παραγόντων μεταγραφής που επάγονται την ιντερφερόνη και δεύτερον, το VA-RNAI, ένα RNA 159 νουκλεοτιδίων, δεσμεύεται με την πρωτεϊνική κινάση που ονομάζεται PKR, αποτρέπει την ενεργοποίησή της από δίκλωνο RNA και έτσι εμποδίζει την PKR να φωσφορυλιώσει τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης eIF2 και να τερματίσει την πρωτεϊνική σύνθεση.

Μετά τη μόλυνση, οι περισσότεροι ασθενείς αναπτύσσουν ειδικά αντισώματα έναντι της ομάδας και του τύπου του μολυσματικού στελέχους του αδενοϊού. Τα αντισώματα που είναι ειδικά για την ομάδα του ιού δεν είναι εξουδετερωτικά, αλλά είναι χρήσιμα για την εκτίμηση της απόκρισης του ασθενούς όταν υπάρχει υποψία μόλυνσης από αδενοϊό, αλλά δεν έχει επιτευχθεί απομόνωση του στελέχους. Σε αυτή την περίπτωση, εξετάζονται ζεύγη ορών κατά την οξεία και κατά τη φάση της ανάρρωσης με αρκετές εβδομάδες διαφορά μεταξύ τους. Από την εξέταση αυτή μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων που είναι ειδικά για την ομάδα του αδενοϊού όπως αυτά που μετρώνται με CF, IF ή ELISA, χρησιμοποιώντας εκχύλισμα καλλιέργειας ιστού μολυσμένου με τον ιό ή κεκαθαρμένο εξόνιο από έναν τύπο αδενοϊού. Τα αντισώματα που είναι ειδικά για τον τύπο ανιχνεύονται είτε με τη δοκιμή εξουδετέρωσης είτε με την αναστολή αιμοσυγκόλλησης. Είναι σαφές ότι οι ασθενείς μπορεί να συνεχίσουν να απεκκρίνουν ιικά σωματίδια κατά διαστήματα, ειδικά με τα κόπρανα τους, για πολλούς μήνες μετά την επιτυχή χυμική ανοσοαπόκριση. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα μπορεί να είναι προστατευτικά έναντι της εκδήλωσης της νόσου στον ξενιστή που έχει μολυνθεί προηγουμένως ή έναντι της επαναμόλυνσης με τον ίδιο ορότυπο, αλλά δεν είναι ικανά να εξαλείψουν την κατάσταση του φορέα. Πρόσφατες μελέτες έχουν αρχίσει να αναγνωρίζουν την απόκριση των T-κυττάρων στη μόλυνση από αδενοϊούς. Αν και στον άνθρωπο αρχικά περιγράφηκαν CD4+ T κύτταρα που ήταν ειδικά για τον αδενοϊό, πρόσφατες μελέτες ανίχνευσαν και χαρακτήρισαν CD8+ T κύτταρα. Αυτά τα CD4+ και CD8+ T κύτταρα συχνά παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των διαφορετικών ορότυπων αδενοϊών και πολλοί από τους επιτόπους έχουν χαρτογραφηθεί στις συντηρημένες περιοχές του εξονίου. Αν και δεν είναι γνωστό εάν αυτοί οι επίτοποι των T-λεμφοκυττάρων είναι προστατευτικοί εναντίον των αδενοϊών στους ανθρώπους, πιθανότατα γενικά τα T κύτταρα είναι προστατευτικά επειδή το απόλυτο επίπεδο λεμφοκυττάρων και CD4+ T κυττάρων συσχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα στην περίπτωση μόλυνσης από αδενοϊό και παρουσίας ιαμίας σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή μετά από μεταμόσχευση [648,649].

Παρόλο που οι εγχύσεις λεμφοκυττάρων από δότη μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ασθενείς μολυσμένους με αδενοϊό που είναι λήπτες μοσχεύματος βλαστοκυττάρων με στόχο τη βελτίωση της έκβασης της νόσου, δυνητικά, μπορεί να αναπτυχθεί νόσος απειλητική για τη ζωή του ασθενούς (graft-versus-host disease, GVHD). Η μεταφορά CTL έναντι του αδενοϊού μπορεί να οδηγήσει σε ταχεία ανασύσταση της ανοσίας έναντι των αδενοϊών μετά από μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων χωρίς να προκληθεί GVHD [648–650]. Πλέον, αναπτύσσονται μέθοδοι για την ενεργοποίηση και την επέκταση των T κυττάρων in vitro, και αυτές οι παρεμβάσεις φαίνεται να είναι μια ελπιδοφόρα πιθανή θεραπεία για τους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με σοβαρές λοιμώξεις από αδενοϊό [613,649,651,652].



#### 4.11. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΥΝΑΜΗ

Δεν είναι γνωστό γιατί ορισμένοι ορότυποι προκαλούν χαρακτηριστική νόσο με στόχο ορισμένα όργανα και όχι άλλα. Από τα πειράματα σε καλλιέργειες ιστών και στα ζωικά μοντέλα δεν έχουν προκύψει απαντήσεις γύρω από τους μηχανισμούς τροπισμού στους ιστούς ή την ειδική προς τα όργανα παθογένεια. Από τη βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδιωμάτων πολλών αδενοϊών δεν έχει προκύψει τίποτα προφανές που να εξηγεί τις διαφορές στην παθογένεια, αν και οι περισσότερες διαφορές μεταξύ των ειδών εντοπίζονται στην περιοχή E3 [611]. Σε σχέση με τον υποδοχέα, οι περισσότεροι αδενοϊοί μπορούν να συνδεθούν στην CAR, και επομένως είναι απίθανο αυτός ο υποδοχέας να μπορεί να εξηγήσει τις διαφορές στον *in vivo* τροπισμό των διαφόρων οροτύπων [653].

#### 4.12. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι ορότυποι αδενοϊού του ανθρώπου γενικά δεν είναι παθογόνοι για τα ζώα και οι αδενοϊοί των ζώων είναι παθογόνοι μόνο για το είδος από το οποίο προέρχονται. Εντούτοις, κάποια είδη πιθήκων κατά καιρούς έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντισώματα έναντι του Ad12 του ανθρώπου, και αντισώματα έναντι των αδενοϊών των πιθήκων έχουν ανιχνευθεί σε ανθρώπους. Πρόσφατα, ένας νέος αδενοϊός που ονομάζεται αδενοϊός των μαϊμούδων Titi, ο οποίος προκάλεσε θανατηφόρο πνευμονία και ηπατίτιδα σε μια κλειστή αποικία των μαϊμούδων titi στην Καλιφόρνια, προκάλεσε επίσης λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος σε έναν ερευνητή που ήταν σε στενή επαφή με τις μαϊμούδες και η μόλυνση εξαπλώθηκε σε ένα μέλος της οικογένειας του [617]. Η διερεύνηση 81 τυχαίων δειγμάτων αίματος ενηλίκων έδειξε την παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι αυτού του ιού σε δύο άτομα. Επιπλέον είναι ενδιαφέρον ότι αδενοϊοί που απονώθηκαν από μεγάλους πιθήκους σχετίζονται φυλογενετικά με τους αδενοϊούς του ανθρώπου που ανήκουν στα είδη B, C και E, γεγονός που είναι σε συμφωνία με την πιθανότητα μετάδοσης των ιών μεταξύ των ειδών κάποια χρονική στιγμή. Ωστόσο, η συχνή μετάδοση των ιών μεταξύ διαφορετικών ειδών δεν είναι πιθανή [654].

Στον άνθρωπο, η μετάδοση των αδενοϊών και η νόσος που προκαλούν ποικίλλουν από τη σποραδική μέχρι την επιδημική μορφή. Το μοτίβο μετάδοσης συσχετίζεται συχνά με τον ορότυπο του ιού και την ηλικία (παιδιά ή ενήλικες) του ευπαθούς πληθυσμού. Ένα μεγάλο μέρος της επιδημιολογίας των αδενοϊών έγινε γνωστό από μελέτες παρατήρησης όπως αυτή που πραγματοποιήθηκε στη Νέα Υόρκη και στο Σιάτλ, συμπεριλαμβανομένης της μεγάλης συχνότητας επαναλαμβανόμενης απέκκρισης, ιδιαίτερα των οροτύπων που βρίσκονται σε μικρότερο αριθμό, μέσω των κοπράνων. Μέχρι στιγμής, έχει τεκμηριωθεί η ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού

ασυμπτωματικών λοιμώξεων από αδενοϊούς. Στα παιδιά η πιο συχνή οδός μετάδοσης είναι η κοπρανοστοματική. Η αρχική εξάπλωση μπορεί να συμβεί μέσω της αναπνευστικής οδού, αλλά η παρατεταμένη μεταφορά στο έντερο καθιστά τα κόπρανα την πιο συνήθη πηγή τόσο κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της νόσου όσο και κατά την περιοδική φάση απέκκρισης του ιού. Η επιδημιολογική σημασία της μεγάλης λανθάνουσας περιόδου στον ιστό των αμυγδαλών δεν είναι γνωστή.

Οι αδενοϊοί εκτιμάται ότι προκαλούν το 8% της κλινικά σχετικής ιογενούς νόσου παγκοσμίως. Το ποσοστό αυτό αντιπροσωπεύει πιθανώς το 3% των λοιμώξεων στον πληθυσμό και περίπου το 5% έως 10% αν ληφθούν υπόψιν μόνο οι φλεγμονώδεις νόσοι. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τα μικρά παιδιά είναι περίπου 5% και 10% αντίστοιχα. Σε μια πρόσφατη μελέτη που βασίστηκε σε εξέταση δειγμάτων με PCR, το 4,4% των παιδιατρικών ασθενών με διάρροια στην Ασία είχαν PCR θετικό αποτέλεσμα στα κόπρανα, με τους Ad40 και 41 να είναι οι πιο διαδεδομένοι ορότυποι. Σύμφωνα με έρευνα που διεξήχθη στο Μάντσεστερ (Ηνωμένο Βασίλειο), το 61,3% των ασθενών με λοίμωξη από αδενοϊό ήταν ηλικίας κάτω των 5 ετών, το 24,2% ήταν ενήλικες και το 5,6% ήταν παιδιά ηλικίας 5 έως 18 ετών. Οι επικρατέστεροι ορότυποι ήταν οι Ad2 (18,6%), Ad3 (14,9%), Ad1 (12,1%) και Ad41 (10,9%). Ενώ οι Ad2, 1 και 41 απομονώθηκαν κυρίως από βρέφη, ο Ad3 και λιγότερο συχνά ο Ad4 (8,3%), ανακτήθηκαν από ενήλικες.

Κάποιες εκτιμήσεις για τον επιπολασμό της λοίμωξης από αδενοϊούς προέκυψαν από ορολογικές έρευνες. Οι πρώτες έρευνες έδειξαν ότι τα αντισώματα έναντι των Ad1, 2 και 5 είναι τα πιο κοινά και είναι παρόντα στο 40% έως 60% των παιδιών. Η επίπτωση των αντισωμάτων έναντι των Ad3, 4 και 7 ήταν χαμηλή στις ίδιες ηλικίες. Αυτά τα αποτελέσματα εξηγούν πιθανώς γιατί οι ενήλικες δεν μολύνονται συχνά με τους Ad1, 2 και 5 αλλά είναι πιο ευπαθείς σε λοιμώξεις με τους Ad3, 4 και 7. Κατά τη διάρκεια της επιτήρησης του ιού σε μελέτες παρακολούθησης, μόνο στο 75% των περιπτώσεων που υπήρξε απομόνωση του αδενοϊού, συνυπήρχε και ανοσολογική απόκριση με την ανίχνευση αντισωμάτων μέσω της δοκιμής CF.

Πρόσφατες έρευνες έδωσαν πρόσθετες επιδημιολογικές πληροφορίες. Στην Υποσαχάρια Αφρική βρέθηκαν εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του Ad5 στο 80% έως 90% του πληθυσμού [655–657]. Σε μία ορολογική μελέτη από την Αφρική, ο οροεπιπολασμός έναντι του Ad5 ήταν πολύ υψηλός στα νεογνά (93%, με το 48% να παρουσιάζει τίτλους εξουδετερωτικών αντισωμάτων μεγαλύτερους από 1.000) και συσχετίστηκε με τον τίτλο αντισωμάτων της μητέρας. Είναι ενδιαφέρον ότι ο οροεπιπολασμός ήταν 13% σε άτομα ηλικίας 6 μηνών έως 1 έτους, 28% στην ηλικία 1 έως 2 ετών και στην ηλικία των 7 ετών έφθασε στα υψηλά επίπεδα των ενηλίκων. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα νεογνά αποκτούν μητρικά αντισώματα, τα οποία μειώνονται μετά τη γέννηση, αλλά τα παιδιά αποκτούν νέες λοιμώξεις καθώς μεγαλώνουν. Ο οροεπιπολασμός έναντι του Ad5 ήταν 40% έως 70% στην Ιαπωνία,

περίπου 85% στην Κίνα (το 54% με τίτλους εξουδετερωτικών αντισωμάτων υψηλότερους του 1000), 70% έως 80% στη Βραζιλία (το 14% με τίτλους εξουδετερωτικών αντισωμάτων υψηλότερους του 1000), [656] σχεδόν 100% στη βόρεια Ινδία, με το 25% των ατόμων να έχουν τίτλους εξουδετερωτικών αντισωμάτων υψηλότερους του 1000 και το 31% να έχει πολύ υψηλούς τίτλους (υψηλότερους από 10.000) [658] και 82% έως 94% στην Ταϊλάνδη [655,656]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο οροεπιπολασμός έναντι του Ad5 κυμάνθηκε από 30% έως 70% σε διάφορες μελέτες [655,656]. Στην Ευρώπη, ο οροεπιπολασμός έναντι του Ad5 ήταν 50% έως 60% [656].

Ο Ad6 (είδος C) είναι υπό αξιολόγηση ως φορέας εμβολίου. Παγκοσμίως, περίπου το 50% του πληθυσμού έχει εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του Ad6, αλλά κυρίως σε χαμηλούς τίτλους [656]. Για τον Ad2, ο οποίος σχετίζεται στενά με τον Ad5 και τον Ad6 όσον αφορά τη δομή και τις κλινικές ιδιότητες, διαπιστώθηκε 83% οροεπιπολασμός σε ασθενείς από τη Φιλαδέλφεια.

Έχουν επίσης διεξαχθεί ορολογικές μελέτες για πιο σπάνιους ορότυπους, καθώς αυτοί οι ορότυποι είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς. Για τον Ad35 (είδος B), ο οροεπιπολασμός εκτιμάται ότι είναι μεταξύ 0% 25 και 10% στις Ηνωμένες Πολιτείες, λιγότερο από 10% στην Ευρώπη, περίπου 15% στην Ιαπωνία και την Ταϊλάνδη και περίπου από 3% έως 20% στην Υποσαχάρια Αφρική [655].

Για τον Ad11 (είδος B), ο οροεπιπολασμός είναι 10% έως 30% στην υποσαχάρια Αφρική και την Ιαπωνία αντίστοιχα. Ο οροεπιπολασμός για τον Ad26 (είδος D) είναι 10% (με χαμηλούς τίτλους αντισωμάτων) στις Ηνωμένες Πολιτείες [656], 44% στη Βραζιλία, 10% και 50% στην Ταϊλάνδη [656] και περίπου 20%, 1 έως 50%, [655,656] και 60% έως 80% στην Υποσαχάρια Αφρική. Έτσι, ο Ad26 δεν θεωρείται σπάνιος ορότυπος. Οι Ad49 και Ad50 είναι σπάνιοι στις περισσότερες περιοχές της υποσαχάριας Αφρικής, αλλά ο Ad48 είναι συχνότερος στην Ανατολική Αφρική [655]. Για τον Ad36 (είδος D), ο οποίος έχει συνδεθεί με αυξημένη παχυσαρκία, τα εξουδετερωτικά αντισώματα ανιχνεύονται σπάνια στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ταϊλάνδη, αλλά βρέθηκαν περίπου στο 50% του πληθυσμού στη Βραζιλία και σε μέρη της Υποσαχάριας Αφρικής [656]. Ο οροεπιπολασμός για τον Ad28 είναι μικρότερος από 10% στις Ηνωμένες Πολιτείες.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ορολογικές μελέτες που περιγράφηκαν προηγουμένως αναφέρονται κυρίως στην παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Γενικά, ο επιπολασμός των συνολικών αντισωμάτων έναντι του αδενοϊού είναι υψηλότερος. Περαιτέρω, σχεδόν όλα τα ενήλικα άτομα έχουν ειδικά για τους αδενοϊούς T λεμφοκύτταρα, κυρίως CD4 + αλλά και CD8+ [631,659,660]. Αυτές οι αναλύσεις των T-λεμφοκυττάρων δεν προσδιορίζουν τον ορότυπο για τον οποίο είναι

ειδικά και τα T λεμφοκύτταρα φαίνεται να είναι ευρέως αντιδραστικά λόγω της παρουσίας διασταυρούμενων αντιδραστικών επιτόπων (συχνά στο εξόνιο).

#### 4.13. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Οι αδενοϊοί συχνά μολύνουν και αναπαράγονται σε διάφορες θέσεις της αναπνευστικής οδού καθώς επίσης και στον οφθαλμό και στο γαστρεντερικό σωλήνα. Λιγότερο συχνά, οι αδενοϊοί μολύνουν την ουροδόχο κύστη και το ήπαρ. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσουν νόσο σε άλλα όργανα, όπως το πάγκρεας, το μυοκάρδιο ή το κεντρικό νευρικό σύστημα, το οποίο μπορεί να εμπλέκεται στην πρόκληση μηνιγγιοεγκεφαλίτιδας. Παρόλο που υπάρχουν τουλάχιστον 57 διαφορετικοί ορότυποι αδενοϊών του ανθρώπου, η νόσος σχετίζεται τις περισσότερες φορές μόνο με το ένα τρίτο αυτών των ορότυπων. Πολλές μολύνσεις από αδενοϊούς είναι υποκλινικές και έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων που πιθανώς είναι προστατευτικά έναντι της εξωγενούς επανεισαγωγής του ίδιου ορότυπου του αδενοϊού. Ωστόσο, ο ίδιος ο ιός μπορεί να αναπτυχθεί, ειδικά από τον γαστρεντερικό σωλήνα και το αναπνευστικό σύστημα, μήνες μετά την αρχική μόλυνση και ανοσοαπόκριση. Η συσχέτιση των αδενοϊών με την εν λόγω νόσο συχνά αποδίδεται στην ανίχνευση του ιού ή αντισωμάτων έναντι του ιού στο αίμα ή στην ανίχνευση του ιού σε συγκεκριμένο ιστό. Συχνά χρησιμοποιούνται πολύ ευαίσθητες τεχνικές όπως η ένθετη PCR (nested PCR). Είναι σημαντικό να έχουμε κατά νου ότι η παρουσία του ιού ή του ιικού DNA σε κλινικά δείγματα δεν συνεπάγεται αναγκαστικά μια σχέση αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ του ιού και της νόσου, ειδικά όταν έχει χρησιμοποιηθεί PCR ή ένθετη PCR. Δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί εάν και πώς ο αδενοϊός παραμένει σε πολύ χαμηλά επίπεδα στον άνθρωπο, οπότε είναι πιθανό η ανίχνευση του αδενοϊού να είναι απλώς μια σύμπτωση. Από την άλλη πλευρά, η ανίχνευση του ιού δεν πρέπει να αγνοείται.

##### 4.13.1. ΔΙΑΡΡΟΙΑ

Η σχέση μεταξύ των αδενοϊών και της διάρροιας είχε ένα μακρύ και περίπλοκο ιστορικό αλλά έχει πλέον ξεκαθαριστεί [667]. Επειδή πολλοί αδενοϊοί αντιγράφονται αποτελεσματικά στο έντερο και απεκκρίνονται στα κόπρανα, θεωρήθηκε ότι μπορεί να είναι πιθανό αίτιο πρόκλησης διάρροιας. Εντούτοις, σε γενικές γραμμές, στις περισσότερες παλαιότερες επιδημιολογικές μελέτες δεν βρέθηκε διαφορά ως προς την απομόνωση στελεχών μεταξύ των μαρτύρων και των πασχόντων με διάρροια υποδεικνύοντας ότι οι αδενοϊοί δεν πρέπει να συνδεθούν με ένα ολόκληρο φάσμα νόσων μόνο και μόνο επειδή μπορούν να καλλιεργηθούν από τα κόπρανα ενός ατόμου που νοσεί. Τα ασυμπτωματικά παιδιά μπορεί να απεκκρίνουν τους

αδενοϊούς στα κόπρανα τους και συχνά αναπτύσσουν αντισώματα έναντι του συγκεκριμένου τύπου. Αυτές οι υποκλινικές λοιμώξεις πιθανώς έχουν ως αποτέλεσμα τη δια βίου ανοσία.

Το θέμα των αδενοϊών ως αιτία παιδικής γαστρεντερίτιδας επανεξετάστηκε με βάση την παρατήρηση ότι αρχικά "μη καλλιεργήσιμοι" αδενοϊοί αναγνωρίστηκαν μετά από εξέταση επιχρισμάτων κοπράνων προσβεβλημένων παιδιών στο ΕΜ. Αρκετοί από αυτούς τους "μη καλλιεργήσιμους" ιούς έχουν αναγνωριστεί με ορολογικές μεθόδους όπως η ELISA και εναλλακτικά συστήματα κυτταροκαλλιέργειας κυττάρου ξενιστή, όπως η σειρά HEK. Δύο διαφορετικοί εντερικοί αδενοϊοί, οι Ad40 και 41, έχουν συσχετιστεί με διάρροια.

Για την εκτίμηση της σημασίας των αδενοϊών έχουν πραγματοποιηθεί επιδημιολογικές μελέτες σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες. Μια αναφορά 14 περιπτώσεων διάρροιας που σχετίστηκαν με αδενοϊούς σε 27 νοσηλευόμενους ασθενείς που μελετήθηκαν σε περίοδο 12 εβδομάδων, έδειξε ότι αυτοί οι ιοί μπορεί να αποτελέσουν σημαντική αιτία οξείας γαστρεντερικής νόσου σε νοσηλευόμενα μικρά παιδιά και μπορεί να μεταδοθούν ενδονοσοκομειακά. Φάνηκε επίσης ότι τα αναπνευστικά συμπτώματα μπορεί να είναι ένα σημαντικό μέρος των κλινικών εκδηλώσεων. Η επίπτωση της γαστρεντερίτιδας που σχετίζεται με αδενοϊούς διαφέρει σημαντικά στις διάφορες μελέτες και τοποθεσίες που αναφέρθηκαν από πολλούς συγγραφείς. Γενικά, δεν είναι τόσο διαδεδομένη όσο η διάρροια από ροταϊούς, εμφανίζεται συχνότερα σε παιδιά ηλικίας κάτω των 4 ετών και δεν είναι εύκολο να διακριθεί κλινικά από τη λοίμωξη από ροταϊούς. Στο Μπαγκλαντές, ήταν υπεύθυνοι για το 2,8% των περιπτώσεων διάρροιας, αλλά έφθασε στο 12,3% σε μερικούς μήνες μετά από χρήση μονοκλωνικού αντισώματος ειδικού για τους Ad40 και Ad41 για τη διάγνωση. Στα κέντρα ημερήσιας φροντίδας στο Χιούστον, το 38% από τα 249 παιδιά που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια 10 ξεχωριστών εξάρσεων κρουσμάτων, είχε διάρροια που σχετίστηκε με εντερικούς αδενοϊούς. Από αυτούς τους ασθενείς, το 46% ήταν ασυμπτωματικοί, αποδεικνύοντας ότι ακόμη και κατά τη διάρκεια των επιδημιών των εντερικών αδενοϊών, πολλά από τα μολυσμένα παιδιά δεν αναπτύσσουν γαστρεντερίτιδα. Σε άλλη μελέτη, ο επιπολασμός όλων των αδενοϊών στα κόπρανα ήταν 8% και οι Ad40 και Ad41 αποτέλεσαν το 2% και στους 565 ασθενείς με διάρροια και σε 129 μάρτυρες. Σε μια πρόσφατη μελέτη με 44 βρέφη σε κέντρο υγείας στο Τόκιο της Ιαπωνίας, ο αδενοϊός βρέθηκε στο 12,5% των δειγμάτων κοπράνων από συμπτωματικά και στο 11,5% από ασυμπτωματικά βρέφη. Μια έξαρση κρουσμάτων οξείας γαστρεντερίτιδας σε αυτά τα βρέφη συνδέθηκε με τον Ad12. Σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη που χρησιμοποιήθηκε ELISA σε 3.577 δείγματα κοπράνων από βρέφη και παιδιά με οξεία γαστρεντερίτιδα στην Ιαπωνία, την Κορέα και το Βιετνάμ κατά τη διάρκεια του 1998 και του 2001, το 4.4% ήταν θετικά για τον αδενοϊό. Σε περισσότερο από το 50% των αδενοϊών που ανιχνεύθηκαν, βρέθηκε ο Ad41, αλλά επίσης ανιχνεύθηκαν οι Ad40, 2, 3, 8 και 31. Οι εντερικοί

αδενοϊοί ανιχνεύθηκαν σε ένα τμήμα δειγμάτων κοπράνων παιδιών με γαστρεντερίτιδα σε ορισμένες χώρες, ως εξής: 6,9% στις Ηνωμένες Πολιτείες, 8% στη Σουηδία, 8,3% στη Γερμανία, 7,9% στην Ανατολική Αγγλία, Ηνωμένο Βασίλειο, 9% στο Μπέλφαστ, Ηνωμένο Βασίλειο, 1,4% στο Blantyre, Μαλάουι, 1,5% στη Βραζιλία, 6,7% στο Ιράν, 4% στην Τζακάρτα, Ινδονησία και 10,8% στο Shenzhen, Κίνα. Σε πολλές από αυτές τις μελέτες εντοπίστηκαν και μη εντερικοί αδενοϊοί, αλλά σε χαμηλότερες συχνότητες. Στην Ιαπωνία και το Ιράν, αντισώματα έναντι των εντερικών αδενοϊών ανιχνεύθηκαν στον ορό από περίπου το 50% των υγιών παιδιών που εξετάστηκαν. Έτσι, είναι σαφές ότι ο ρόλος των εντερικών αδενοϊών ως αιτία διάρροιας είναι περίπου ο ίδιος σε διάφορες περιοχές του κόσμου.

Πλέον είναι αποδεκτό ότι μεταξύ των 7 υποτύπων, ο HAdV-F που αντιπροσωπεύεται από τους τύπους 40 και 41 σχετίζεται με οξεία γαστρεντερίτιδα. Ο δείκτης επίπτωσης είναι υψηλότερος στις χώρες με χαμηλό ή μεσαίο εισόδημα (2-31%) σε σύγκριση με τις χώρες υψηλού εισοδήματος (1-8%). Άλλοι υπότυποι όπως ο HAdV-A (τύποι 12, 18 και 31), ο HAdV-C (τύποι 1, 2 και 5), ο HAdV-D (τύποι 28, 29, 30, 32, 37, 43 έως 46) και ο HAdV-G (τύπος 52) έχουν επίσης εντοπιστεί σποραδικά σε ασθενείς με γαστρεντερίτιδα, ωστόσο, ο ρόλος τους στην πρόκληση διάρροιας παραμένει ασαφής.

Οι εντερικοί αδενοϊοί μπορούν να εξαπλωθούν κατά κύριο λόγο μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Συνήθως, μετά από μία περίοδο επώασης 8-10 ημερών, η περιοδική διάρροια εμφανίζεται μαζί με πυρετό χαμηλού βαθμού, εμετό, κοιλιακό πόνο και ήπια αφυδάτωση [668]. Η κλινική πορεία είναι συνήθως ήπια και αυτοπεριοριζόμενη και συνήθως διαρκεί 1-2 εβδομάδες. Ένα ξεχωριστό χαρακτηριστικό των λοιμώξεων από HAdV-40 και -41 είναι η παρατεταμένη διάρροια.

Κατά τον ίδιο τρόπο όπως και στην γαστρεντερίτιδα που παράγεται από τον ροταϊό, οι βλάβες που παράγονται από τους ορότυπους 40 και 41 στα εντεροκύτταρα οδηγούν σε ατροφία των λαχνών και αντισταθμιστική υπερπλασία στις κρύπτες, με επακόλουθη δυσαπορρόφηση και απώλεια υγρών. Μετά τη μόλυνση, αναπτύσσονται ειδικά αντισώματα στις περισσότερες περιπτώσεις και τα μη εξουδετερωτικά αντισώματα είναι χρήσιμα για τη μέτρηση της ανοσοαπόκρισης. Τα συγκεκριμένα του τύπου εξουδετερωτικά αντισώματα μπορούν να παράσχουν προστασία τόσο στην τρέχουσα ασθένεια όσο και στις επιμολύνσεις από τον ίδιο τύπο, παρόλο που οι ασθενείς μπορούν να συνεχίσουν να απεκκρίνουν τον ιό στα κόπρανα τους για μήνες μετά από μια αποτελεσματική χυμική απόκριση [667].

Μέχρι τώρα, δεν υπάρχουν φάρμακα ή εμβόλια, αλλά συνιστάται η χορήγηση αλατούχου διαλύματος από το στόμα όπως και στη διαχείριση άλλων ασθενών με διάρροια.

#### 4.13.2. ΕΓΚΟΛΕΑΣΜΟΣ

Ένα άλλο εντερικό σύνδρομο, ο εγκολεασμός, έχει συνδεθεί σε μερικούς ασθενείς με λοίμωξη από αδενοϊούς. Η «τηλεσκοπική» εισχώρηση ενός τμήματος του εντέρου στο αμέσως περιφερικότερο τμήμα αυτού, αποτελεί χαρακτηριστικό του εγκολεασμού, έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση απόφραξης και μπορεί να οφείλεται σε μεσεντερική αδενίτιδα που δρα ως σημείο αναφοράς για τη μηχανική απόφραξη. Οι αδενοϊοί (είδη C, HA ομάδα III, Ad1, 2, 5 και 6) έχουν απομονωθεί τόσο από καλλιέργειες κοπράνων όσο και από τους εμπλεκόμενους λεμφαδένες που απομακρύνθηκαν χειρουργικά. Το ποσοστό των παιδιών με εγκολεασμό που παρουσιάζουν ενδείξεις μόλυνσης από αδενοϊό είναι υψηλό όπως αποδεικνύεται μετά από απέκκριση στα κόπρανα, την ανίχνευση μετά από λήψη φαρυγγικού υλικού με βαμβακοφόρο σπειρό, την παρουσία αντισωμάτων ειδικών για τον αδενοϊό, κυτταρικών εγκλείστων αδενοϊού σε δείγματα ιστών και την αναγνώριση του αδενοϊού στο μικροσκόπιο. Τα ποσοστά που βρέθηκαν σε πολλές μελέτες κυμαίνονται από 22% έως 61%. Σχετικά με τους Ad40 και ο Ad41, δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι εμπλέκονται σε αυτό το σύνδρομο. Μια εναλλακτική εξήγηση που προτάθηκε είναι ότι η λοίμωξη από αδενοϊό μπορεί να προκαλέσει κάποια υπερευερευεθιστικότητα του λεπτού εντέρου και να οδηγήσει σε εγκολεασμό. Ωστόσο, πολλοί ασθενείς με εγκολεασμό δεν έχουν καμία ένδειξη μόλυνσης από αδενοϊό και η νόσος είναι πιθανώς πολυπαραγοντική.

#### 4.13.3. ΚΟΙΛΙΟΚΑΚΗ

Η κοιλιοκάκη είναι μια κοινή αυτοάνοση νόσος που θεωρείται ότι προκαλείται από την κατανάλωση των πρωτεϊνών των κλάσεων γλιαδίνης, ορντεΐνης και σεκαλίνης που βρίσκονται στο σιτάρι, στο κριθάρι και στη σίκαλη. Έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη E1B-55K του Ad12 και η A-γλιαδίνη, ένα κύριο συστατικό των πρωτεϊνών γλουτένης που είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την κοιλιοκάκη, παρουσιάζουν δομική ομολογία μεταξύ τους. Επιπλέον, τα T λεμφοκύτταρα από ασθενείς με κοιλιοκάκη, αναγνωρίζουν ένα συνθετικό δωδεκαπεπτιδίδιο που μοιράζεται η πρωτεΐνη E1B-55K του Ad12 και η A-γλιαδίνη. Από την άλλη πλευρά, σε τρεις μελέτες που χρησιμοποιήθηκε η PCR για να προσδιοριστεί η παρουσία επίμονης λοίμωξης από Ad12 στον εντερικό βλεννογόνο ασθενών με κοιλιοκάκη, οι τέσσερις από τους 18 ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμο DNA του Ad12, όπως και δύο από τους 24 μάρτυρες, οδηγώντας τους συγγραφείς να καταλήξουν στο συμπέρασμα ότι η ανθεκτικότητα του Ad12 δεν αποτελεί μείζον στοιχείο στην κοιλιοκάκη.

#### 4.13.4. ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΝΟΣΟΚΑΤΕΣΤΑΛΜΕΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Αν και οι αδενοϊοί δεν είναι τόσο διαδεδομένοι όσο οι διάφοροι ιοί του έρπητα σε περιπτώσεις ανοσοκαταστολής, έχουν απομονωθεί από ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές, συγκεκριμένα από ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση, και έχουν συμβάλει στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα τους [669–671]. Η ακριβής επίπτωση της νόσου που προκαλείται από τον αδενοϊό σε λήπτες μοσχευμάτων δεν έχει διευκρινιστεί επειδή οι διαθέσιμες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικούς ορισμούς για τη νόσο. Ειδικότερα, έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές διαγνωστικές τεχνικές (καλλιέργεια έναντι PCR έναντι ιστοπαθολογίας), έχουν αξιολογηθεί διαφορετικοί πληθυσμοί ασθενών και δεν έχουν διεξαχθεί μεγάλες προοπτικές μελέτες [669].

Μια άλλη κατάσταση στην οποία ο αδενοϊός συνδέεται με την ανοσοκαταστολή είναι το σύνδρομο της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS). Συνολικά, στο 12% των ασθενών με AIDS αναφέρθηκε η ανίχνευση αδενοϊών τύπου Β στα ούρα τους. Η ανάλυση του ιικού DNA από 24 στελέχη που απομονώθηκαν σε ούρα, έδειξε ότι σχετιζόνταν με τους Ad34 και Ad35. Ωστόσο, μερικά από τα στελέχη που απομονώθηκαν από ούρα ασθενών με AIDS έφεραν την αιμοσυγκολλητίνη του Ad7 όπως προέκυψε από την ορολογική ταξινόμηση, υποδεικνύοντας ανασυνδυασμό μεταξύ των Ad35 και Ad7 του είδους Β (ΗΑ ομάδα Ι).

#### 4.14. ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Ως αίτιο οξείας γαστρεντερίτιδας, οι αδενοϊοί 40/41 θα πρέπει να διαφοροποιηθούν από άλλα αίτια ιογενών αιτιών διάρροιας που συμβαίνουν ιδιαίτερα σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών. Αυτοί οι ιοί είναι οι Ροταϊοί, οι Νοροϊοί, οι Αστροϊοί και οι Σαποϊοί. Οι αδενοϊοί αποτελούν παγκοσμίως περίπου το 5-10% του ποσοστού των ιογενών γαστρεντερίτιδων. Ο κλινικός διαχωρισμός του αιτιολογικού παράγοντα μεταξύ των ιών αυτών είναι αδύνατος: Απαιτείται εργαστηριακή διερεύνηση η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση τεχνικών όπως η χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (περιορισμένη σε εργαστήρια αναφοράς), ή η κυτταροκαλλιέργεια (αργή και ακριβή διαδικασία). Τα τελευταία έτη έδαφος κερδίζουν η ανίχνευση γενετικού υλικού των ιών με τη χρήση πρωτοκόλλων PCR που μπορούν να ανιχνεύσουν όλα τα αίτια ιογενών διαρροιών σε μία αντίδραση (Multiplex PCR) ή η χρήση τεχνικών ανίχνευσης αντιγόνου των ιών αυτών (ELISA, ανοσοχρωματογραφικές μέθοδοι, συγκολλητινοαντιδράσεις με χρήση σωματιδίων latex) [668,676].

Τα σύνδρομα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος που προκαλούνται από τους αδενοϊούς ή η πνευμονία, είναι αδύνατον να διακριθούν κλινικά από άλλες ιογενείς



λοιμώξεις αυτών των οργάνων και απαιτείται εργαστηριακή διάγνωση για τον προσδιορισμό του αιτιολογικού παράγοντα.

#### 4.15. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

##### 4.15.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η συλλογή δειγμάτων από τις προσβεβλημένες περιοχές νωρίς κατά τη διάρκεια της νόσου είναι απαραίτητη για τη βελτιστοποίηση της απομόνωσης του ιού και για την ανίχνευση αντιγόνων ή νουκλεϊκού οξέος του αδενοϊού απευθείας σε κλινικά δείγματα. Η διάρκεια της απέκκρισης των αδενοϊών κατά την οξεία φάση της λοίμωξης είναι περίπου μια έως τρεις ημέρες από το λαιμό σε ενήλικες με κοινό κρυολόγημα, τρεις έως πέντε ημέρες από τη μύτη, το λαιμό, τα κόπρανα και τα μάτια από ασθενείς με πυρετό φάρυγγα-επιπεφυκότα, δύο εβδομάδες από καλλιέργεια δειγμάτων από τον οφθαλμό σε κερατοεπιπεφυκίτιδα, τρεις έως έξι εβδομάδες από το λαιμό ή τα κόπρανα των παιδιών με αναπνευστικές ή γενικευμένες νόσους και δύο έως 12 μήνες ή περισσότερο από τα ούρα, τα κόπρανα, τον φάρυγγα ή τις βιοψίες οργάνων ανοσοκατεσταλμένων ασθενών.

Οι αδενοϊοί που προέρχονται από δείγματα που λήφθηκαν με βαμβακοφόρο στυλεό από τον λάρυγγα ή τον επιπεφυκότα ή το απευθυσμένο και από ρινικές πλύσεις είναι γενικά σταθεροί σαν παθογόνοι παράγοντες και διατηρούνται στην κατάψυξη και στην αποθήκευση στους  $-70^{\circ}\text{C}$ , εάν δεν είναι δυνατός ο άμεσος ενοφθαλμισμός τους. Επειδή σε ορισμένες περιπτώσεις τα ούρα μπορεί να είναι τοξικά στις σειρές καλλιέργειας ιστών που χρησιμοποιούνται, είναι καλύτερο να απομακρυνθεί το ενοφθάλμισμα εισόδου μετά από 2 έως 4 ώρες επώασης. Αυτός ο χρόνος επιτρέπει στον ιό να απορροφηθεί πριν οι καλλιέργειες τροφοδοτηθούν εκ νέου με φρέσκο καλλιεργητικό μέσο. Όταν είναι επιθυμητές οι καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων αίματος, το ηπαρινισμένο αίμα διαχωρίζεται με τη χρήση Ficoll-Hydraque και τα κύτταρα μετά την έκλυση καλλιεργούνται σε μέσο RPMI με τη χρήση ορού εμβρύου μόσχου. Τμήματα αυτών των κυττάρων θα πρέπει επίσης να συν-καλλιεργούνται σε κύτταρα όπως τα HEK, τα οποία είναι ευπαθή στη λοίμωξη από αδενοϊό.

Μια κοινή μέθοδος για την αναγνώριση των αδενοϊών είναι η χρήση κυτταροκαλλιέργειας. Για τις αναπνευστικές λοιμώξεις, τα είδη δειγμάτων που μπορούν να ληφθούν περιλαμβάνουν το ρινοφαρυγγικό επίχρισμα, το έκπλυμα ή την αναρρόφηση, το βρογχοκυψελιδικό ή το βρογχικό έκπλυμα. Για τις οφθαλμικές λοιμώξεις, γίνεται λήψη δείγματος με τη χρήση βαμβακοφόρου στυλεού από τον μολυσμένο επιπεφυκότα. Το ενοφθάλμισμα τοποθετείται συχνά σε σωληνάρια

μονοστρωματικών κυττάρων σε περιστροφή. Οι κυτταρικοί τύποι που είναι εξαιρετικά επιτρεπτικοί για όλους του αδενοϊούς του ανθρώπου, εκτός από τους Ad40 και Ad41, είναι τα ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα (ημιμόνιμες κυτταρικές σειρές σε πολύ χαμηλή διέλευση) και τα κύτταρα HEK. Υψηλά επιτρεπτικές μόνιμες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται είναι τα A549 (πνευμονικό αδενοκαρκίνωμα), τα HeLa (καρκίνωμα του τραχήλου), τα KB (ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα) και τα HEp-2 (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα). Οι κυτταρικές γραμμές ινοβλαστών είναι λιγότερες επιτρεπτικές για τον αδενοϊό σε σχέση με τα προαναφερθέντα επιθηλιακά κύτταρα. Οι εντερικοί Ad40 και Ad41, είναι εξαιρετικά απαιτητικοί και μπορούν να αναπτυχθούν σε κύτταρα HEK293. Η ικανότητα του Ad40 να αναπτύσσεται σε κύτταρα HEK293 είναι αποτέλεσμα της λειτουργίας της πρωτεΐνης E1B-55K.

Ένα εμπορικό κιτ ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας που έχει εγκριθεί από τον FDA (Food and Drug Administration), το Adenoclone (Meridian Biosciences, Inc.), μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των αδενοϊών απευθείας σε αναπνευστικά και οφθαλμικά δείγματα ή σε δείγματα κοπράνων. Η δοκιμή αυτή είναι ικανή να ανιχνεύσει τους περισσότερους, αν όχι όλους, τους ορότυπους αδενοϊού του ανθρώπου, διαρκεί περίπου μία ώρα και μπορεί να πραγματοποιηθεί στο ιατρείο. Ωστόσο, απαιτείται υψηλή συγκέντρωση του ιού, όπως συμβαίνει εντός μιας έως τριών ημερών από την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων. Επομένως, τα αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιωθούν με κυτταροκαλλιέργεια.

Στις περισσότερες περιπτώσεις στο εργαστήριο κλινικής ιολογίας, μόλις γίνει διάγνωση για αδενοϊό, δεν διεξάγονται περαιτέρω εργασίες για τον προσδιορισμό του ορότυπου. Ωστόσο, καθώς γίνονται γνωστές περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την παθογένεια συγκεκριμένων οροτύπων του αδενοϊού και για ερευνητικούς σκοπούς, έχουν εξελιχθεί πολύ η PCR και η qPCR, καθώς και η χρήση περιοριστικών ενζύμων πέψης του ιικού DNA.

#### 4.15.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΙΩΝ

Οι παθογόνοι παράγοντες που αναπτύσσονται σε κυτταροκαλλιέργειες και επιδεικνύουν την τυπική CPE των αδενοϊών μπορούν να υποβληθούν σε περαιτέρω επεξεργασία για τον τελικό προσδιορισμό του στελέχους που απομονώθηκε. Παραδοσιακά, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι οι ορολογικές, αλλά τώρα περιλαμβάνουν επίσης τη χρήση περιοριστικών ενζύμων πέψης του ιικού DNA και ειδικότερα την ανάλυση με PCR. Η ορολογική επιβεβαίωση στην τυποποίηση των αδενοϊών μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες. Στις δοκιμές IF και CF, χρησιμοποιούνται ως αντιγόνα τα υλικά της ιστοκαλλιέργειας και αντισώματα

αναφοράς. Έτσι εξετάζονται τα χαρακτηριστικά των ομάδων των αδενοϊών, τα οποία συνήθως είναι κοινά σε όλα τα ανθρώπινα στελέχη που απομονώνονται. Η δοκιμή αναστολής της αιμοσυγκόλλησης (hemagglutination inhibition, HAI) και η δοκιμή εξουδετέρωσης ορού (serum neutralization, SN) χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση παραμέτρων που είναι ειδικές για τον τύπο του ιού, οι οποίες μπορούν να διακρίνουν τα μέλη της κάθε ομάδας.

Τα τελευταία χρόνια, η ανάλυση του DNA των αδενοϊών έχει αποκτήσει μεγάλη σημασία για την ανίχνευση των αδενοϊών σε κλινικά δείγματα και για την τυποποίηση των υποομάδων. Ο χαρακτηρισμός του ιικού DNA τόσο με υβριδισμό όσο και με τα μοτίβα που προκύπτουν μετά από χρήση περιοριστικών ενζύμων πέψης, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για κλινικά στελέχη. Λόγω μικρών διαφορών στο DNA διάφορων στελεχών, συχνά απαιτούνται πολλαπλά ένζυμα περιορισμού για την οριστική ταυτοποίηση. Παρόλο που αυτές οι μικρές διαφορές στο DNA μπορούν να κάνουν δύσκολη την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, οδηγούν σε ταυτοποίηση των στελεχών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για την επιδημιολογία και την παθογένεια του αδενοϊού.

Επί του παρόντος, οι δοκιμασίες PCR χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση, την τυποποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου του αδενοϊού σε διάφορα δείγματα ιστών και σωματικά υγρά [677,678]. Σε μία μελέτη χρησιμοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος του γονιδίου του εξονίου από όλους τους ορότυπους, ακολουθούμενη από ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (restriction fragment length polymorphism, RFLP) και προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων. Οι περισσότερες αναφορές περιγράφουν την τυποποιημένη PCR αλλά με τις αντιδράσεις να έχουν προσαρμοστεί σε μορφή multiplex στις οποίες χρησιμοποιούνται μίγματα εκκινητών και ανιχνευτών προκειμένου να είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών ορότυπων. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές είναι ελαφρά εκφυλισμένοι ως προς την αλληλουχία τους, προκειμένου να μπορούν να συμπεριλάβουν μικρές διαφορές στις αλληλουχίες του DNA μεταξύ των διαφορετικών ορότυπων. Μια προσέγγιση που θα μπορούσε να επιτρέψει την ανίχνευση των ορότυπων καθώς και πολλές παραλλαγές του γονιδιώματος των αδενοϊών 1, 3, 4, 5, 7, 11, 19, 40 και 41 ήταν η χρήση της PCR με εκκινητές ειδικούς για τη συντηρημένη περιοχή του γονιδίου του εξονίου που ακολουθείται από πέψη των αλληλουχιών που ενισχύονται με περιοριστικά ένζυμα [677]. Αυτή η δοκιμασία PCR επέτρεψε την ανίχνευση των Ad40 και Ad41 σε λωρίδες χαρτιού που είχαν προηγουμένως παρασκευαστεί με EDTA και έχουν προταθεί ως μέθοδος συλλογής, αποθήκευσης και μεταφοράς αδρανοποιημένων αδενοϊών από κόπρανα. Για τα είδη C και D έχουν εφαρμοστεί άλλες multiplex δοκιμές στις οποίες έγινε χρήση μόνο PCR με εκκινητές ειδικούς για το ινίδιο. Για το είδος B των αδενοϊών έχουν χρησιμοποιηθεί multiplex δοκιμές με εκκινητές ειδικούς για το

εξόνιο. Άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν αναπτύξει multiplex δοκιμές που βασίζονται στο ινίδιο και μπορούν να ανιχνεύσουν ορότυπους όλων των ειδών από το A έως F.

Σε μια δοκιμασία, που ονομάζεται PCR adenovirus consensus, χρησιμοποιούνται δύο εκφυλισμένοι εκκινητές ειδικοί προς το γονίδιο VA-RNA για την ενίσχυση του DNA 51 ορότυπων. Το ενισχυμένο DNA υβριδοποιείται με έναν ανιχνευτή συζευγμένο με βιοτίνη και ανιχνεύεται με ένα σύζευγμα υπεροξειδάσης στρεπταβιδίνης. Τα θετικά δείγματα μπορούν να αναλυθούν περαιτέρω με τη χρήση εκκινητών που είναι ειδικοί για το εξόνιο και ειδικοί ως προς το είδος των αδενοϊών. Αυτή η δοκιμή είναι εμπορικά διαθέσιμη (Argene). Έχουν επίσης περιγραφεί multiplex δοκιμές οι οποίες μπορούν να ανιχνεύσουν αδενοϊούς, ροταϊούς και ιούς τύπου Norwalk σε μία και μόνο αντίδραση.

Ορισμένοι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει την qPCR για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA του αδενοϊού. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον Ad4 σε κλινικά δείγματα και είναι αρκετά ευπροσάρμοστη ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνθήκες πεδίου για τη διάγνωση του ARD που προκαλείται από τον Ad4 σε νεοσύλλεκτους στρατιώτες. Η ευρεία ανίχνευση των αδενοϊών επιτεύχθηκε με τη χρήση της ένθετης qPCR σε συνδυασμό με ELISA αντιγόνου. Δύο ερευνητικές ομάδες έχουν αναπτύξει multiplex qPCR με εκκινητές και ανιχνευτές ειδικούς προς εξόνιο που μπορούν να ανιχνεύσουν όλους τους ορότυπους των ειδών A, B και C [678]. Και οι δύο δοκιμές είχαν ευαισθησία περίπου 50 έως 250 αντίγραφα DNA / mL. Σε μια άλλη μελέτη, 51 ορότυποι των ειδών A έως F μπορούσαν να ανιχνευθούν σε μία αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή και έναν ανιχνευτή που ήταν ειδικοί για μια συντηρημένη περιοχή του εξονίου. Σε μια σειρά μελετών που εκμεταλλεύτηκαν την αλληλουχία του DNA των γονιδίων του εξονίου και του ινιδίου, οι Ebner et al ανέπτυξαν μια αυστηρή δοκιμασία qPCR που μπορεί να ανιχνεύσει όλους τους ορότυπους του αδενοϊού. Οι διαφορές στις αλληλουχίες του DNA των συντηρημένων περιοχών των γονιδίων του εξονίου και του ινιδίου δεν επέτρεψαν τον σχεδιασμό μιας PCR με βέλτιστη ειδικότητα για όλους τους ορότυπους και έτσι αναπτύχθηκε μια δοκιμή PCR δύο αντιδράσεων. Μια αντίδραση κάλυψε τους ορότυπους των ειδών A, C και F και η άλλη ήταν ειδική για τα είδη B, D και E.

Οι δοκιμές PCR που επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα των αντιικών φαρμάκων σε κυτταροκαλλιέργεια και είναι χρήσιμες για την πρόβλεψη της εξέλιξης της νόσου σε συστηματική στους παιδιατρικούς και, σε μικρότερο βαθμό, στους ενήλικους λήπτες βλαστοκυττάρων [638,670,671,679,680,680]. Τέλος, τέτοιες μέθοδοι είναι χρήσιμες για την πρόβλεψη της απόκρισης των ανοσοκατασταλμένων ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για μολύνσεις από αδενοϊό στις εκάστοτε παρεμβάσεις [681]. Σε τέτοιες περιπτώσεις, μείωση του ιικού φορτίου μεγαλύτερη ή

ίση με 1 log στις επτά έως 10 ημέρες μετά την χορήγηση της πρώτης δόσης, αποτελεί θετική ένδειξη για την έκβαση της νόσου [681].

Τέλος, έχει αναπτυχθεί μια σειρά μοριακών μεθόδων που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ταυτοποίηση και τυποποίηση των στελεχών του αδενοϊού από κλινικά δείγματα [665,682–684]. Αυτές οι δοκιμές, έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση των επικρατούντων στελεχών αδενοϊού και των παραγόντων κινδύνου για την πρόκληση νόσου σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Δεδομένης της ευκολίας αυτών των συστημάτων, σε σύγκριση με τις παραδοσιακές ορολογικές μεθόδους, τα περισσότερα εργαστήρια τις χρησιμοποιούν πλέον για την τυποποίηση των ιών.

Οι διάφορες μέθοδοι PCR και qPCR έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση και μερικές φορές την ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου του αδενοϊού σε αναπνευστικά και οφθαλμικά δείγματα και στο αίμα, τον ορό και το περιφερικό αίμα από ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Επίσης, υπάρχει ένα πλήθος multiplex δοκιμών, που επικεντρώνεται στη διάγνωση αναπνευστικών και γαστρεντερικών ιογενών λοιμώξεων, που είναι σε θέση να ανιχνεύσουν τους αδενοϊούς ως μέρος μιας ομάδας άλλων ιών που προκαλούν παρόμοια κλινικά σύνδρομα [633,685].

#### 4.15.3. ΑΜΕΣΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ ΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η ταχεία διάγνωση με άμεση εξέταση κυττάρων παρουσιάζει διάφορους βαθμούς ευαισθησίας. Υπάρχουν αναφορές ότι μέσω της τεχνικής IF ήταν δυνατή η ανίχνευση μόνο του ενός τρίτου των ρινοφαρυγγικών εκκρίσεων από τις οποίες οι αδενοϊοί απομονώθηκαν στη συνέχεια σε κυτταροκαλλιέργεια. Από την άλλη μεριά, υπάρχουν αναφορές ότι η IF έχει την ίδια ευαισθησία με την απομόνωση σε κυτταροκαλλιέργεια.

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία έχει χρησιμοποιηθεί σε ειδικές καταστάσεις για την ταχεία και ειδική αναγνώριση των ιογενών παραγόντων σε κλινικά δείγματα. Η ανακάλυψη των "μη καλλιεργήσιμων" εντερικών αδενοϊών πραγματοποιήθηκε μετά από εξέταση εκχυλισμάτων κοπράνων στο EM. Η μορφολογία των αδενοϊών στο EM είναι μοναδική. Οι αδενοϊοί που ανιχνεύονται στα κόπρανα είναι κατά κύριο λόγο οι εντερικοί αδενοϊοί, οι τύποι 40 και 41. Άλλη συνήθης μέθοδος για την ανίχνευση των αδενοϊών στα κόπρανα είναι η ανοσοενζυμική δοκιμασία όπως το Adenoclone. Αυτοί οι εντερικοί αδενοϊοί μπορούν επίσης να αναπτυχθούν σε κύτταρα HEK293 και να χαρακτηριστούν περαιτέρω. Όσον αφορά σε δείγματα που λήφθηκαν από άλλα σημεία του σώματος, το ανοσολογικό EM για την ταχεία διάγνωση αναπνευστικών λοιμώξεων, ήταν ικανό να ανιχνεύσει αδενοϊούς σε 19 από 25 δείγματα που λήφθηκαν με βαμβακοφόρο στείλεό από τον φάρυγγα από τα οποία στη συνέχεια απομονώθηκαν οι αδενοϊοί με καλλιέργει. Επομένως, αν και η EM παρουσίασε χαμηλότερη ευαισθησία σε σχέση με την ιστοκαλλιέργεια, ήταν μια εξαιρετικά ταχεία

μέθοδος διάγνωσης. Ωστόσο, αυτές οι προσεγγίσεις δεν χρησιμοποιούνται γενικά για τη διάγνωση της λοίμωξης της αναπνευστικής οδού από αδενοϊούς.

#### 4.16. ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

##### 4.16.1. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Το γεγονός ότι οι αδενοϊοί αποτελούν σοβαρό πρόβλημα για τους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και αυτούς που πάσχουν από ΕΚC, αποτέλεσε το λόγο για το πρόσφατο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την ανάπτυξη αντι-αδενοϊικών φαρμάκων [639,669–671,686,687]. Τα ακυκλικά φωσφονικά νουκλεοσιδια (acyclic nucleoside phosphonates) αποτελούν μια κατηγορία φαρμάκων που είναι αποτελεσματική εναντίον πολλών DNA ιών, συμπεριλαμβανομένων των αδενοϊών [688,689]. Ένα μέλος αυτής της κατηγορίας, η (S) -9- [3- hydroxy2-(phosphonomethoxy)propyl] κυτοσίνη, γνωστή ως cidofovir, έχει μελετηθεί εκτεταμένα για τις λοιμώξεις από αδενοϊούς [688,689].

Η cidofovir είναι ένας ισχυρός αναστολέας της αντιγραφής του αδενοϊού στις κυτταροκαλλιέργειες. Σε μια μελέτη, φάνηκε ότι η cidofovir μπορεί να αναστείλει την αντιγραφή ορότυπων των ειδών A, B, D, E και F σε κύτταρα HEp-2 [690].

Η χορήγηση της cidofovir αξιολογήθηκε σε πολλές αναδρομικές μελέτες καθώς και σε αναφορές περιπτώσεων, μόνη της ή μερικές φορές σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), για τη θεραπεία συστηματικών λοιμώξεων από αδενοϊούς σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Σε πρώιμες μελέτες, η cidofovir έδειξε κάποια αποτελεσματικότητα έναντι του αδενοϊού σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με HSCT και μεταμόσχευση μυελού των οστών. Η cidofovir ήταν αποτελεσματική έναντι της αιμορραγικής κυστίτιδας που σχετίζεται με μόλυνση από αδενοϊό σε ασθενείς με μεταμόσχευση μυελού των οστών. Σε οκτώ παιδιατρικούς ασθενείς με μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων, η cidofovir φάνηκε να παρέχει μακροχρόνια καταστολή του αδενοϊού χωρίς να προκαλεί νεφροτοξικότητα ώστε να τίθενται περιορισμοί στη δόση χορήγησης. Σε μια μελέτη στην οποία 57 από τους 177 παιδιατρικούς ασθενείς με HSCT διαγνώστηκαν με λοίμωξη από αδενοϊό, οκτώ από τους οποίους έπασχαν από συστηματική νόσο, η θεραπεία με cidofovir οδήγησε σε κλινική ίαση των συμπτωμάτων σε 56 ασθενείς. Σε μια πρόσφατη μελέτη, οκτώ ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς (τρεις λήπτες HSCT, δύο λήπτες μοσχέυματος ήπατος-λεπτού εντέρου, ένας λήπτης μοσχέυματος ήπατος, ένας λήπτης με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοκαταστολή και ένας με ανεπάρκεια T-λεμφοκυττάρων) με αδενοϊναιμία και επιθετική νόσο από αδενοϊό,

παρακολουθήθηκαν με qPCR για να προσδιοριστεί η ανταπόκριση τους στη cidofovir (5 mg/kg κάθε εβδομάδα για δύο εβδομάδες, στη συνέχεια κάθε δεύτερη εβδομάδα) [681]. Πέντε ασθενείς ανταποκρίθηκαν ιολογικά και κλινικά στη cidofovir ενώ στους υπόλοιπους τρεις ασθενείς παρατηρήθηκε σταθερά η παρουσία αντιγραφής του ιού και τελικά κατέληξαν. Αξίζει να σημειωθεί, ότι υπήρξε μια σημαντική καθυστέρηση μεταξύ της έναρξης των συμπτωμάτων και της έναρξης της θεραπείας σε τρεις θανατηφόρες περιπτώσεις (μεσος χρόνος θανάτου, 18 ημέρες). Μείωση του ιικού φορτίου μεγαλύτερη από ή ίση με 1 log στις 7 έως 10 ημέρες από τη χορήγηση της πρώτης δόσης, θεωρήθηκε δείκτης πρόγνωσης για επιτυχή έκβαση [681]. Άλλες ομάδες έχουν καταγράψει παρόμοια συσχέτιση της κακής πρώιμης απόκρισης στη cidofovir και της εξέλιξης σε θανατηφόρο νόσο. Σε άλλη μελέτη, επτά παιδιατρικοί ασθενείς με HSCT ανέπτυξαν μολύνσεις υψηλού κινδύνου από αδενοϊό και αντιμετωπίστηκαν προληπτικά με ενδοφλέβια χορήγηση cidofovir (1 mg/kg τρεις φορές εβδομαδιαίως για εννέα δόσεις). Οι μολύνσεις υψηλού κινδύνου από αδενοϊό αντιμετωπίστηκαν και στους επτά ασθενείς χωρίς να παρουσιαστεί νεφροτοξικότητα.

Σε αναφορές περιπτώσεων, η cidofovir φάνηκε να είναι δραστική έναντι του αδενοϊού σε παιδιατρικούς ασθενείς που είχαν υποληθεί σε μεταμόσχευση ήπατος, και νεφρού, και λήπτες μοσχευμάτων βλαστοκυττάρων καρδιάς και νεφρού.

Συνοπτικά, από αυτά τα δεδομένα και τις αναφορές περιστατικών, προκύπτει ότι η cidofovir μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τις λοιμώξεις από αδενοϊούς καθώς έχει σημαντική δραστικότητα, αλλά η τοξικότητα της μπορεί να περιορίσει τη χρήση της. Πράγματι, μια ομάδα συγγραφέων έχει περιγράψει μια γενική προσέγγιση σύμφωνα με την οποία οι παιδιατρικοί ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων παρακολουθούνται στενά με χρήση qPCR για την παρουσία λοίμωξης από αδενοϊούς και οι ασθενείς που είναι θετικοί λαμβάνουν θεραπεία με cidofovir προληπτικά [670]. Ωστόσο, τέτοιες προσεγγίσεις δεν έχουν μελετηθεί σε ενήλικες ασθενείς. Άλλωστε, πρέπει να σημειωθεί και πάλι ότι μια σημαντική ανησυχία για τη συστηματική χρήση της cidofovir είναι η νεφροτοξικότητα και οι κυτταροπενίες που προκαλεί [688].

Λόγω της παρουσίας της φωσφορικής ομάδας στη cidofovir, αυτό το φάρμακο παρουσιάζει μικρή βιοδιαθεσιμότητα όταν λαμβάνεται από το στόμα [688,689]. Ωστόσο, έχει αναπτυχθεί μια νέα σειρά προφαρμάκων της cidofovir και άλλων ακυκλικών φωσφονικών νουκλεοσιδίων που αυξάνουν την απορρόφηση της cidofovir στο λεπτό έντερο όταν λαμβάνεται από το στόμα και διευκολύνουν την κυτταρική πρόσληψη και τον μεταβολισμό [689]. Αυτά τα προφάρμακα εισάγονται αυθόρμητα στις κυτταρικές μεμβράνες, το λιπιδικό τμήμα υδρολύεται μακριά από την C φωσφολιπάση και η ένωση μετατρέπεται στην δι- και τριφωσφορική μορφή της μέσω των κυτταρικών ενζύμων. Αυτές οι δι- και τριφωσφορικές μορφές τείνουν να παραμένουν μέσα στο κύτταρο επειδή είναι αρνητικά φορτισμένες και δεν είναι

εύκολη η διέλευση από την μεμβράνη του πλάσματος. Τα παράγωγα αλκοξυαλκυλεστέρων της cidofovir ή της (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl) αδεονίνης [(S)-HPMPA] έχει αναφερθεί ότι είναι 2 έως 3 logs πιο αποτελεσματικά από τη cidofovir ή την (S)-HPMPA στην αναστολή των οροτύπων του αδενοϊού (Ad3,5, 7, 8, 31) σε καλλιέργεια κυττάρων [616]. Αυτές οι ενώσεις είναι ευρέως φάσματος, δραστικές έναντι πολλών ιών DNA διπλής έλικας σε σύγκριση με τις μη τροποποιημένες νουκλεοβάσεις. Το hexadecyloxypropyl-cidofovir (HDP-CDV που αναπτύχθηκε ως CMX001 από την Chimerix, Inc.) ήταν η πρώτη από αυτές τις ενώσεις που συντέθηκαν, έχει χαρακτηριστεί εκτενώς *in vitro* και σε ζωικά μοντέλα και μελετάται σε κλινικές δοκιμές [689]. Σε σύγκριση με τη cidofovir, το CMX001 δεν είναι νεφροτοξικό, αν και έχει αναφερθεί κάποια τοξικότητα στο γαστρεντερικό σύστημα. Στο ζωικό μοντέλο του Syrian χάμστερ μετά από μόλυνση με Ad5, το CMX001 ήταν εξαιρετικά αποτελεσματικό στην εξάλειψη της μόλυνσης από Ad5 στο ήπαρ, τους σιελογόνους αδένες και το πάγκρεας όταν χορηγήθηκε καθημερινά από το στόμα, ξεκινώντας μία ημέρα πριν ή μέχρι δύο ημέρες μετά από ενδοφλέβια χορήγηση δόσης περίπου ίσης με την θανατηφόρο δόση 50 (lethal dose 50) του Ad5 [691]. Το CMX001 παρουσίασε επίσης αξιοσημείωτη ικανότητα εξάλειψης της συστηματικής μόλυνσης από Ad2 σε έναν παιδιατρικό ασθενή με HSCT [692]. Σε αυτόν τον ασθενή, τα επίπεδα του DNA του αδενοϊού στο πλάσμα αυξήθηκαν σε 10<sup>9</sup> αντίγραφα/mL παρά τη θεραπεία με cidofovir και ο ασθενής παρουσίασε μείωση της νεφρικής λειτουργίας που προκαλείται από τη cidofovir· αμέσως μετά τη χορήγηση του CMX001, τα επίπεδα του DNA του αδενοϊού στο πλάσμα μειώθηκαν δραματικά και ο ασθενής ανέκαμψε [692]. Τον Ιούλιο του 2011, η Chimerix ανακοίνωσε την έναρξη της δοκιμής AdV HALT, η οποία είναι μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη-με εικονικό φάρμακο κλινική δοκιμή πολλαπλής φάσης II για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της προληπτικής αγωγής με CMX001 για την πρόληψη της νόσου από αδενοϊό μετά από HSCT. Στη δοκιμή, η χορήγηση του CMX001 γίνεται από το στόμα σε ανοσοκατεσταλμένους παιδιατρικούς ασθενείς οι οποίοι είναι μολυσμένοι με αδενοϊό, αλλά δεν παρουσιάζουν ενδείξεις νόσου. Το CMX001 (και παρόμοια συνδεδεμένα με λιπίδια προφάρμακα των ακυκλικών φωσφονικών νουκλεοσιδίων) φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενο.

Η ριμπαβιρίνη είναι ένα αντι-ικό φάρμακο ευρέως φάσματος με δραστικότητα *in vitro* έναντι μιας ποικιλίας ιών, ιδιαίτερα RNA ιών, που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των λοιμώξεων από τον ιό της ηπατίτιδας C σε συνδυασμό με ιντερφερόνη-α και επίσης των λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος από τον συγκυτιακό αναπνευστικό ιό σε παιδιά. Η δραστικότητα της ριμπαβιρίνης ενάντια στην αντιγραφή του αδενοϊού στην κυτταροκαλλιέργεια είναι αμφιλεγόμενη [686]. Γενικά, η ριμπαβιρίνη θεωρήθηκε ότι ήταν μέτρια αποτελεσματική μόνο έναντι των ειδών C, αλλά σε πιο πρόσφατη μελέτη αναφέρθηκε ότι αναστέλλει την αντιγραφή κλινικά



απομονωμένων ειδών A, B και D καθώς και ειδών C *in vitro*. Από περίπου δώδεκα μελέτες που αφορούσαν σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς έχουν προκύψει μικτά αποτελέσματα [686]. Έχει αναφερθεί η επιτυχής χρήση της ριμπαβιρίνης σε συνδυασμό με τη *cidofovir*. Σε μια σειρά περιπτώσεων τεσσάρων ασθενών που παρακολουθούνταν για τον προσδιορισμό του φορτίου του DNA του αδενοϊού, η ριμπαβιρίνη απέτυχε να έχει σημαντική κλινική ή ιολογική επίδραση, παρόλο που τρεις από τους ασθενείς ήταν μολυσμένοι από αδενοϊούς του είδους C [693].

Η διγοξίνη και η φουροσεμίδη είναι εμπορικά διαθέσιμες και παρουσιάζουν δραστικότητα έναντι του αδενοϊού *in vitro* αλλά δεν έχουν μελετηθεί για τη θεραπεία των λοιμώξεων από αδενοϊούς. Παρομοίως, η *ganciclovir* έχει μέτρια δραστικότητα έναντι του αδενοϊού, [686] αλλά υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για την αποτελεσματικότητα της στη θεραπεία λοιμώξεων από αδενοϊούς [669]. Δύο μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς που δεν έλαβαν *ganciclovir* για προφύλαξη, ήταν σε μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν λοίμωξη από αδενοϊούς και εκδήλωση νόσου (αναλογία πιθανότητας [odds ratio, OR], 3,4, 95% διάστημα εμπιστοσύνης [CI], 2,1 έως 5,6) [694,695].

Έχει αναγνωρισθεί ένας αρκετά μεγάλος αριθμός άλλων ενώσεων που αναστέλλουν την αντιγραφή του αδενοϊού στην κυτταροκαλλιέργεια και σε ζωικά μοντέλα [686]. Οι 6-(2-Hydroxybenzylamino)-2(R)-[[1-hydroxymethyl]propyl]amino]-9-isopropylpurine, ζαλιταβίνη, αλοβουδίνη, σταβουδίνη, σανιβουδίνη; Ιντερφερόνη- β 396; ένα πεπτίδιο αντιστεοποντίνης το NMS03-το μικροβιοκτόνο N-χλωροταυρίνη [686]-το χηλικό διάλυμα κοβαλτίου CTC-96 (Doxovir), και η αριβιδόλη έχουν δείξει δραστικότητα κατά του αδενοϊού *in vitro* αλλά δεν έχουν μελετηθεί κλινικά για τη θεραπεία των λοιμώξεων από αδενοϊούς. Επιπλέον, η δεϋδροεπιανδροστερόνη, η επιανδροστερόνη και μερικά από τα ανάλογα τους, αναστέλλουν την αντιγραφή του Ad5 *in vitro*. Οι ανθρώπινες α-ντεφενοΐνες HNP1 και HD5 αναστέλλουν τη μόλυνση από μια ποικιλία οροτύπων αδενοϊού με ανασταλτική συγκέντρωση (IC50) από 3 έως 4 μM [647]. Οι ντεφενοΐνες ή τα ανάλογα τους μπορούν συνεπώς να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία των λοιμώξεων από αδενοϊούς. Παρομοίως, η ισοφλαβόνη σόγιας, η γενιστεΐνη, αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του p130<sup>CAS</sup> και την όψιμη μεταγραφή του mRNA του αδενοϊού και ως εκ τούτου θα μπορούσε επίσης να διερευνηθεί ως αντί-ϊικό φάρμακο. Επιπλέον, το A3, το οποίο παρεμποδίζει τη de novo βιοσύνθεση της πυριμιδίνης, και το GSK983, έχει φανεί ότι έχουν *in vitro* δραστικότητα έναντι του Ad5.

Μια ενδιαφέρουσα και εναλλακτική προσέγγιση για τα αντί-αδενοϊικά φάρμακα είναι να εκμεταλλευτούν βιολογικές πτυχές του ξενιστή που πρέπει να χρησιμοποιήσει ο ιός για να αντιγραφεί αποτελεσματικά. Ο Ad5 ενισχύει τη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού Ras-αυτή η δραστηριότητα απαιτείται για την αποτελεσματική αντιγραφή, στο βαθμό που οι φαρμακολογικοί αναστολείς MEK1/2 ή EKK1/2

παρεμπόδισαν αντιγραφή μεγαλύτερη από 100 φορές στην κυτταρική καλλιέργεια. [696]. Ίσως τέτοιοι αναστολείς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τις μολύνσεις από αδενοϊούς. Τέλος, τα ειδικά για τους αδενοϊούς T-λεμφοκύτταρα διερευνώνται ως θεραπεία κατά της λοίμωξης από αδενοϊούς και είναι πολλά υποσχόμενα [613,648–652].

#### 4.16.2. ΕΜΒΟΛΙΟ

Τα εμβόλια τα οποία έχουν αναπτυχθεί αφορούν τους οροτύπους 4 & 7. Για τους ορότυπους 40 & 41 δεν έχει αναπτυχθεί κάποιο εμβόλιο.

#### 4.17. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΑΔΕΝΟΪΩΝ

Όντας ιοί χωρίς φάκελο με καλά οργανωμένο καψίδιο και γονιδίωμα DNA διπλής έλικας όπως οι αδενοϊοί είναι σταθεροί. Επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε υγρό περιβάλλον ή σε επιφάνειες σε κατάσταση ξηρασίας.

Υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με τα επίπεδα των αδενοϊών στο περιβάλλον. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι οι αδενοϊοί είναι σταθεροί σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Σε μια νέα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της PCR, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του προϊόντος της PCR και η real-time PCR για την ανίχνευση, την τυποποίηση και την ποσοτικοποίηση των αδενοϊών στο πόσιμο νερό και στο νερό των ποταμών στη Νότιο Αφρική. Οι αδενοϊοί ανιχνεύθηκαν στο 5,5% (10 από 188) και 22,2% (10 από 45) των διαφορετικών δειγμάτων πόσιμου νερού και νερού ποταμών, αντίστοιχα, σε επίπεδο μικρότερο από ένα αντίγραφο ανά λίτρο νερού.

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως κεντρικό σκοπό την ανίχνευση και μελέτη τεσσάρων εντεροπαθογόνων ιών, των Ρόταϊών, Νόροϊων, Αδένοϊων και Άστροϊων ώστε να εκτιμηθεί η συχνότητα της παρουσίας τους, να αναγνωρισθεί το γενεαλογικό προφίλ τους και τυχόν μεταβολές αυτού και να αξιολογηθεί η κλινική τους επίπτωση. Παράλληλα, θα επιδιωχθεί και μία εκτίμηση των διαγνωστικών προσεγγίσεων που χρησιμοποιούνται από το κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο για την ανίχνευσή τους.

Οι επιμέρους στόχοι της παρούσας διατριβής είναι:

- 1) Η αναζήτηση της παρουσίας των υπό μελέτη ιών σε αρχαικά δείγματα νοσηλευόμενων ασθενών στην Ελλάδα
- 2) Η τυποποίηση των ιών που θα ανιχνευθούν με τη χρήση σύγχρονων μοριακών τεχνικών
- 3) Η φυλογενετική ανάλυση των αποτελεσμάτων και η σύγκριση με μοριακά επιδημιολογικά δεδομένα του Ελληνικού και διεθνή χώρου
- 4) Η σύγκριση των μοριακών τεχνικών ανίχνευσης των ιών σε δείγματα κοπράνων σε σχέση με ανοσοδιαγνωστικές τεχνικές προκειμένου να εκτιμηθεί η χρήση τους ως διαγνωστικά εργαλεία στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

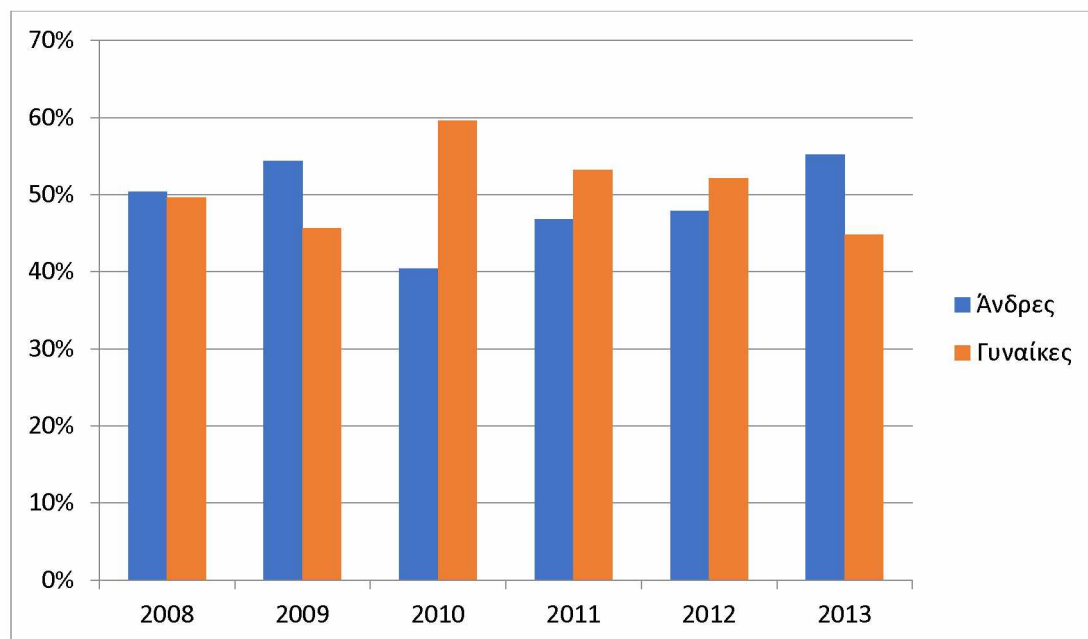
Για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα διαρροϊκών κοπράνων από νοσηλευόμενους ασθενείς διαφόρων κλινικών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, κατά τη χρονική περίοδο 2008-2013. Πριν την συλλογή τους, όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν για την παρουσία *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp. Μετά τη διενέργεια καλλιέργειας κοπράνων, τα αρνητικά δείγματα στα ανωτέρω παθογόνα, συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-80 °C). Για κάθε δείγμα καταγράφηκε η ημερομηνία, το φύλο και αν προέρχεται από ανήλικο ή ενήλικα. Για όλα τα δείγματα υπάρχει ο περιορισμός της μη ύπαρξης δεδομένων από μικροσκοπική εξέταση κοπράνων.

Στον πίνακα 1 καταγράφονται αναλυτικά ο αριθμός των δειγμάτων για κάθε έτος ως προς το φύλο και την ηλικία. Μεταξύ των δύο φύλων δεν παρατηρείται σημαντική απόκλιση και εντοπίζεται λίγο μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων στις γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες. Αντιθέτως παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ του αριθμού των δειγμάτων που προέρχονται από ενήλικες συγκριτικά με τα παιδιατρικά δείγματα.

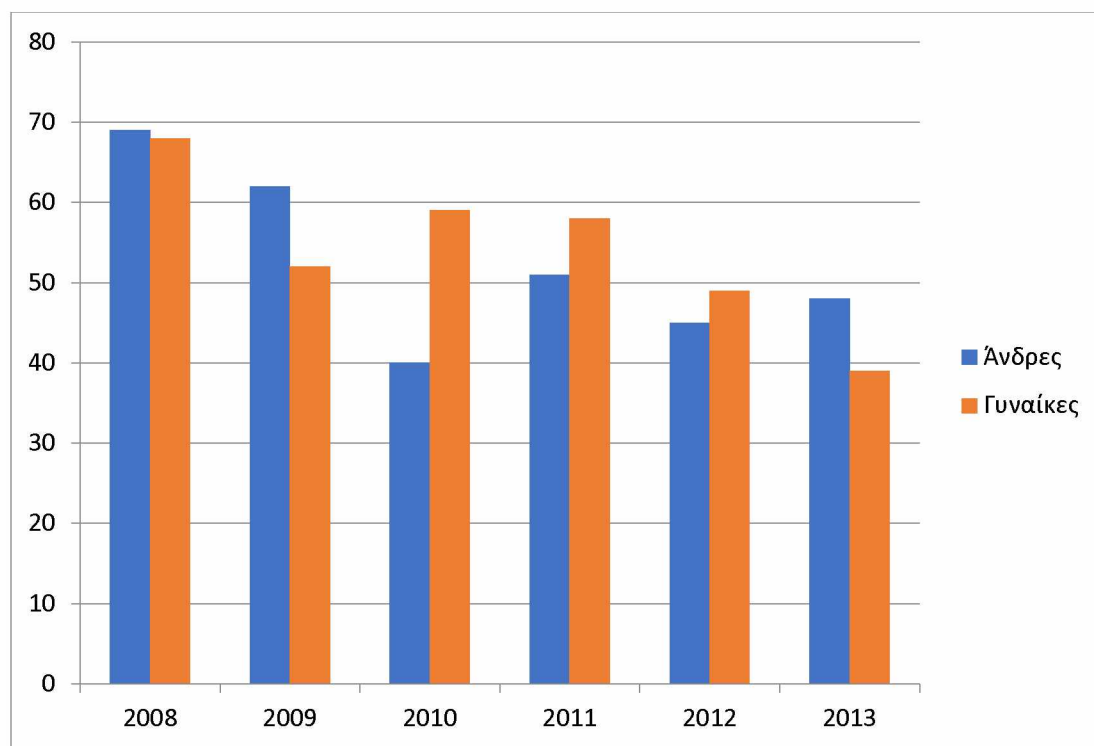
**Πίνακας 1:** Αριθμός κλινικών δειγμάτων που ελέγχθηκαν για τη παρουσία γενωμικού υλικού των υπό διερεύνηση ιών, ανά έτος συλλογής, ηλικιακή κατηγορία και φύλο του ασθενή.

	2008		2009		2010		2011		2012		2013		Σύνολο	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Άνδρες	69	50.36	62	54.39	40	40.40	51	46.79	45	47.87	48	55.17	315	49.22
Γυναίκες	68	49.64	52	45.61	59	59.60	58	53.21	49	52.13	39	44.83	325	50.78
Ενήλικες	114	83.21	97	85.09	75	75.75	87	79.81	73	77.66	71	81.60	517	80.78
ΠΔ	23	26.79	17	14.91	24	24.25	22	20.19	21	22.34	16	18.40	123	19.21
Σύνολο	137		114		99		109		94		87		640	

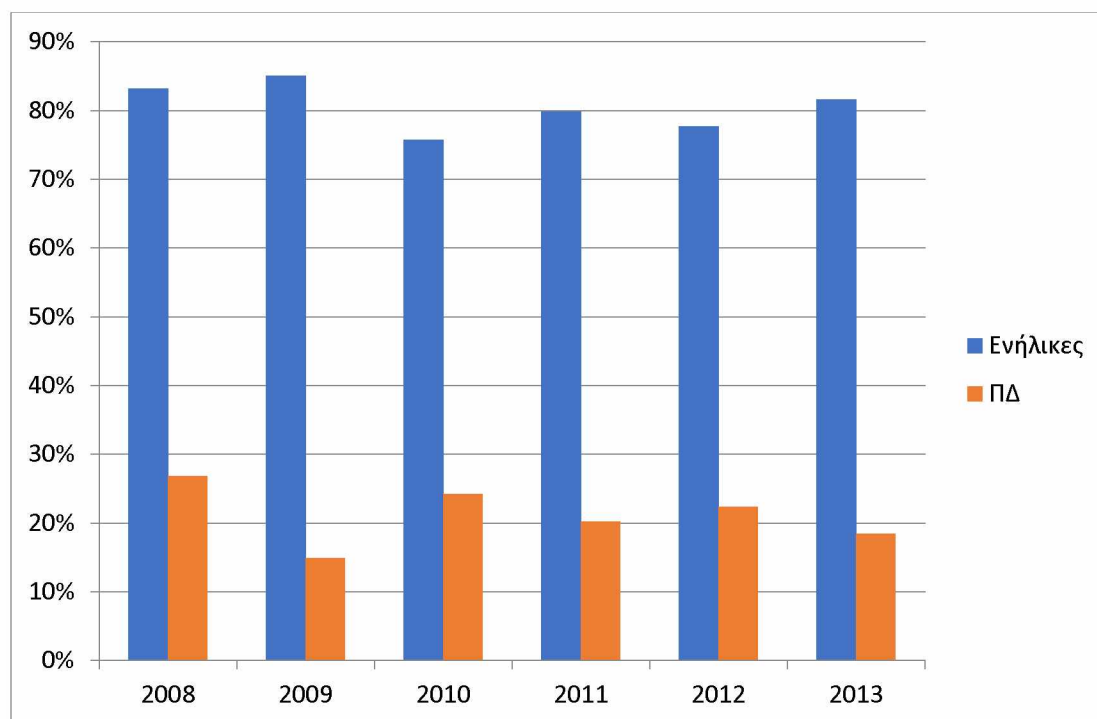
**Γράφημα 1:** Ποσοστά ανά φύλο του ασθενή των κλινικών δειγμάτων που ελέγχθηκαν για τη παρουσία γενωμικού υλικού των υπό διερεύνηση ιών σε κάθε έτος συλλογής.



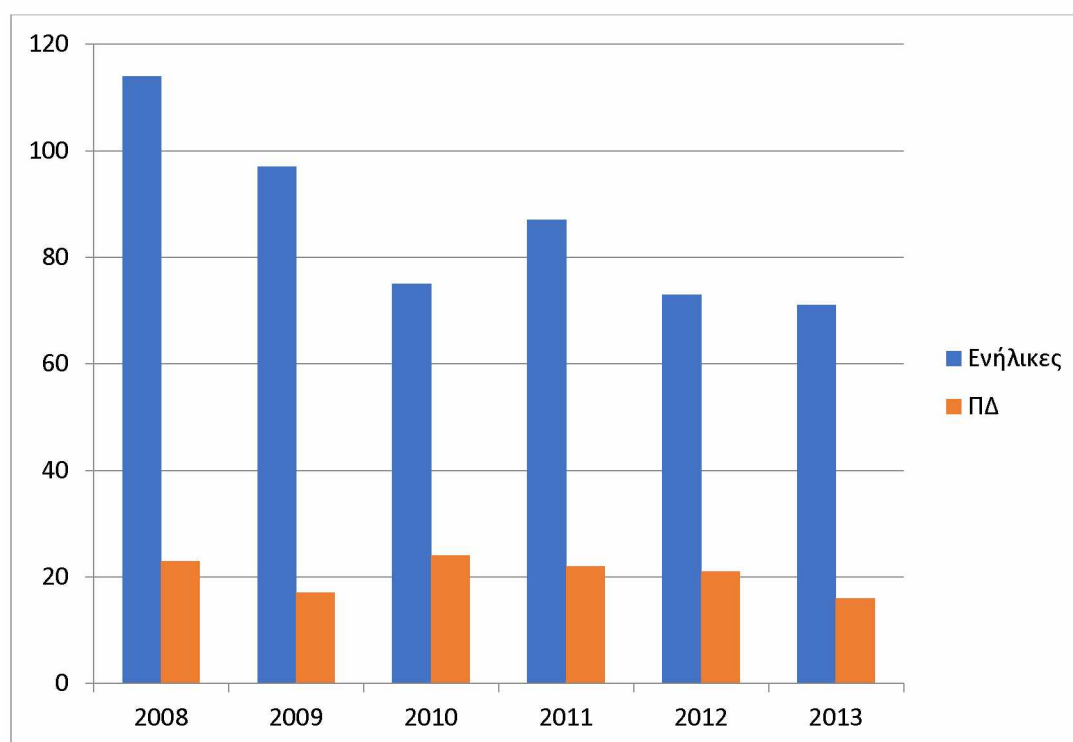
**Γράφημα 2:** Αριθμοί ανά φύλο του ασθενή των κλινικών δειγμάτων που ελέγχθηκαν για τη παρουσία γενωμικού υλικού των υπό διερεύνηση ιών, σε κάθε έτος συλλογής.



**Γράφημα 3:** Ποσοστά, ανά ηλικιακή κατηγορία του ασθενή, των κλινικών δειγμάτων που ελέγχθηκαν για τη παρουσία γενωμικού υλικού των υπό διερεύνηση ιών σε κάθε έτος συλλογής.



**Γράφημα 4:** Αριθμός, ανά ηλικιακή κατηγορία του ασθενή, των κλινικών δειγμάτων που ελέγχθηκαν για τη παρουσία γενωμικού υλικού των υπό διερεύνηση ιών σε κάθε έτος συλλογής.



Για την ανίχνευση των εντεροπαθογόνων ιών, Ρόταϊων, Νόροϊων, Αδένοϊων και Αστροϊων χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές:

## 2.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ, ΑΣΤΡΟΪΩΝ, ΝΟΡΟΪΩΝ ΚΑΙ ΑΔΕΝΟΪΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL-TIME PCR

Για τη πραγματοποίηση της Real-Time PCR χρησιμοποιήθηκαν δύο εμπορικά κιτ one-step reverse transcription real-time PCR (rt-PCR) kit (RIDA GENE Viral Stool Panel II και RIDA®GENE Norovirus I & II R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Το ολικό RNA εκχυλίστηκε από τα δείγματα χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό κιτ εκχύλισης με τη χρήση στηλών με φίλτρα (RIDA Xtract Kit, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

### 2.1.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA Η' / ΚΑΙ RNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ RIDA XTRACT KIT

#### 1) Προετοιμασία αντιδραστηρίων

- Δεσμευτικό:

Συμπληρώνουμε 120 ml ισοπροπανόλης (μοριακής βιολογικής ποιότητας) στην κενή φιάλη Solution Binding Solution

- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1:

Προσθέτουμε 40 ml αιθανόλης (96-100%) στο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης 1

- Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 2:

Προσθέτουμε 120 ml αιθανόλης (96-100%) στις φιάλες του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2, αναμειγνύουμε καλά και διατηρούμε πάντα τα φιαλίδια σταθερά κλειστά.

#### 2) Προετοιμασία δείγματος

DNA και RNA:

Το δείγμα κοπράνων αραιώνεται 1:3 με νερό. Το διάλυμα αναδεύεται για 30 δευτερόλεπτα. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα στις 3.000 rpm



### 3) Λύση δείγματος

- 200 μl του υπερκείμενου δείγματος μεταφέρονται στον παρεχόμενο σωλήνα αντίδρασης και προσθέτουμε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσεως.
- Ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

### 4) Σύνδεση του DNA και του RNA

- 400 μl συνδετικού διαλύματος προσθέτονται στον παρεχόμενο σωλήνα αντίδρασης και το δείγμα αναδεύεται.
- Το δείγμα μεταφέρεται στο φίλτρο περιστροφής. Επώαση για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 9.300 x g (10.000 rpm).
- Ο σωλήνα συλλογής απορρίπτεται το φίλτρο περιστροφής τοποθετείται σε νέο σωλήνα συλλογής.

### 5) Πρώτη πλύση του φίλτρου περιστροφής

- 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 1 προστίθενται στο φίλτρο περιστροφής και φυγοκεντρούμε στα 9.300 x g (10.000 rpm) για 1 λεπτό.
- Ο σωλήνας συλλογής απορρίπτεται το φίλτρο περιστροφής τοποθετείται σε νέο σωλήνα συλλογής.

### 6) Δεύτερη πλύση του φίλτρου περιστροφής

- 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης 2 προστίθενται στο φίλτρο περιστροφής και φυγοκεντρείται στα 9.300 x g (10.000 rpm) για 1 λεπτό.

- Ο σωλήνας συλλογής απορρίπτεται το φίλτρο περιστροφής τοποθετείται σε νέο σωλήνα συλλογής.
- Η υπολειμματική αιθανόλη αφαιρείται με τελική φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα. Ο σωλήνας συλλογής απορρίπτεται.

#### 7) Έκλυση του DNA / RNA

- Τοποθετούμε το φίλτρο περιστροφής σε σωλήνα έκλυσης.
- 60 μl του ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (προθερμασμένο στους 80 ° C) προστίθενται απευθείας στη μεμβράνη του φίλτρου περιστροφής.
- Επώαση για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 9.300 x g (10.000 rpm) για 1 λεπτό.
- Το φίλτρο περιστροφής απορρίπτεται και ο σωλήνας έκλυσης με το εκλουσμένο ολικό νουκλεϊκό οξύ τοποθετείται αμέσως στον πάγο.

#### 2.1.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ROTAVIRUS, ADENOVIRUS, ASTROVIRUS ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ RIDA®GENE VIRAL STOOL PANEL II

Η ανάλυση RIDA®GENE Viral Stool Panel II είναι μια πολλαπλή PCR πραγματικού χρόνου για την άμεση, ποιοτική ανίχνευση και διαφοροποίηση των Ροταϊών, Αδενοϊών και Αστροϊών. Μετά την απομόνωση RNA, επιτυγχάνεται η ενίσχυση γονιδιακών θραυσμάτων που είναι ειδικά για τον Ροταϊό (NSP3), τον Αδενοϊό (Hexon) και τον Αστροϊό (CAP, πρωτεΐνη καψιδίου), εάν είναι παρόντα στο υπό εξέταση δείγμα. Οι ενισχυμένοι στόχοι ανιχνεύονται με ανιχνευτές υδρόλυσης, οι οποίοι επισημαίνονται στο ένα άκρο με έναν quencher και στο άλλο άκρο με φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (φθοροφόρο). Παρουσία του στόχου οι ανιχνευτές υβριδοποιούνται με τα προϊόντα. Κατά τη διάρκεια του βήματος επέκτασης η Taq-πολυμεράση σπάει την γεινίαση της χρωστικής αναφοράς-quencher.

Το φθοροφόρο εκπέμπει ένα φθορίζον σήμα το οποίο ανιχνεύεται από την οπτική μονάδα ενός οργάνου PCR πραγματικού χρόνου. Το σήμα φθορισμού αυξάνεται με την ποσότητα των διαμορφωμένων προϊόντων. Η ανάλυση RIDA®GENE Viral Stool

Panel II περιέχει ένα Εσωτερικό Control RNA (ICR) για τον έλεγχο της διαδικασίας παρασκευής δείγματος και για τον προσδιορισμό πιθανής αναστολής PCR.

#### 1) Παρασκευή Master-Mix

Υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός αντιδράσεων PCR (αντιδράσεις δείγματος και ελέγχου) που απαιτούνται. Ένας θετικός έλεγχος και ένας αρνητικός μάρτυρας πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε κάθε φάση δοκιμασίας.

Παράδειγμα υπολογισμού του Master Mix για 10 αντιδράσεις

Master-Mix συστατικά	Όγκος ανά αντίδραση	10 αντιδράσεις (+10 %)
Reaction Mix	12.5 μl	137.5 μl
PP-Mix (Primer-Probe-Mix)	6.9 μl	75.9 μl
Enzyme Mix	0.7 μl	7.7 μl
<b>Total</b>	<b>20.1 μl</b>	<b>221.1 μl</b>

Αναδεύουμε με ήπιο τρόπο και για σύντομο χρονικό διάστημα τα συστατικά του Master Mix

#### 2) Παρασκευή του μίγματος RT-PCR

Μεταφέρουμε 20 μl του Master-Mix σε κάθε φιαλίδιο αντίδρασης (σωλήνα ή πλάκα).

Αρνητικός μάρτυρας: 5 μl νερό προστίθενται σε ένα φιαλίδιο με Master-Mix ως αρνητικός μάρτυρας.

Σημείωση: Εάν το ICR χρησιμοποιείται ως έλεγχος εκχύλισης για τη διαδικασία παρασκευής δείγματος και ως έλεγχος αναστολής PCR, συνιστάται η προσθήκη 1 μl του ICR στο μίγμα αρνητικού μάρτυρα RT-PCR.

Δείγμα: 5 μl RNA-Εκχύλισμα προστίθενται σε κάθε φιαλίδιο με Master-Mix.

Θετικός μάρτυρας: 5 μl θετικού μάρτυρα προστίθενται σε ένα φιαλίδιο με Master-Mix.

Σημείωση: Εάν το ICR χρησιμοποιείται ως έλεγχος εκχύλισης για τη διαδικασία παρασκευής δείγματος και ως έλεγχος αναστολής PCR, συνιστάται η προσθήκη 1 μl του ICR στο μίγμα θετικού μάρτυρα RT-PCR.

Οι σωλήνες ή η πλάκα τοποθετείται στη συσκευή Real-Time PCR.

### 3) Ρύθμιση συσκευής real-time PCR ABI 7500

Real-time RT-PCR profile

Αντίστροφη μεταγραφή	10 min, 58 °C
Αρχική αποδιάταξη	1 min, 95 °C
Κύκλοι PCR	45 Cycles
Αποδιάταξη	15 sec, 95 °C
Προσκόληση/Επιμήκυνση	30 sec, 55 °C
Ρυθμός μεταβολής θερμοκρασιών	Μέγιστος

Κανάλια ανίχνευσης σε συσκευή ABI 7500:

Rotavirus: FAM, ICR: VIC, Astrovirus: ROX, Adenovirus: Cy5

### 4) Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να παρουσιάζουν σωστά αποτελέσματα (βλ. Σχήμα). Ο θετικός έλεγχος έχει συγκέντρωση  $10^3$  αντιγράφων / μλ. Σε κάθε εκτέλεση PCR χρησιμοποιείται σε συνολική ποσότητα  $5 \times 10^3$  αντίγραφα.

Ρόταϊοι	Αδένοϊοι	Άστροϊοι	ICR	Αποτέλεσμα
θετικό	αρνητικό	αρνητικό	θετικό/αρνητικό	Ροταϊός
αρνητικό	θετικό	αρνητικό	θετικό/αρνητικό	Αδένοϊος
αρνητικό	αρνητικό	θετικό	θετικό/αρνητικό	Άστροϊος
αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	θετικό	Αρνητικό (δεν ανιχνεύθηκαν γονίδια στόχοι)
αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	Δεν αξιολογείται

Το δείγμα αξιολογείται αρνητικά, εάν δεν δείχνει σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης, αλλά το RNA εσωτερικού ελέγχου (ICR) είναι θετικό. Η αναστολή της αντίδρασης PCR ή η αποτυχία στη διαδικασία εκχύλισης μπορεί να αποκλειστεί με την ανίχνευση του RNA εσωτερικού ελέγχου (ICR).

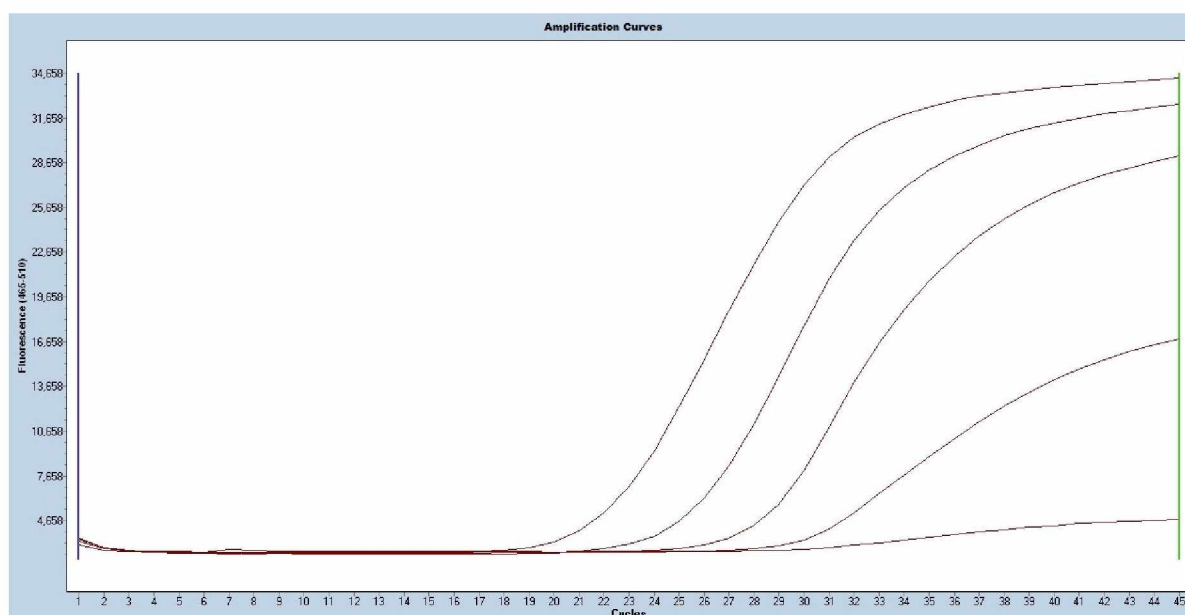
Το δείγμα αξιολογείται θετικά εάν και το δείγμα και το RNA εσωτερικού ελέγχου (ICR) παρουσιάζουν ένα σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης.

Το δείγμα αξιολογείται θετικά, εάν το δείγμα παρουσιάζει ένα σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης, αλλά το RNA εσωτερικού ελέγχου (ICR) είναι αρνητικό. Η ανίχνευση του ελέγχου εσωτερικής ενίσχυσης δεν είναι απαραίτητη, επειδή υψηλές συγκεντρώσεις του αμπλικονίου μπορεί να προκαλέσουν ένα ασθενές ή απουσιάζον σήμα του εσωτερικού ελέγχου ενίσχυσης.

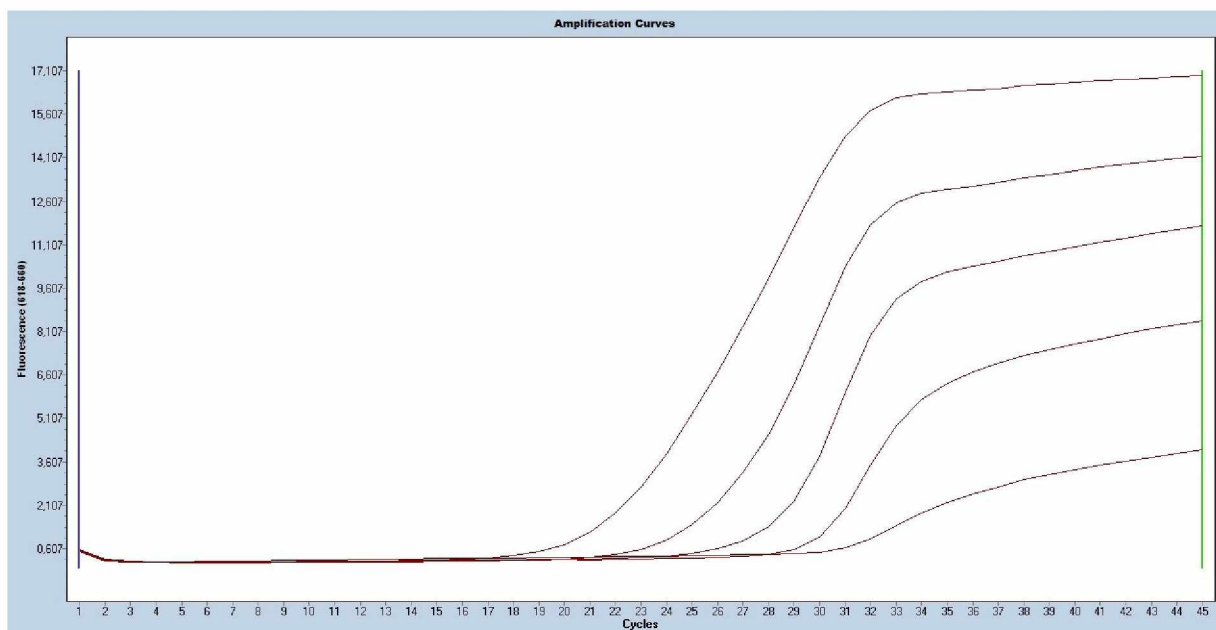
Το δείγμα αξιολογείται ως μη έγκυρο εάν και το δείγμα και το RNA εσωτερικού ελέγχου (ICR) δεν δείχνουν σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης. Το δείγμα ίσως περιείχε αναστολέα PCR ή προέκυψε αποτυχία στη διαδικασία εκχύλισης. Το εκχυλισμένο δείγμα πρέπει να αραιωθεί περαιτέρω με νερό PCR (1:10) και να ενισχυθεί εκ νέου, ή η απομόνωση και ο καθαρισμός του δείγματος πρέπει να βελτιωθούν.

Η τεχνική έχει δυνατότητα ανίχνευσης 50 RNA αντιγράφων (copies) ανά αντίδραση.

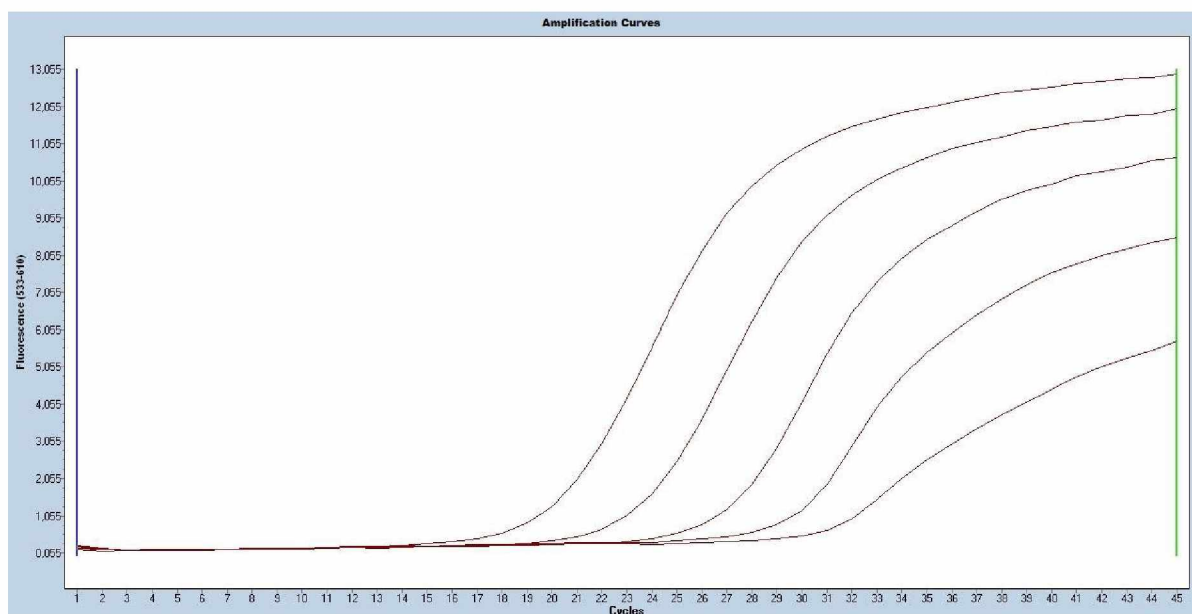
**Εικόνα 5.** Ενδεικτική εικόνα ανίχνευσης Ροταϊών σε δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης ιικών σωμάτων ( $10^5 - 10^1$  RNA copies per  $\mu$ l)



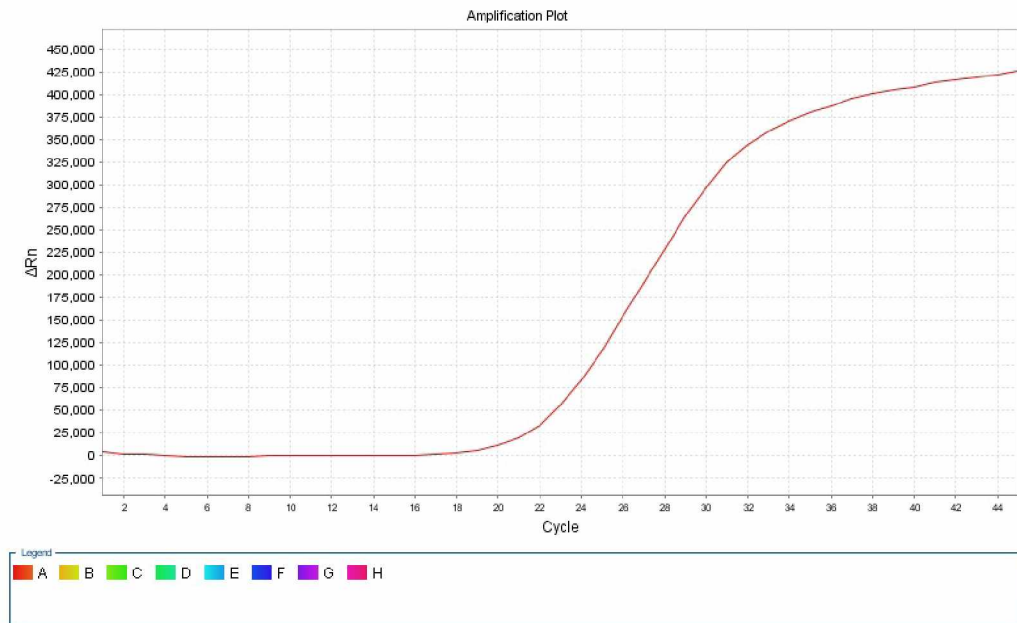
Εικόνα 6. Ενδεικτική εικόνα ανίχνευσης Αδενοϊών σε δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης ικών σωμάτων ( $10^5 - 10^1$  RNA copies per  $\mu$ l)



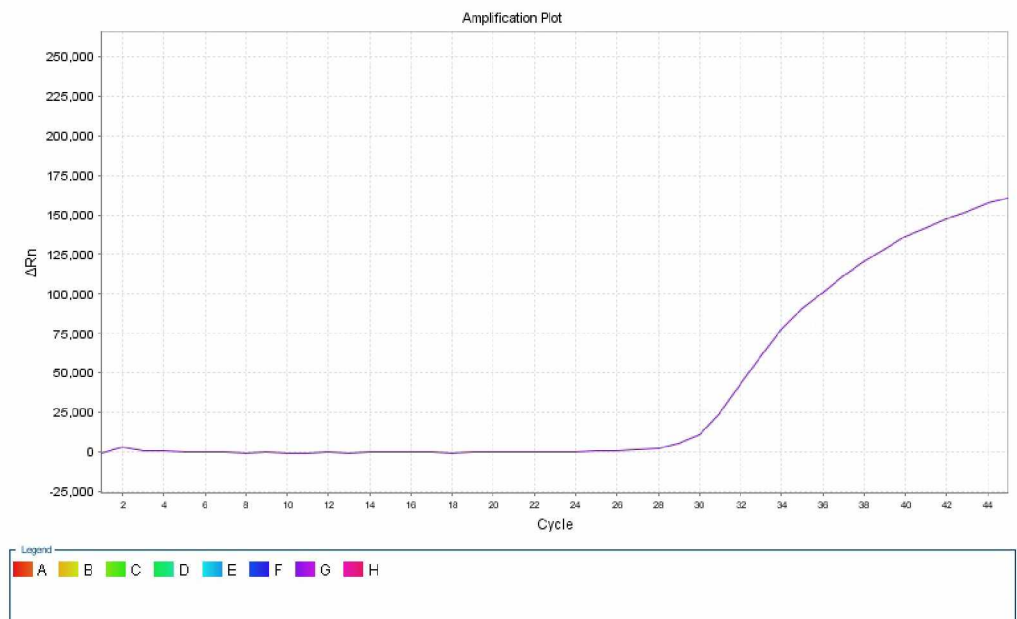
Εικόνα 7. Ενδεικτική εικόνα ανίχνευσης Αστροϊών σε δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης ικών σωμάτων ( $10^5 - 10^1$  RNA copies per  $\mu$ l)



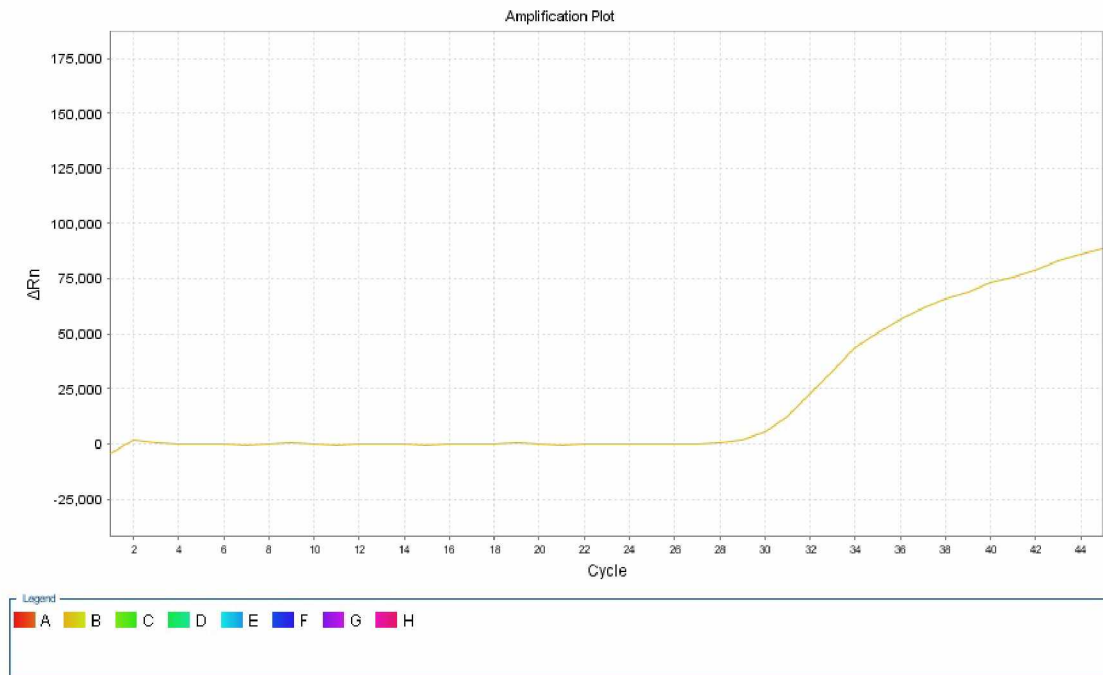
Εικόνα 8: Ενδεικτική εικόνα θετικού εργαστηριακού αποτελέσματος ανίχνευσης Ρόταϊου μετά από ενίσχυση γενωμικού υλικού με real time PCR.



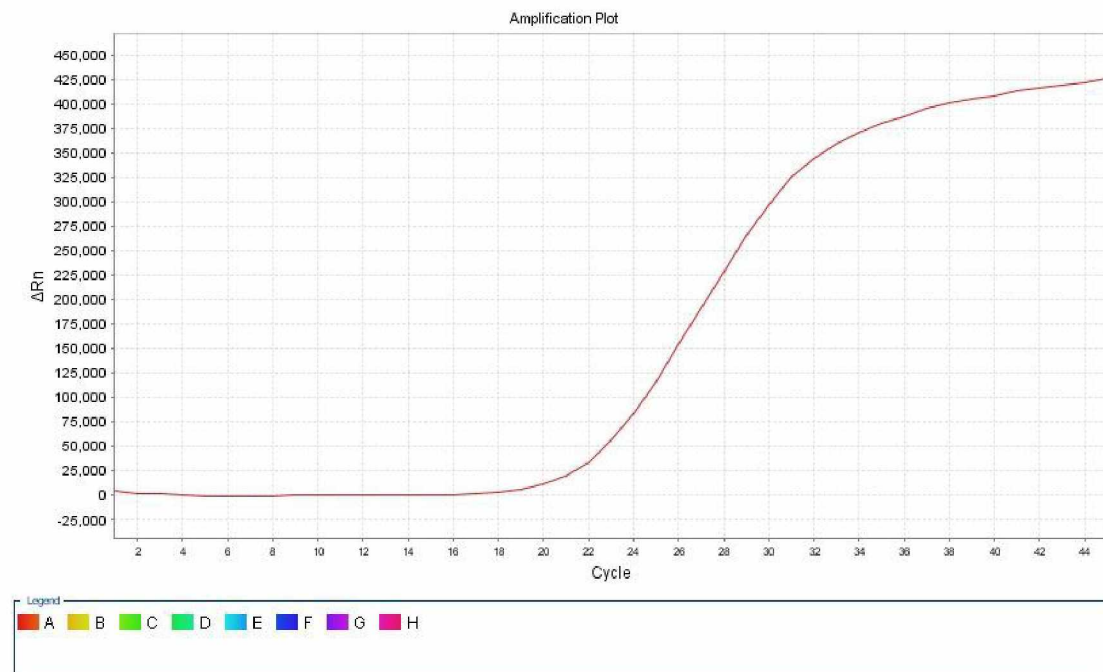
Εικόνα 9: Ενδεικτική εικόνα θετικού εργαστηριακού αποτελέσματος ανίχνευσης Άστροϊου μετά από ενίσχυση γενωμικού υλικού με real time PCR.



Εικόνα 10: Ενδεικτική εικόνα θετικού εργαστηριακού αποτελέσματος ανίχνευσης Άδενοϊού μετά από ενίσχυση γενωμικού υλικού με real time PCR.



Εικόνα 11: Ενδεικτική εικόνα θετικού εργαστηριακού αποτελέσματος ανίχνευσης Ρόταϊου μετά από ενίσχυση γενωμικού υλικού με real time PCR.





### 2.1.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΝΟΡΟΪΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ RIDA®GENE VIRAL STOOL PANEL II

Το RIDA®GENE Norovirus I & II είναι μια πολλαπλή (multiplex) RT-PCR πραγματικού χρόνου για την άμεση, ποιοτική ανίχνευση και διαφοροποίηση του GI και GII του Νόροϊου σε δείγματα ανθρώπινων κοπράνων. Η ανίχνευση γίνεται σε μορφή RT-PCR σε πραγματικό χρόνο ενός σταδίου όπου η ανάστροφη μεταγραφή ακολουθείται από την PCR στον ίδιο σωλήνα αντίδρασης. Το απομονωμένο RNA μεταγράφεται σε cDNA με αντίστροφη μεταγραφή. Θραύσματα γονιδίου ειδικά για GI και GII Νοροϊών στη συνέχεια ενισχύονται με PCR σε πραγματικό χρόνο. Οι ενισχυμένοι στόχοι (περιοχή συνδέσεως ORF1 / ORF2) ανιχνεύονται με ανιχνευτές υδρόλυσης, οι οποίοι επισημαίνονται στο ένα άκρο με έναν quencher και στο άλλο άκρο με φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (φθοροφόρο). Παρουσία ενός στόχου οι ανιχνευτές υβριδοποιούνται με τα προϊόντα. Κατά τη διάρκεια του σταδίου επέκτασης η Ταq-πολυμεράση σπάει την γειννίαση του quencher-φθοροφόρου. Το φθοροφόρο εκπέμπει ένα φθορίζον σήμα το οποίο ανιχνεύεται από την οπτική μονάδα ενός οργάνου PCR πραγματικού χρόνου. Το σήμα φθορισμού αυξάνεται με την ποσότητα των διαμορφωμένων προϊόντων. Η δοκιμασία RIDA®GENE Norovirus I & II περιέχει ένα εσωτερικό έλεγχο RNA (ICR) ως εσωτερικό έλεγχο της διαδικασίας παρασκευής δείγματος και / ή για τον προσδιορισμό πιθανής αναστολής PCR.

#### 1) Παρασκευή Master-Mix

Υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός αντιδράσεων PCR (αντιδράσεις δείγματος και ελέγχου) που απαιτούνται. Ένας θετικός έλεγχος και ένας αρνητικός μάρτυρας πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε κάθε φάση δοκιμασίας.

Παράδειγμα υπολογισμού όγκων για 10 αντιδράσεις του Master Mix

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	12.5 µl	137.5 µl
2	PP-Mix (Primer-Probe-Mix)	6.9 µl	75.9 µl
3	Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
	<b>Total</b>	<b>20.1 µl</b>	<b>221.1 µl</b>

Αναμιγνύουμε ήπια για σύντομο χρονικό διάστημα τα συστατικά του Master Mix.

#### 2) Παρασκευή του μίγματος RT-PCR

Μεταφέρουμε 20 µl του Master-Mix σε κάθε φιαλίδιο αντίδρασης (σωλήνα ή πλάκα).

Αρνητικός μάρτυρας: 5 µl νερό προστίθενται σε ένα φιαλίδιο με Master-Mix ως αρνητικός μάρτυρας.

Σημείωση: Εάν το ICR χρησιμοποιείται ως έλεγχος εκχύλισης για τη διαδικασία παρασκευής δείγματος και ως έλεγχος αναστολής PCR, συνιστάται η προσθήκη 1 μl του ICR στο μίγμα αρνητικού μάρτυρα RT-PCR.

Δείγμα: 5 μl RNA-Εκχύλισμα προστίθενται σε κάθε φιαλίδιο με Master-Mix.

Θετικός μάρτυρας: 5 μl θετικού μάρτυρα προστίθενται σε ένα φιαλίδιο με Master-Mix.

Σημείωση: Εάν το ICR χρησιμοποιείται ως έλεγχος εκχύλισης για τη διαδικασία παρασκευής δείγματος και ως έλεγχος αναστολής PCR, συνιστάται η προσθήκη 1 μl του ICR στο μίγμα θετικού μάρτυρα RT-PCR.

Οι σωλήνες ή η πλάκα τοποθετείται στη συσκευή Real-Time PCR.

### 3) Ρύθμιση συσκευής real-time PCR ABI 7500

Real-time RT-PCR profile

Αντίτροφη μεταγραφή	10 min, 58 °C
Αρχική αποδιάταξη	1 min, 95°C
Κύκλοι PCR	45 Cycles
Αποδιάταξη	15 sec, 95 °C
Προσκόληση/Επιμήκυνση	30 sec, 55 °C
Ρυθμός μεταβολής θερμοκρασιών	Μέγιστος

Κανάλια ανίχνευσης σε συσκευή ABI 7500:

Norovirus GII: FAM, ICR: VIC, Norovirus GI: Cy5

### 4) Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να παρουσιάζουν σωστά αποτελέσματα (βλ. Σχήμα). Ο θετικός έλεγχος έχει συγκέντρωση  $10^3$  αντιγράφων / μl. Σε κάθε εκτέλεση PCR χρησιμοποιείται σε συνολική ποσότητα  $5 \times 10^3$  αντίγραφα.

Νόροϊος GI	Νόροϊος GII	ICR	Αποτέλεσμα
θετικό	αρνητικό	αρνητικό/θετικό	Ανιχνεύθηκε Νόροϊος GI
αρνητικό	positive	αρνητικό/θετικό	Ανιχνεύθηκε Νόροϊος GII
θετικό	θετικό	αρνητικό/θετικό	Ανιχνεύθηκε Νόροϊος GI & GII
αρνητικό	αρνητικό	θετικό	Δεν ανιχνεύθηκαν γονίδια στόχοι
αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	Δεν αξιολογείται

Το δείγμα αξιολογείται αρνητικά, εάν το δείγμα δεν δείχνει σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης, αλλά το RNA εσωτερικού ελέγχου (ICR) είναι θετικό. Η αναστολή της αντίδρασης PCR ή η αποτυχία στη διαδικασία εκχύλισης μπορεί να αποκλειστεί με την ανίχνευση του RNA εσωτερικού ελέγχου (ICR).

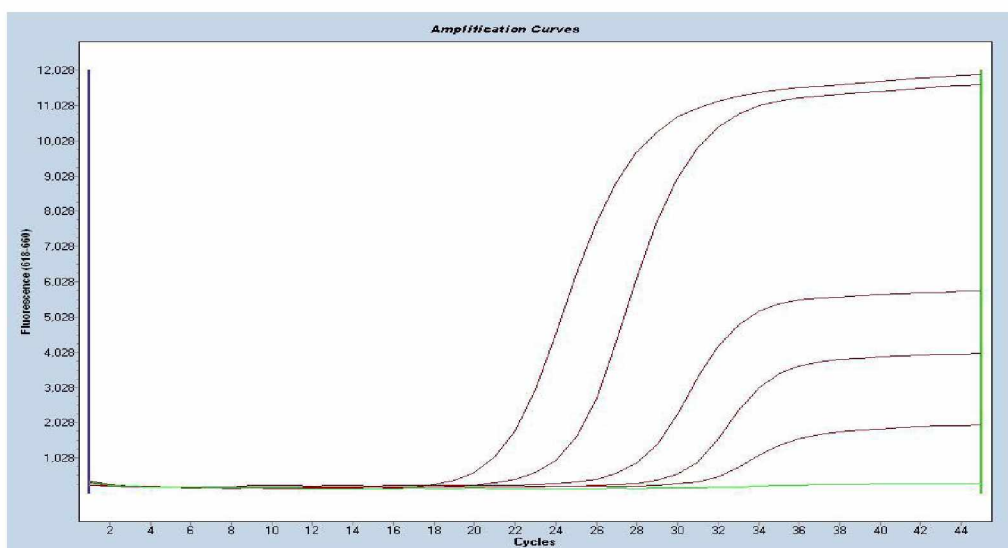
Το δείγμα αξιολογείται θετικά εάν και το δείγμα και το RNA εσωτερικού ελέγχου (ICR) παρουσιάζουν ένα σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης.

Το δείγμα αξιολογείται θετικά, εάν το δείγμα παρουσιάζει ένα σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης, αλλά το RNA εσωτερικού ελέγχου (ICR) είναι αρνητικό. Η ανίχνευση του ελέγχου εσωτερικής ενίσχυσης δεν είναι απαραίτητη, επειδή υψηλές συγκεντρώσεις του αμπλικονίου μπορεί να προκαλέσουν ένα ασθενές ή απουσιάζον σήμα του εσωτερικού ελέγχου ενίσχυσης.

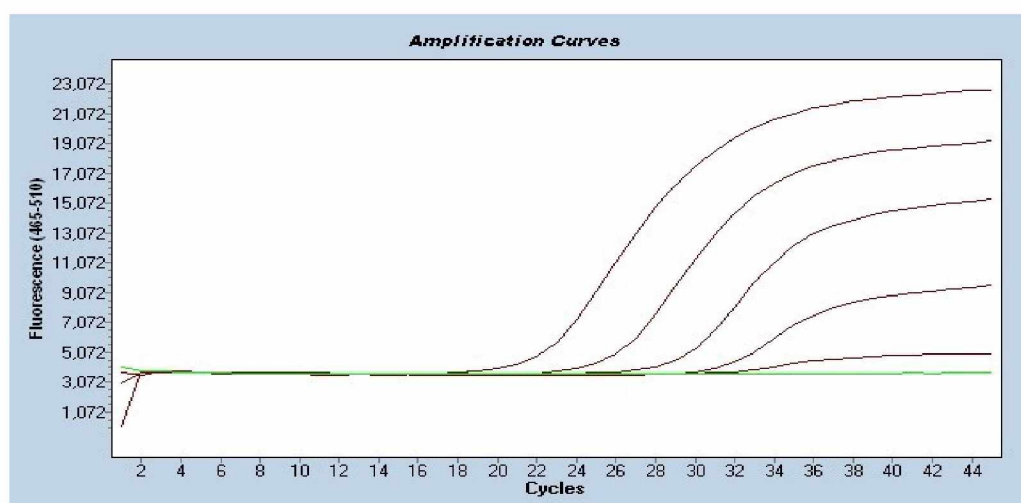
Το δείγμα αξιολογείται ως μη έγκυρο εάν και το δείγμα και το RNA εσωτερικού ελέγχου (ICR) δεν δείχνουν σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης. Το δείγμα περιείχε αναστολέα PCR ή προέκυψε αποτυχία στη διαδικασία εκχύλισης. Το εκχυλισμένο δείγμα πρέπει να αραιωθεί περαιτέρω με νερό PCR (1:10) και να ενισχυθεί εκ νέου, ή η απομόνωση και ο καθαρισμός του δείγματος πρέπει να βελτιωθούν.

Η τεχνική έχει δυνατότητα ανίχνευσης 50 RNA copies ανά αντίδραση.

Εικόνα 12. Ενδεικτική εικόνα ανίχνευσης Νοροϊών GI σε δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης ιικών σωμάτων ( $10^5 - 10^1$  RNA αντίγραφα ανά μl)



Εικόνα 13. Ενδεικτική εικόνα ανίχνευσης Νοροϊών GII σε δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης ιικών σωμάτων ( $10^5 - 10^1$  RNA αντίγραφα ανά μl)



## 2.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΡΟΤΑΪΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΑΧΕΙΑ ΑΝΟΣΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ RIDA®QUICK

Η εν λόγω ταχεία εξέταση της εταιρείας R-Biopharm AG, διενεργείται σε ένα στάδιο και πρόκειται για ανοσοχρωματογραφική εξέταση πλευρικής ροής, κατά την οποία γίνεται ζεύξη των ιών Rota με ειδικά αντισώματα σε σωματίδια λάτεξ, ενώ στη μεμβράνη τοποθετούνται σταθερά επιπλέον ειδικά αντισώματα ενάντι του παθογόνου. Τα σωματίδια λάτεξ συνδεδεμένα με αντιγόνα περνούν μέσω της μεμβράνης και δεσμεύονται σε συγκεκριμένες ταινίες.

1) Προετοιμασία αντιδραστηρίων και δείγματος

1. Πριν από τη χρήση, τα δείγματα, τα αντιδραστήρια και οι κασέτες εξέτασης πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 °C). Η συσκευασία ανοίγεται λίγο πριν τη χρήση.
2. Μεταφέρουμε σε σωληνάριο τύπου errendorf 1 ml αραιωτικού διαλύματος (diluent)
3. Μεταφέρονται στο σωληνάριο με το αραιωτικό 100μl διαρροϊκών κοπράνων (στην περίπτωση στερεών κοπράνων διαλύονται 50mg στο αραιωτικό)
4. Ομογενοποιούμε το δείγμα με τη βοήθεια αναδευτήρα
5. Αφήνουμε σε ηρεμία το διάλυμα ώστε να καθιζάνουν τυχόν στερεά

2) Εξέταση του δείγματος

1. Η κασέτα αφαιρείται από την ατομική συσκευασία και τοποθετείται στον πάγκο
2. Μεταφέρουμε 200 μl απο το υπερκείμενο του αραιωμένου δείγματος στην ειδική υποδοχή της κασέτας
3. Επωάζουμε για 5 λεπτά και ελέγχουμε το αποτέλεσμα

3) Αξιολόγηση και ερμηνεία

Ο μέγιστος αριθμός των ταινιών που ενδέχεται να εμφανιστούν είναι δύο με την ακόλουθη σειρά: Μία κόκκινη ταινία θετικής αντίδρασης και μία μπλε ταινία ελέγχου.

Σε περίπτωση που απουσιάζει η μπλε ταινία απορρίπτουμε την κασέτα και επαναλαμβάνουμε

Οι ακόλουθες ερμηνείες είναι πιθανές:

Θετικό για ιούς Rota : η κόκκινη και η μπλε ταινία είναι ορατές.

Αρνητικό για ιούς Rota : μόνο η μπλε ταινία είναι ορατή.

Άκυρο: καμία ταινία ή κανένας άλλος συνδυασμός ως περιγράφονται παραπάνω δεν είναι ορατός

## 2.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ ΜΕ IN-HOUSE ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ RT-PCR ΚΑΙ ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

### 2.3.1. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ PURELINK® RNA MINI KIT (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., USA)

#### Υλικά και Εξοπλισμός

- Αιθανόλη 96-100%
- Αποστειρωμένα φιαλίδια με πιεστό πώμα (ependorfs) των 1,5ml
- Genomic Lysis/Binding Buffer 10 mL
- Genomic Digestion Buffer 9 mL
- Genomic Wash Buffer 1 10 mL
- Genomic Wash Buffer 2 7.5 mL
- Genomic Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA) 10 mL
- Spin Columns with Collection Tubes 50
- PureLink® Collection Tubes (2.0 mL) 100
- Phosphate Buffered Saline (PBS), 0,1 M, pH 7,4

#### 1) Προετοιμασία Δείγματος

1. Σε δείγμα κοπράνων προσθέτουμε κατάλληλη ποσότητα PBS, έτσι ώστε το διάλυμα να έχει τελική συγκέντρωση κοπράνων 10-20 %.
2. Φυγοκεντρούμε στις 8,000 g για 15 λεπτά, στους 4°C.
3. Μεταφέρουμε 1 ml του υπερκείμενου υγρού σε αποστειρωμένο φιαλίδιο με πιεστό πώμα (ependorfs) των 2,5ml.

#### 2) Προετοιμασία προϊόντος λύσης

1. Προσθέτουμε 0,3 ml Lysis Buffer, στο οποίο περιέχεται 2-μερκαπτοαιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 1%, στο φιαλίδιο των 2,5 ml που περιέχει το 1 ml υπερκείμενου υγρού.
2. Αναδεύουμε το διάλυμα μέχρι την πλήρη διασπορά και λύση των κυττάρων.
3. Πραγματοποιούμε ομογενοποίηση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθέτουμε 1000 µL αιθανόλης 96-100% στο προϊόν λύσης. Αναμειγνύουμε καλά με περιδίνηση για 5 δευτερόλεπτα για να προκύψει ένα ομοιογενές διάλυμα.
5. Προχωρούμε αμέσως στη διαδικασία της δέσμευσης RNA.

### 3) Δέσμευση RNA (Binding RNA)

1. Μεταφέρουμε μια στήλη PureLink® Spin σε έναν σωλήνα συλλογής από τη συσκευασία.
2. Προσθέτουμε 350 μL από το προϊόν λύσης που παρασκευάσαμε με το Genomic Lysis/Binding Buffer και την αιθανόλη, στη στήλη Spin.
3. Φυγοκεντρούμε τη στήλη (12.000 g για 15 δευτερόλεπτα) σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Απορρίπτουμε το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε την στήλη (spin column) στο ίδιο σωλήνα συλλογής.
5. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2, 3 και 4 μέχρι τη φόρτωση και φυγοκέντρηση του συνόλου του προϊόντος λύσης.
6. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση, απορρίπτουμε τον σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε την στήλη (spin column) σε ένα καθαρό PureLink® σωλήνα συλλογής που παρέχεται με το κιτ.
7. Προχωρούμε στη διαδικασία έκπλυσης του RNA (Washing RNA).

### 4) Έκπλυση RNA (Washing RNA)

1. Προσθέτουμε στη στήλη 700μl Wash Buffer 1 που παρασκευάσαμε με αιθανόλη.
2. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 12.000 g για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Απορρίπτουμε τον σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη (spin column) σε ένα καθαρό PureLink® σωλήνα συλλογής που παρέχεται με το κιτ.
4. Προσθέτουμε στη στήλη 500μl Wash Buffer 2 που παρασκευάσαμε με αιθανόλη.
5. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 12.000 g για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής.
6. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 4 και 5 μία φορά ακόμη.
7. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 12.000 g για 1-2 λεπτά, προκειμένου να στεγνώσει η μεμβράνη με το δεσμευμένο RNA.
8. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη (spin column) σε σωλήνα ανάκτησης.
9. Προχωρούμε στη διαδικασία Έκλυσης του DNA.

#### 5) Έκλουση RNA (Eluting RNA)

1. Προσθέτουμε στη στήλη 30-100  $\mu\text{l}$  RNase-free water. Συνήθως η ποσότητα που επιλέγεται είναι τα 50  $\mu\text{l}$ .
2. Αφήνουμε να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
3. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 12.000g για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για τη εκχύλιση του RNA από τη μεμβράνη της στήλης στο σωλήνα ανάκτησης. Ο σωλήνας περιέχει καθαρισμένο γενωμικό υλικό.
4. Για να ανακτήσουμε επιπλέον RNA, είναι δυνατό να εκτελέσουμε 3 διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης με τον ίδιο όγκο RNase-free water συλλέγοντας το προϊόν των εκπλύσεων στον σωλήνα ανάκτησης.

#### 6) Αποθήκευση RNA (Storing RNA)

1. Για άμεση χρήση του καθαρισμένου RNA τοποθετούμε τον περιέκτη σε πάγο.
2. Για την αποφυγή επαναλαμβανόμενης ψύξης-απόψυξης του RNA, αποθηκεύουμε το RNA στους 4° C, αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί άμεσα ή το μοιράζουμε σε κλάσματα και το αποθηκεύουμε στους -20°C για παρατεταμένη αποθήκευση.

### 2.3.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ 1-STEP RT-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ

#### Υλικά και Εξοπλισμός

- 5x Ρυθμιστικό QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer: (Tris-HCl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 8.7, 12.5 mM  $\text{MgCl}_2$ )
- 10  $\mu\text{M}$  Εμπρόσθιος εκκινητής ( Forward primer)
- 10  $\mu\text{M}$  Οπίσθιος εκκινητής (Reverse primer)
- Qiagen dNTP Mix 10 mM κάθε Δεοξυριβονουκλεοτιδίου (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix
- Νερό χωρίς ριβονουκλεάσες (RNase free water)
- Αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια με πιεστό πώμα των 200  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 1,5 ml
- Μονοκάναλες Πιπέττες μεταβλητού όγκου των 10 $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 1000 $\mu\text{l}$
- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπέττας των 10 $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 1000 $\mu\text{l}$
- Θερμοκυκλοποιητής (Thermocycler)
- Μικροφυγόκεντρος (Microcentrifuge)
- Αναδευτήρας (Vortex)



**Πρωτόκολλο Νο 1 :** Πρωτόκολλο ταυτοποίησης μέσω ενίσχυσης γενωμικής περιοχής που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VP6 του ιού.

Ακολουθία των εκκινητών

- VP6-F: 5' GAC GGV GCR ACT ACA TGG T 3'
- VP6-R: 5' GTC CAA TTC ATN CCT GGT GG 3'

Product: 379bp

Iturriza Gomara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: Correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. J Virol. 2002; 76:6596–6601.

1) Δημιουργία Μίγματος αντίδρασης PCR τελικού όγκου 25μl

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5x	1x	5 μl
Qiagen dNTPs Mix	10 mM	0.4 mM	1 μl
Primer VP6-F	10 μM	20 pmoles	0,75 μl
Primer VP6-R	10 μM	20 pmoles	0,75 μl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix			1 μl
RNase-free H <sub>2</sub> O			6,5 μl
Μήτρα RNA			10 μl
Συνολικός όγκος			25 μl

1. Υπολογίζεται η συνολική ποσότητα που απαιτείται από το κάθε αντιδραστήριο για το συνολικό αριθμό των δειγμάτων και των θετικών/αρνητικών controls προς επεξεργασία και καταγράφεται.
2. Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο με πιεστό πώμα όγκου 500 μl ή 1,5 ml και δουλεύοντας σε πάγο, εισάγουμε τη συνολική ποσότητα του κάθε αντιδραστηρίου που υπολογίσαμε παραπάνω, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην αλλαγή του ρύγχους της πιπέτας από το ένα αντιδραστήριο στο άλλο. Το διάλυμα που παρασκευάζεται, καλείται Master Mix.
3. Τοποθετούμε αριθμό αποστειρωμένων φιαλιδίων με πιεστό πώμα χωρητικότητας 200μl ίσο με τον αριθμό των δειγμάτων και των controls. Σημαίνονται κατάλληλα.
4. Σε κάθε φιαλίδιο εισάγονται 22,5 μl Master Mix και 2,5 μl μήτρας RNA, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 25 μl, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην αλλαγή του ρύγχους της πιπέτας από τον ένα σωλήνα με εκχυλισμένο γενωμικό υλικό στον άλλο και χωρίς το σώμα της πιπέτας να ακουμπήσει στα τοιχώματά τους.

## 2) Προετοιμασία Θερμοκυκλοποιητή

5. Τοποθετούμε τους σωλήνες συλλογής χωρητικότητας 200μl στο θερμοκυκλοποιητή και καταγράφουμε τη σειρά με την οποία τους τοποθετήσαμε.
6. Κλείνουμε το καπάκι του μπλοκ που επιλέξαμε και το ασφαλίζουμε.
7. Ενεργοποιούμε τον θερμοκυκλοποιητή.
8. Επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα στο θερμοκυκλοποιητή με θερμαινόμενο καπάκι (heated lid).

## 3) Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή

1. 50°C για 30 λεπτά
2. 95°C για 15 λεπτά
3. 94°C για 1 λεπτό
4. 55°C για 1 λεπτό
5. 72°C για 1 λεπτό
6. Επανάληψη των βημάτων 3, 4, 5 για 34 πρόσθετες φορές
7. 72°C για 10 λεπτά

#### 4) Ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα συγκέντρωσης αγαρόζης 2% με βρωμιούχο αιθίδιο 0.5 µg/ml (200 V για 20 λεπτά). Η μπάντα που αναμένουμε έχει μέγεθος 379 bp.

**Πρωτόκολλο Νο 2:** Πρωτόκολλο G τυποποίησης μέσω ενίσχυσης γενωμικής περιοχής που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VP7 του ιού.

Ακολουθία των εκκινητών

- Beg 9 (Forward): 5' GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G 3'
- End 9 (Reverse): 5' GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG 3'

Product: 1062 bp

Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., Fang Z.Y., 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acids from stool specimens. J. Clin. Microbiol. 28, 276–282.

##### 1) Δημιουργία Μίγματος αντίδρασης PCR τελικού όγκου 25µl

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5x	1x	5 µl
Qiagen dNTPs Mix	10 mM	0.4 mM	1 µl
Primer Beg 9	20 µM	15 pmoles	0,75 µl
Primer End 9	20 µM	15 pmoles	0,75 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix			1 µl
RNase-free H <sub>2</sub> O			6,5 µl
Μήτρα RNA			10 µl
<b>Συνολικός όγκος</b>			<b>25 µl</b>

1. Υπολογίζεται η συνολική ποσότητα που απαιτείται από το κάθε αντιδραστήριο για το συνολικό αριθμό των δειγμάτων και των θετικών/αρνητικών controls προς επεξεργασία και καταγράφεται.
2. Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο με πιεστό πώμα όγκου 500 μl ή 1,5 ml και δουλεύοντας σε πάγο, εισάγουμε τη συνολική ποσότητα του κάθε αντιδραστηρίου που υπολογίσαμε παραπάνω, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην αλλαγή του ρύγχους της πιπέτας από το ένα αντιδραστήριο στο άλλο. Το διάλυμα που παρασκευάζεται, καλείται Master Mix.
3. Τοποθετούμε 12μl μήτρας RNA κάθε δείγματος σε ξεχωριστό αποστειρωμένο φιαλίδιο με πιεστό πώμα.
4. Βυθίζουμε το φιαλίδια που περιέχουν τη μήτρα RNA σε προθερμασμένο υδατόλουτρο, στους 95oC για 3 λεπτά.
5. Αποσύρουμε γρήγορα τα φιαλίδια από το υδατόλουτρο και τα τοποθετούμε αμέσως σε πάγο, για διάστημα τουλάχιστον 2 λεπτών.
6. Τοποθετούμε αριθμό αποστειρωμένων φιαλιδίων με πιεστό πώμα χωρητικότητας 200μl ίσο με τον αριθμό των δειγμάτων και των controls. Σημαίνονται κατάλληλα.
7. Σε κάθε φιαλίδιο εισάγονται 15 μl Master Mix και 10 μl μήτρας RNA, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 25 μl, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην αλλαγή του ρύγχους της πιπέτας από τον ένα σωλήνα με εκχυλισμένο γενωμικό υλικό στον άλλο και χωρίς το σώμα της πιπέτας να ακουμπήσει στα τοιχώματά τους.

## 2) Προετοιμασία Θερμοκυκλοποιητή

1. Τοποθετούμε τους σωλήνες συλλογής χωρητικότητας 200μl στο θερμοκυκλοποιητή και καταγράφουμε τη σειρά με την οποία τους τοποθετήσαμε.
2. Κλείνουμε το καπάκι του μπλοκ που επιλέξαμε και το ασφαλίζουμε.
3. Ενεργοποιούμε τον θερμοκυκλοποιητή.
4. Επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα στο θερμοκυκλοποιητή με θερμαινόμενο καπάκι (heated lid).

### 3) Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή

1. 50°C για 30 λεπτά
2. 95°C για 15 λεπτά
3. 94°C για 30 δευτερόλεπτα
4. 45°C για 30 δευτερόλεπτα
5. 72°C για 3 λεπτά
6. Επανάληψη των βημάτων 3, 4, 5 για 34 πρόσθετες φορές
7. 72°C για 10 λεπτά

### 4) Ηλεκτροφόρηση γέλης αραρόζης

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα συγκέντρωσης αραρόζης 2% με βρωμιούχο αιθίδιο 0.5 µg/ml (200 V για 20 λεπτά). Η μπάντα που αναμένουμε έχει μέγεθος 1062 bp.

**Πρωτόκολλο Νο3:** Διαδικασία P τυποποίησης Ροταϊών μέσω ενίσχυσης γενωμικής περιοχής που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VP4 του ιού και ανάγνωσης της γενετικής αλληλουχίας.

Ακολουθία των εκκινητών

- Con 3: 5' TGG-CTT-CGC-TCA-TTT-ATA-GAC-A 3'
- Con 2: 5' ATT-TCG-GAC-CAT-TTA-TAA-CC 3'

Product: 876 bp

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 30:1365–1373.

1) Δημιουργία Μίγματος αντίδρασης PCR τελικού όγκου 25μl

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5x	1x	5 μl
Qiagen dNTPs Mix	10 mM	0.4 mM	1 μl
Primer Con3	20 μM	15 pmoles	0,75 μl
Primer Con2	20 μM	15 pmoles	0,75 μl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix			1 μl
RNase-free H <sub>2</sub> O			6,5 μl
Μήτρα RNA			10 μl
Συνολικός όγκος			25 μl

- Υπολογίζεται η συνολική ποσότητα που απαιτείται από το κάθε αντιδραστήριο για το συνολικό αριθμό των δειγμάτων και των θετικών/αρνητικών controls προς επεξεργασία και καταγράφεται.
  - Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο με πιεστό πώμα όγκου 500 μl ή 1,5 ml και δουλεύοντας σε πάγο, εισάγουμε τη συνολική ποσότητα του κάθε αντιδραστηρίου που υπολογίσαμε παραπάνω, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην αλλαγή του ρύγχους της πιπέτας από το ένα αντιδραστήριο στο άλλο. Το διάλυμα που παρασκευάζεται, καλείται Master Mix.
  - Τοποθετούμε αριθμό αποστειρωμένων φιαλιδίων με πιεστό πώμα χωρητικότητας 200μl ίσο με τον αριθμό των δειγμάτων και των controls. Σημαίνονται κατάλληλα.
  - Σε κάθε φιαλίδιο εισάγονται 15 μl Master Mix και 10 μl μήτρας RNA, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 25 μl, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην αλλαγή του ρύγχους της πιπέτας από τον ένα σωλήνα με εκχυλισμένο γενωμικό υλικό στον άλλο και χωρίς το σώμα της πιπέτας να ακουμπήσει στα τοιχώματά τους.
- 2) Προετοιμασία Θερμοκυκλοποιητή

1. Τοποθετούμε τους σωλήνες συλλογής χωρητικότητας 200μl στο θερμοκυκλοποιητή και καταγράφουμε τη σειρά με την οποία τους τοποθετήσαμε.
2. Κλείνουμε το καπάκι του μπλοκ που επιλέξαμε και το ασφαλίζουμε.
3. Ενεργοποιούμε τον θερμοκυκλοποιητή.
4. Επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα στο θερμοκυκλοποιητή με θερμαινόμενο καπάκι (heated lid).

### 3) Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή

1. 50°C για 30 λεπτά
2. 95°C για 15 λεπτά
3. 94°C για 1 λεπτό
4. 40°C για 1 λεπτό
5. 72°C για 1 λεπτό
6. Επανάληψη των βημάτων 3, 4, 5 για 29 πρόσθετες φορές
7. 72°C για 10 λεπτά

### 4) Ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα συγκέντρωσης αγαρόζης 2% με βρωμιούχο αιθίδιο 0.5 μg/ml (200 V για 20 λεπτά). Η μπάντα που αναμένουμε έχει μέγεθος 876 bp.

## 2.3.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Υλικά και εξοπλισμός

Ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης

- Αγαρόζη
- 10x Ρυθμιστικό διάλυμα Tris base, acetic acid, EDTA (TAE Buffer)
- Απιονισμένο νερό
- Βρωμιούχο αιθίδιο 10mg/ml
- Κωνική φιάλη των 500 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 1000ml
- Συσσκευή ηλεκτροφόρησης
- DNA κλίμακα των 100 kb (100 Kb DNA Ladder)
- Βαφή φόρτωσης γέλης (Gel Loading Dye)

Φωτογράφιση της γέλης αγαρόζης μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης

- Φωτογραφική μηχανή συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής με εγκατεστημένο πρόγραμμα προβολής και επεξεργασίας φωτογραφιών, συνδεδεμένος με την φωτογραφική μηχανή
- Συσκευή υπεριώδους διαφανοσκόπησης

#### 1) Παρασκευή γέλης αγαρόζης

Σε ογκομετρικό σωλήνα χωρητικότητας 1L προσθέτουμε 450 ml απιονισμένου νερού και 50 ml TAE 10X.

Από το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X χρησιμοποιούμε 100ml για την παρασκευή της γέλης αγαρόζης ως εξής:

1. Σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 500ml προσθέτουμε 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1X και ποσότητα σκόνης αγαρόζης ανάλογη με τη συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα, που απαιτείται (π.χ. για πήκτωμα με συγκέντρωση αγαρόζης 2%, θα προσθέσουμε 2 gr σκόνης αγαρόζης).
2. Κρατώντας την κωνική φιάλη και με κυκλικές κινήσεις αναδεύουμε το περιεχόμενό της.
3. Τοποθετούμε την κωνική φιάλη στον φούρνο μικροκυμάτων.
4. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα παρακολουθούμε το περιεχόμενο της φιάλης ώστε να μην ξεκινήσει ο βρασμός του και τη βγάζουμε από τον φούρνο μικροκυμάτων, όταν πλέον η σκόνη έχει λιώσει και το περιεχόμενο είναι διαυγές.
5. Αφήνουμε το διάλυμα να κρυώσει. Για να επιταχύνουμε τη διαδικασία μπορούμε να κρατήσουμε την φιάλη κάτω από κρύο νερό, ώστε αυτό να έρχεται σε επαφή με την επιφάνειά της.
6. Εφόσον το διάλυμα έχει κρυώσει και δεν εξατμίζεται, προσθέτουμε την ποσότητα του βρωμιούχου αιθιδίου που απαιτείται (τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml) με προσοχή και φορώντας γάντια υποχρεωτικά).
7. Τοποθετούμε τους δίσκους χύτευσης με τρόπο τέτοιο ώστε οι λαστιχένιες άκρες τους να σφραγίζουν με τα τοιχώματα του κουτιού της γέλης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
8. Τοποθετούμε το χτενάκι στην ειδική εγκοπή.
9. Αδειάζουμε μέρος του διαλύματος (περίπου 50ml) στους δίσκους χύτευσης.
10. Αφήνουμε τη γέλη αγαρόζης να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος περίπου για 20 λεπτά.
11. Γεμίζουμε την κωνική φιάλη με νερό βρύσης ώστε να αραιωθεί το εναπομείναν διάλυμα.



12. Αδειάζουμε το περιεχόμενό της σε κάδο απορριμμάτων ώστε να αποφύγουμε την στερεοποίηση της γέλης στις σωληνώσεις του δικτύου ύδρευσης αλλά και την επαφή του προσωπικού του εργαστηρίου με το βρωμιούχο αιθίδιο.
13. Μετά τη στερεοποίηση της γέλης αγαρόζης, αδειάζουμε τα υπόλοιπα 400ml του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

## 2) Φόρτωση των προϊόντων της PCR στη γέλη αγαρόζης

1. Τοποθετούμε 1μl dye για κάθε προϊόν PCR και 5μl για ladder σε αποστειρωμένη ταινία (parafilm).
2. Αναμειγνύουμε τα 5μl dye με τα 5μl ladder με πιπέττα με αποστειρωμένο ρύγχος με φίλτρο.
3. Ρυθμίζουμε την πιπέττα στα 10μl και φορτώνουμε το ladder στο πρώτο πηγαδάκι της στερεοποιημένης γέλης αγαρόζης.
4. Αναμειγνύουμε κάθε φορά το 1μl dye με 9μl προϊόν PCR με πιπέττα με αποστειρωμένο ρύγχος με φίλτρο και αφού ρυθμίσουμε την πιπέττα στα 10μl, φορτώνουμε το κάθε προϊόν PCR σε διαφορετικό πηγαδάκι, αλλάζοντας το ρύγχος της πιπέττας από το ένα προϊόν PCR στο άλλο.
5. Για την αποφυγή δημιουργίας οπής στη στερεοποιημένη γέλη αγαρόζης με το ρύγχος της πιπέττας, δεν ακουμπάμε με το ρύγχος της πιπέττας τη γέλη στον πυθμένα του κάθε πηγαδιού αλλά ούτε και στα τοιχώματά του. Τοποθετούμε το ρύγχος στο χείλος του πηγαδιού και αδειάζουμε το περιεχόμενό του.

## 3) Ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης

1. Θέτουμε σε λειτουργία τη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Ρυθμίζουμε την τάση στα κατάλληλα Volts (π.χ. 200).
3. Αφήνουμε τη γέλη αγαρόζης να τρέξει για τον απαιτούμενο χρόνο (π.χ. 20 λεπτά), παρακολουθώντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα την πορεία της διαδικασίας.
4. Απενεργοποιούμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
5. Αφαιρούμε τη στερεοποιημένη γέλη αγαρόζης από τους δίσκους χύτευσης.
6. Προχωρούμε στη διαδικασία φωτογράφισης της γέλης αγαρόζης.

## 4) Φωτογράφιση της γέλης αγαρόζης μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης

1. Τοποθετούμε το πήκτωμα αγαρόζης στη συσκευή υπεριώδους διαφανοσκόπησης.
2. Κλείνουμε το γυάλινο καπάκι.
3. Κλείνουμε τα φώτα στο χώρο.

4. Ενεργοποιούμε την υπεριώδη ακτινοβολία στη συσκευή .
5. Ενεργοποιούμε τη φωτογραφική μηχανή.
6. Ενεργοποιούμε τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.
7. Ανοίγουμε το πρόγραμμα φωτογράφησης που είναι αποθηκευμένο στον υπολογιστή.
8. Επεξεργαζόμαστε την φωτογραφία.
9. Αποθηκεύουμε την φωτογραφία στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

#### 2.3.4. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα θετικά προϊόντα PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το PureLink PCR Kit καθαρισμού (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και η αλληλουχία τους αναγνώστηκε αμφίδρομα χρησιμοποιώντας το φθορίζον Σύστημα προσδιορισμού αλληλουχίας Cycle sequencing του BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), ακολουθούμενο από διαχωρισμό θραυσμάτων με έναν 3.730xl αναλυτής DNA (Applied Biosystems).

Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη με τη χρήση του προγράμματος MEGA 3.1. Αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των γονιδίων VP6, VP7 και VP4 από άλλα στελέχη ροταϊών γνωστών G και P τύπων ανακτήθηκαν από την Genbank (NCBI). Neighbor-Joining φυλογενετικά δέντρα δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μήτρα απόστασης παραμέτρων Kimura-2, και τα οποία επιδεικνυαν τον τύπο στον οποίο ανήκει το κάθε εντοπισμένο στέλεχος σύμφωνα με την αναγνωσμένη αλληλουχία των VP7 και VP4 γενωμικών περιοχών.

#### 2.4. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ 2-STEP MULTIPLEX RT-PCR ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΜΙΓΜΑ ΕΙΔΙΚΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΠΟΥ ΟΔΗΓΟΥΝ ΣΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΑΝΑ ΤΥΠΟ ΡΟΤΑΪΟΥ.

Το πρωτόκολλο αποτελεί τροποποίηση του πρωτοκόλλου το οποίο προτάθηκε από το European Regional Rotavirus Laboratory, London, UK (WHO, Manual of rotavirus detection and characterization methods, Version 08.17)

Πίνακας 2: Εκκινητές VP7 γονιδίου Ρόταϊων

Primer	Sequence (5'→3')	Position
<b>Forward</b>		
9con1	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	nt 37-56
9con2	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	Nt922-941
9con1-L	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GGT AT	nt 37-59
Beg 9	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	nt 1-28
sBeg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTC	nt1-21
VP7-F	ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC	nt51-71
<b>Reverse</b>		
End 9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	nt 1062-1036
RVG9	GGTCACATCATACAATTCT	nt 1062-1044
dAnEnd9	GGTCACATCWWACARYTCTA	nt 1062-1045
VP7-R	AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC 3	nt 914-932
VP7-RINT	ANA YNG ANC CWG TYG GCC A	nt 331-344
VP7-Rdeg	AAC TTG CCA CCA TYT YTT CC	Nt 914-33

Πίνακας 3: Εκκινητές VP4 γονιδίου Ρόταϊων

Primer	Sequence (5'→3')	Position
Forward con3	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	nt 11-32
VP4-F	TAT GCT CCA GTN AAT TGG	nt 132-149
Reverse con2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	nt 868-887
VP4-R	ATT GCA TTT CTT TCC ATA ATG	nt 775-795

Πίνακας 4: Εκκινητές για την τυλοποίηση Ρόταϊων τύπου G

Primer	Sequence (5'→3')	Position	Type
9T-1	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG	nt176-195	G1
aBT1	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	nt 314-335	G1
9T-2	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT	nt 262-281	G2
aCT2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	nt411-435	G2
9T-3	GTC CAG TTG CAG TGT AGC	nt 484-501	G3
G3 or mG3	ACG AAC TCA ACA CGA GAG G	nt 250-269	G3
G3-Aust	ACG AAC TCA ACA CGA GAR G	nt250-269	G3
aET3	CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG	nt 689-709	G3
9T-4	GGG TCG ATG GAA AAT TCT	nt 423-440	G4
aDT4	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	nt 480-498	G4
aAT8	GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG	nt 178-198	G8
MW-8	TCTTCAAAAAGTCGTAGTG	nt 670 - 688	G8
9T-9	TAT AAA GTC CAT TGC AC	nt 131-147	G9
aFT9	CTA GAT GTA ACT ACA ACT AC	nt 757-776	G9
G9 or mG9	CTT GAT GTG ACT AYA AAT AC	nt 757-776	G9
G10 or mG10	ATG TCA GAC TAC ARA TAC TGG	nt 666-687	G10
G12	CCG ATG GACGTAACGTTGTA	nt 548 - nt567	G12

Πίνακας 5: Εκκινητές για την τυλοποίηση Ρόταϊων τύπου P

Primer	Sequence (5'→3')	Position	Type
pNCDV	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	nt 269-289	P[1]
2T-1	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	nt 474-494	P[4]
pUK	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	nt 336-354	P[5]
3T-1	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	nt 259-278	P[6]
pGott	GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG	nt 465-487	P[6]
pOSU	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	nt 389-412	P[7]
1T-1	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	nt 339 -356	P[8]
1T-1Wa	TCT ACT GGG TTA ACG TGC	Nt 339-356	P[8]
1T1-VN	TCT ACT GGA TCG ACG TGC	Nt 339-356	P[8]
1T-1D	TCT ACT GGR TTR ACN TGC	nt 339-356	P[8]
4T-1	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	nt 385-402	P[9]
5T-1	ATC ATA GTT AGT AGT CGG	nt 575-594	P[10]
ND2	AGC GAA CTC ACC AAT CTG	nt 116- 133	P[11]
P[11] or mP[11]	GTA AAC ATC CAG AAT GTG	nt 305-323	P[11]
pB223	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	nt 574-594	P[11]
p4943	GGTGTAGTTCCTGCGTA	nt 538-554	P[14]
SE-1	CTCTGCTACTCTACCTATTTG	nt 271-291	P[14]

## 1) Αντίστροφη Μεταγραφή

1. Αποδιάταξη ιϊκού dsRNA στους 97°C για 5 λεπτά. Ψύξη σε πάγο για 2 λεπτά

Μίγμα για την πραγματοποίηση RT αντίδρασης:

Υλικό	1 αντίδραση
Random Hexamer	1 µl
10mM dNTP mix	1 µl
5x RT Buffer	4 µl
RiboSafe RNase Inhibitor	1 µl
Tetro Reverse Transcriptase (200u/µl)	1 µl
Water	7 µl
dsRNA	5 µl

2. Επώαση για 10 min στους 25°C ακολουθούμενη από 45°C για 30 min
3. Τερματισμός αντίδρασης με επώαση στους 85°C για 5 min, ψύξη σε πάγο.

## 2) PCR – Πρώτος γύρος (Τυποποίηση G, VP7)

Προετοιμασία PCR Mix πρώτου γύρου χρησιμοποιώντας MyTaq HS Red Mix (Bioline)

Υλικό	1 reaction
MyTaq HS Red Mix, 2x	25 µl
Primer VP7-F (20 pmoles/µl)	1.0 µl
Primer VP7-R (20 pmoles/µl)	1.0 µl
RNase-free H <sub>2</sub> O	18 µl
cDNA	5 µl

1. Αρχική αποδιάταξη: 95 °C για 5 min
2. 35 κύκλοι:
  - a. Αποδιάταξη: 95 °C για 1 min
  - b. Υβριδισμός: 52 °C για 1 min
  - c. Επέκταση: 72 °C για 1 min
3. Τελική επέκταση: 72 °C για 7 min

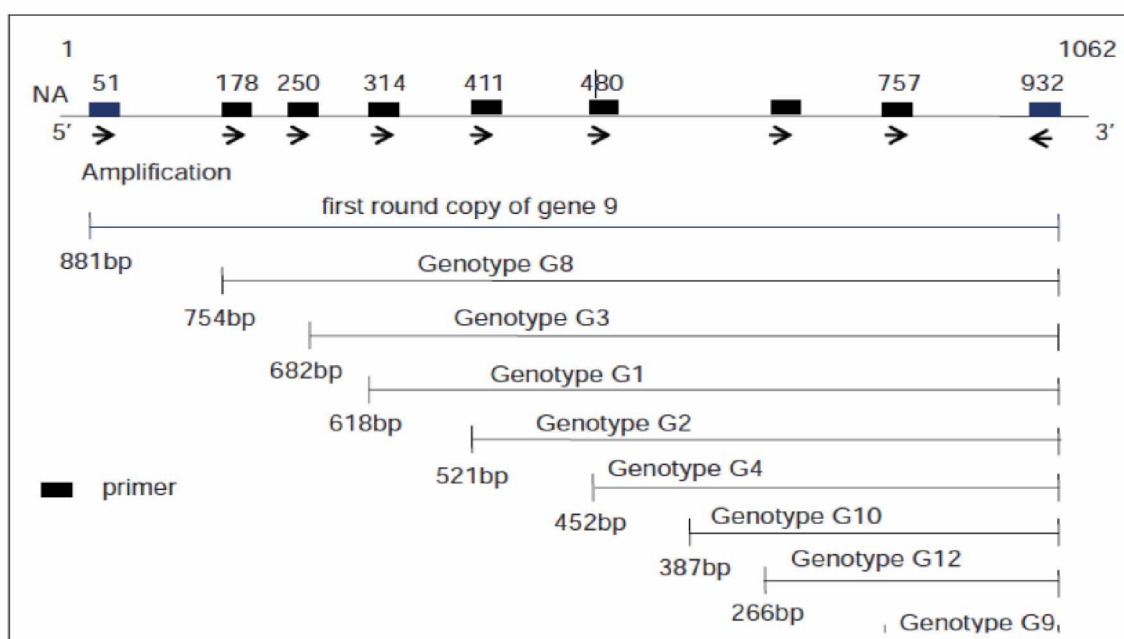
### 3) PCR – Δεύτερος γύρος (Τυποποίηση G, VP7)

Προετοιμασία PCR Mix δεύτερου γύρου χρησιμοποιώντας MyTaq HS Red Mix

Υλικό	1 reaction
MyTaq HS Red Mix, 2x	25 $\mu$ l
Primer VP7-R (20 pmoles/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer G1 (20 pmoles/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer G2 (20 pmoles/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer G3 (20 pmoles/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer G4 (20 pmoles/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer G8 (20 pmoles/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer G9 (20 pmoles/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer G10 (20 pmoles/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Primer G12 (20 pmoles/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
RNase-free H <sub>2</sub> O	14 $\mu$ l
Προϊόν PCR πρώτου γύρου	2 $\mu$ l

1. Αρχική αποδιάταξη: 95 °C για 3 min
2. 30 κύκλοι:
  - a. Αποδιάταξη: 95 °C για 1 min
  - b. Υβριδισμός: 42 °C για 1 min
  - c. Επέκταση: 72 °C για 1 min
3. Τελική επέκταση: 72 °C για 7 min

Εικόνα 14 : Σχηματική αναπαράσταση καθορισμού του γονοτύπου της VP7 περιοχής



#### 4) PCR – Πρώτος γύρος (Τυποποίηση P, VP4)

Προετοιμασία PCR Mix πρώτου γύρου χρησιμοποιώντας MyTaq HS Red Mix

Υλικό	1 reaction
MyTaq HS Red Mix, 2x	25 µl
Primer VP4-F (20 pmoles/µl)	1.0 µl
Primer VP4-R (20 pmoles/µl)	1.0 µl
RNase-free H <sub>2</sub> O	18 µl
cDNA	5 µl

1. Αρχική αποδιάταξη: 95 °C για 2 min
2. 35 κύκλοι:
  - a. Αποδιάταξη: 95 °C για 1 min
  - b. Υβριδισμός: 50 °C για 1 min
  - c. Επέκταση: 72 °C για 1 min
3. Τελική επέκταση: 72 °C για 7 min

#### 5) PCR – Δεύτερος γύρος (Τυποποίηση P, VP4)

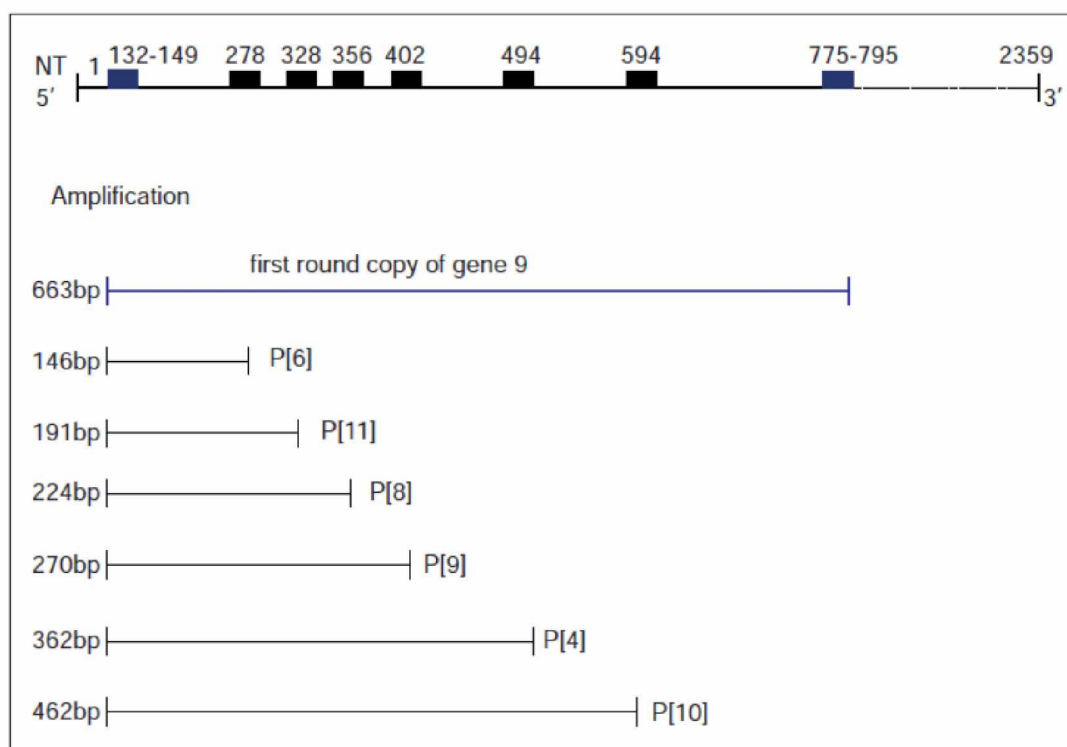
Προετοιμασία PCR Mix δεύτερου γύρου χρησιμοποιώντας MyTaq HS Red Mix

Υλικό	1 reaction
MyTaq HS Red Mix, 2x	25 µl
Primer VP7-R (20 pmoles/µl)	1.0 µl
Primer G1 (20 pmoles/µl)	1.0 µl
Primer G2 (20 pmoles/µl)	1.0 µl
Primer G3 (20 pmoles/µl)	1.0 µl
Primer G4 (20 pmoles/µl)	1.0 µl
Primer G8 (20 pmoles/µl)	1.0 µl
Primer G9 (20 pmoles/µl)	1.0 µl
Primer G10 (20 pmoles/µl)	1.0 µl
Primer G12 (20 pmoles/µl)	1.0 µl
RNase-free H <sub>2</sub> O	14 µl
Προϊόν PCR πρώτου γύρου	2 µl

1. Αρχική αποδιάταξη: 95 °C για 3 min
2. 30 κύκλοι:
  - d. Αποδιάταξη: 95 °C για 1 min
  - e. Υβριδισμός: 42 °C για 1 min
  - f. Επέκταση: 72 °C για 1 min
3. Τελική επέκταση: 72 °C για 7 min



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση καθορισμού του γονοτύπου της VP4 περιοχής



## 2.5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ ΜΕ IN-HOUSE ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ RT-PCR ΚΑΙ ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

### 2.5.1. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ QIAAMP® VIRAL RNA MINI KIT (QIAGEN)

#### Υλικά και Εξοπλισμός

- Αιθανόλη 96-100%
- Αποστειρωμένα φιαλίδια με πιεστό πώμα (ependorfs) των 1,5ml
- Buffer AVL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer AVE
- Carrier RNA (poly A)
- QIAamp Mini Spin Columns
- Collection Tubes (2 ml)
- Φίλτρα διήθησης πόρων διαμέτρου 220 nm

#### 1) Προετοιμασία Δείγματος

1. Σε δείγμα κοπράνων ποσότητας 100 μl προσθέτουμε ποσότητα 900 μl PBS, έτσι ώστε το διάλυμα να έχει τελική συγκέντρωση κοπράνων 10-20 %.
2. Φυγοκεντρούμε στις 3,000 g για 5 λεπτά, στους 4°C.
3. Διηθούμε το υπερκείμενο από φίλτρα διήθησης πόρων διαμέτρου 220 nm.

## 2) Προετοιμασία προϊόντος λύσης

1. Μεταφέρουμε 140 μl του διηθημένου υγρού σε αποστειρωμένο φιαλίδιο με πιεστό πώμα (erppendorfs) των 1,5ml όπου περιέχονται 560 μl έτοιμου Buffer AVL το οποίο περιέχει 5,6 μl carrier RNA .
2. Αναδεύουμε το διάλυμα (vortexing) για 15 sec.
3. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
4. Προσθέτουμε 560 μl αιθανόλης 96-100% στο προϊόν λύσης. Αναμειγνύουμε καλά με περιδίνηση για 15 δευτερόλεπτα για να προκύψει ένα ομοιογενές διάλυμα.
5. Προχωρούμε αμέσως στη διαδικασία της δέσμευσης RNA.

## 3) Δέσμευση RNA (Binding RNA)

1. Μεταφέρουμε μια στήλη QIAamp Mini column σε έναν σωλήνα συλλογής 2 ml από τη συσκευασία.
2. Προσθέτουμε 630 μl από το προϊόν λύσης που παρασκευάσαμε στη στήλη QIAamp Mini column.
3. Φυγοκεντρούμε τη στήλη (6.000 g για 1 λεπτό) σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Απορρίπτουμε το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε την στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής που παρέχεται με το κιτ.
5. Προχωρούμε στη διαδικασία έκπλυσης του RNA (Washing RNA).

## 4) Έκπλυση RNA (Washing RNA)

1. Προσθέτουμε στη στήλη 500μl Buffer AW1 που παρασκευάσαμε με αιθανόλη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
2. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 6.000 g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Απορρίπτουμε τον σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής που παρέχεται με το κιτ.
4. Προσθέτουμε στη στήλη 500μl Buffer AW2 που παρασκευάσαμε με αιθανόλη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
5. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 20.000 g για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής.
6. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 20.000 g για 1 λεπτό, προκειμένου να στεγνώσει η μεμβράνη με το δεσμευμένο RNA.

7. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε σωλήνα ανάκτησης 1.5 ml (δε παρέχεται από το κατασκευαστή).
8. Προχωρούμε στη διαδικασία Έκλουσης του DNA.

#### 5) Έκλουση RNA (Eluting RNA)

1. Προσθέτουμε στη στήλη 60 μl Buffer AVE.
2. Αφήνουμε να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
3. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 6.000g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για τη εκχύλιση του RNA από τη μεμβράνη της στήλης στο σωλήνα ανάκτησης. Ο σωλήνας περιέχει καθαρισμένο γενωμικό υλικό.

#### 6) Αποθήκευση RNA (Storing RNA)

1. Για άμεση χρήση του καθαρισμένου RNA τοποθετούμε τον περιέκτη σε πάγο.
2. Για την αποφυγή επαναλαμβανόμενης ψύξης-απόψυξης του RNA, αποθηκεύουμε το RNA στους 4° C, αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί άμεσα ή το μοιράζουμε σε κλάσματα και το αποθηκεύουμε στους -20°C για παρατεταμένη αποθήκευση.

### 2.5.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ 1-STEP RT-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ

#### Υλικά και Εξοπλισμός

- 5x Ρυθμιστικό QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer: (Tris-HCl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.7, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 10 μM Εμπρόσθιος εκκινητής ( Forward primer)
- 10 μM Οπίσθιος εκκινητής (Reverse primer)
- Qiagen dNTP Mix 10 mM κάθε Δεοξυριβονουκλεοτιδίου (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix
- Νερό χωρίς ριβονουκλεάσες (RNase free water)
- Αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια με πιεστό πώμα των 200 μl, 500 μl, 1,5 ml
- Μονοκάναλες Πιπέττες μεταβλητού όγκου των 10μl, 100 μl, 1000μl
- Αποστειρωμένα ρύγχη πιπέττας των 10μl, 100 μl, 1000μl
- Θερμοκυκλοποιητής (Thermocycler)
- Μικροφυγόκεντρος (Microcentrifuge)
- Αναδευτήρας (Vortex)

Πρωτόκολλο ταυτοποίησης μέσω ενίσχυσης γενωμικής περιοχής που κωδικοποιεί το καψίδιο του ιού.

Κατά τη παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε πρωτόκολλο 1-step RT-PCR για τη ταυτόχρονη ανίχνευση Νοροϊών τύπου GI και GII, χωρίς την ανάγκη χρονοβόρας δημιουργίας cDNA από το εκχυλισθέν ιικό RNA του δείγματος.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν από τη σχετική βιβλιογραφία και είναι οι ακόλουθοι:

Norovirus GII

COG2F: CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG

G2SKR: CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT

Προϊόν: 387 bp

Norovirus GI

G1SKF: CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA

G1SKR: CCA ACC CAR CCA TTR TAC A

Προϊόν: 330 bp

Yan, H., Yagyū, F., Okitsu, S., Nishio, O., Ushijima, H., 2003. Detection of norovirus (GI, GII) Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J. Virol. Methods* 114, 37–44.

1) Δημιουργία Μίγματος αντίδρασης PCR τελικού όγκου 50μl

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΟΓΚΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5x	1x	10 μl
Qiagen dNTPs Mix	10 mM	0.4 mM	2 μl
Primer COG2F	10 μM	30 pmoles/reaction	3 μl
Primer G2SKR	10 μM	30 pmoles/reaction	3 μl
Primer G1SKF	10 μM	30 pmoles/reaction	3 μl
Primer G1SKR	10 μM	30 pmoles/reaction	3 μl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix			2 μl
RNase-free H <sub>2</sub> O			20 μl
Μήτρα RNA			4 μl
Συνολικός όγκος			50 μl

- Υπολογίζεται η συνολική ποσότητα που απαιτείται από το κάθε αντιδραστήριο για το συνολικό αριθμό των δειγμάτων και των θετικών/αρνητικών controls προς επεξεργασία και καταγράφεται.
- Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο με πιεστό πώμα όγκου 500 μl ή 1,5 ml και δουλεύοντας σε πάγο, εισάγουμε τη συνολική ποσότητα του κάθε αντιδραστηρίου που υπολογίσαμε παραπάνω, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην αλλαγή του ρύγχους της πιπέτας από το ένα αντιδραστήριο στο άλλο. Το διάλυμα που παρασκευάζεται, καλείται Master Mix.
- Τοποθετούμε αριθμό αποστειρωμένων φιαλιδίων με πιεστό πώμα χωρητικότητας 200μl ίσο με τον αριθμό των δειγμάτων και των controls. Σημαίνονται κατάλληλα.
- Σε κάθε φιαλίδιο εισάγονται 46 μl Master Mix και 4 μl μήτρας RNA, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50 μl, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην

αλλαγή του ρύγχους της πιπέτας από τον ένα σωλήνα με εκχυλισμένο γενωμικό υλικό στον άλλο και χωρίς το σώμα της πιπέτας να ακουμπήσει στα τοιχώματά τους.

## 2) Προετοιμασία Θερμοκυκλοποιητή

1. Τοποθετούμε τους σωλήνες συλλογής χωρητικότητας 200μl στο θερμοκυκλοποιητή και καταγράφουμε τη σειρά με την οποία τους τοποθετήσαμε.
2. Κλείνουμε το καπάκι του μπλοκ που επιλέξαμε και το ασφαλίζουμε.
3. Ενεργοποιούμε τον θερμοκυκλοποιητή.
4. Επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα στο θερμοκυκλοποιητή με θερμαινόμενο καπάκι (heated lid).

## 3) Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή

1. 50°C για 30 λεπτά
2. 95°C για 15 λεπτά
3. 94 °C για 1 λεπτό
4. 50 °C για 1 λεπτό
5. 72 °C για 1 λεπτό
6. Επανάληψη των βημάτων 3, 4, 5 για 34 πρόσθετες φορές
7. 72°C για 10 λεπτά

## 4) Ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα συγκέντρωσης αγαρόζης 2% με βρωμιούχο αιθίδιο 0.5 μg/ml (200 V για 20 λεπτά). Η μπάντα που αναμένουμε έχει μέγεθος 387 bp για Νοροϊούς τύπου GII και 330 bp για Νοροϊούς τύπου GI.

### 2.5.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Υλικά και εξοπλισμός

Ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης

- Αγαρόζη
- 10x Ρυθμιστικό διάλυμα Tris base, acetic acid, EDTA (TAE Buffer)
- Απιονισμένο νερό
- Βρωμιούχο αιθίδιο 10mg/ml

- Κωνική φιάλη των 500 ml
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 1000ml
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- DNA κλίμακα των 100 kb (100 Kb DNA Ladder)
- Βαφή φόρτωσης γέλης (Gel Loading Dye)

Φωτογράφιση της γέλης αγαρόζης μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης

- Φωτογραφική μηχανή συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής με εγκατεστημένο πρόγραμμα προβολής και επεξεργασίας φωτογραφιών, συνδεδεμένος με την φωτογραφική μηχανή
- Συσκευή υπεριώδους διαφανοσκόπησης

#### 1) Παρασκευή γέλης αγαρόζης

Σε ογκομετρικό σωλήνα χωρητικότητας 1L προσθέτουμε 450 ml απιονισμένου νερού και 50 ml TAE 10X.

Από το ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X χρησιμοποιούμε 100ml για την παρασκευή της γέλης αγαρόζης ως εξής:

1. Σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 500ml προσθέτουμε 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1X και ποσότητα σκόνης αγαρόζης ανάλογη με τη συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα, που απαιτείται (π.χ. για πήκτωμα με συγκέντρωση αγαρόζης 2%, θα προσθέσουμε 2 gr σκόνης αγαρόζης).
2. Κρατώντας την κωνική φιάλη και με κυκλικές κινήσεις αναδεύουμε το περιεχόμενό της.
3. Τοποθετούμε την κωνική φιάλη στον φούρνο μικροκυμάτων.
4. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα παρακολουθούμε το περιεχόμενο της φιάλης ώστε να μην ξεκινήσει ο βρασμός του και τη βγάζουμε από τον φούρνο μικροκυμάτων, όταν πλέον η σκόνη έχει λιώσει και το περιεχόμενο είναι διαυγές.
5. Αφήνουμε το διάλυμα να κρυώσει. Για να επιταχύνουμε τη διαδικασία μπορούμε να κρατήσουμε την φιάλη κάτω από κρύο νερό, ώστε αυτό να έρχεται σε επαφή με την επιφάνειά της.
6. Εφόσον το διάλυμα έχει κρυώσει και δεν εξατμίζεται, προσθέτουμε την ποσότητα του βρωμιούχου αιθιδίου που απαιτείται (τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml) με προσοχή και φορώντας γάντια υποχρεωτικά).
7. Τοποθετούμε τους δίσκους χύτευσης με τρόπο τέτοιο ώστε οι λαστιχένιες άκρες τους να σφραγίζουν με τα τοιχώματα του κουτιού της γέλης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
8. Τοποθετούμε το χτενάκι στην ειδική εγκοπή.

9. Αδειάζουμε μέρος του διαλύματος (περίπου 50ml) στους δίσκους χύτευσης.
10. Αφήνουμε τη γέλη αγαρόζης να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος περίπου για 20 λεπτά.
11. Γεμίζουμε την κωνική φιάλη με νερό βρύσης ώστε να αραιωθεί το εναπομείναν διάλυμα.
12. Αδειάζουμε το περιεχόμενο της σε κάδο απορριμμάτων ώστε να αποφύγουμε την στερεοποίηση της γέλης στις σωληνώσεις του δικτύου ύδρευσης αλλά και την επαφή του προσωπικού του εργαστηρίου με το βρωμιούχο αιθίδιο.
13. Μετά τη στερεοποίηση της γέλης αγαρόζης, αδειάζουμε τα υπόλοιπα 400ml του διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

## 2) Φόρτωση των προϊόντων της PCR στη γέλη αγαρόζης

1. Τοποθετούμε 1μl dye για κάθε προϊόν PCR και 5μl για ladder σε αποστειρωμένη ταινία (parafilm).
2. Αναμειγνύουμε τα 5μl dye με τα 5μl ladder με πιπέττα με αποστειρωμένο ρύγχος με φίλτρο.
3. Ρυθμίζουμε την πιπέττα στα 10μl και φορτώνουμε το ladder στο πρώτο πηγαδάκι της στερεοποιημένης γέλης αγαρόζης.
4. Αναμειγνύουμε κάθε φορά το 1μl dye με 9μl προϊόν PCR με πιπέττα με αποστειρωμένο ρύγχος με φίλτρο και αφού ρυθμίσουμε την πιπέττα στα 10μl, φορτώνουμε το κάθε προϊόν PCR σε διαφορετικό πηγαδάκι, αλλάζοντας το ρύγχος της πιπέττας από το ένα προϊόν PCR στο άλλο.
5. Για την αποφυγή δημιουργίας οπής στη στερεοποιημένη γέλη αγαρόζης με το ρύγχος της πιπέττας, δεν ακουμπάμε με το ρύγχος της πιπέττας τη γέλη στον πυθμένα του κάθε πηγαδιού αλλά ούτε και στα τοιχώματα του. Τοποθετούμε το ρύγχος στο χείλος του πηγαδιού και αδειάζουμε το περιεχόμενό του.

## 3) Ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης

1. Θέτουμε σε λειτουργία τη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Ρυθμίζουμε την τάση στα κατάλληλα Volts (π.χ. 200).
3. Αφήνουμε τη γέλη αγαρόζης να τρέξει για τον απαιτούμενο χρόνο (π.χ. 20 λεπτά), παρακολουθώντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα την πορεία της διαδικασίας.
4. Απενεργοποιούμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
5. Αφαιρούμε τη στερεοποιημένη γέλη αγαρόζης από τους δίσκους χύτευσης.
6. Προχωρούμε στη διαδικασία φωτογράφισης της γέλης αγαρόζης.

## 4) Φωτογράφιση της γέλης αγαρόζης μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης



1. Τοποθετούμε το πήκτωμα αγαρόζης στη συσκευή υπεριώδους διαφανοσκόπησης.
2. Κλείνουμε το γυάλινο καπάκι.
3. Κλείνουμε τα φώτα στο χώρο.
4. Ενεργοποιούμε την υπεριώδη ακτινοβολία στη συσκευή .
5. Ενεργοποιούμε τη φωτογραφική μηχανή.
6. Ενεργοποιούμε τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.
7. Ανοίγουμε το πρόγραμμα φωτογράφισης που είναι αποθηκευμένο στον υπολογιστή.
8. Επεξεργαζόμαστε την φωτογραφία.
9. Αποθηκεύουμε την φωτογραφία στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

#### 2.5.4. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα θετικά προϊόντα PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το PureLink PCR Kit καθαρισμού (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και η αλληλουχία τους αναγνώστηκε αμφίδρομα χρησιμοποιώντας το φθορίζον Σύστημα προσδιορισμού αλληλουχίας Cycle sequencing του BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), ακολουθούμενο από διαχωρισμό θραυσμάτων με έναν 3.730xl αναλυτής DNA (Applied Biosystems).

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα συγκριτικά με αλληλουχίες στελεχών των Νοροϊών, οι οποίες βρίσκονται καταχωρημένες στην παγκόσμια γονιδιακή τράπεζα δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Ο αλγόριθμος BLAST, αναζητά κατατεθειμένες αλληλουχίες ή τμήματα αυτών, στη GenBank, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την υπό μελέτη αλληλουχία. Η ποιότητα κάθε στοίχισης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές στοιχίσεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης (HSPs – high scoring segment pairs) καταγράφονται σε μορφή πίνακα. Ο πίνακας αυτός, παρουσιάζει τελικά τις πιο «συγγενικές» αλληλουχίες, κατά σειρά μειωμένης βαθμολογίας συσχέτισης κατά συνέπεια και ομολογίας.

Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη με τη χρήση του προγράμματος MEGA 3.1. Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έλαβε χώρα με τη μέθοδο Neighbor Joining (NJ) χρησιμοποιώντας την παράμετρο Kimura 2. Η μέθοδος Neighbor Joining είναι μία μέθοδος πολλαπλής στοίχισης αλληλουχιών με ταυτόχρονη μετατροπή της διαφοροποίησης αυτών, όπως για παράδειγμα του ποσοστού των καταλοίπων που διαφέρουν μεταξύ των δύο αλληλουχιών, σε εξελικτική απόσταση. Η μέθοδος λειτουργεί ως εξής: Αρχικά, στοιχίζονται οι δύο πιο συγγενικές αλληλουχίες, ενώ εν συνεχεία, για την προσθήκη των επόμενων αλληλουχιών, οι δύο πρώτες αλληλουχίες αντιμετωπίζονται ως μία. Μετά τη στοίχιση της επόμενης συγγενικής αλληλουχίας, οι τρεις πρώτες αλληλουχίες αντιμετωπίζονται ως μία και ούτω καθεξής.

## 2.6. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΩΝ ΡΟΤΑΪΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΠΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

Η απομόνωση των Ροταϊών από κλινικά δείγματα κοπράνων μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας συνεχείς κυτταρικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων. Η απομάκρυνση των βακτηρίων μπορεί να επιτευχθεί με φυγοκέντρηση, επεξεργασία με αντιβιοτικά και διήθηση. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η απομόνωση του Ροταϊού χωρίς να ανευρίσκεται η αιτία. Σε κάποιες περιπτώσεις χρειάζονται αρκετές ανακαλλιέργειες ώστε να διαπιστωθεί η ανάπτυξη του ιού με τη βοήθεια κυτταρικών αλλοιώσεων. Επιπλέον, το δείγμα των κοπράνων πρέπει να αραιώνεται πριν τον ενοφθαλμισμό ώστε τυχόν τοξίνες/αναστολείς να μην επηρεάσουν τα κύτταρα.

### 2.6.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΨΥΞΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕΙΡΑΣ VERO(ATCC® CCL-81™) ΑΠΟ ΥΓΡΟ ΑΖΩΤΟ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΦΛΑΣΚΕΣ 25 CM<sup>2</sup>

#### Απαραίτητα υλικά

1. Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειών 25 cm<sup>2</sup>
2. Αποστειρωμένα σιφώνια 2ml, 5ml, 10ml, 25ml
3. Ανάστροφο Μικροσκόπιο
4. Θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειών DMEM w L-Glut., High glucose 4g/l
5. Εμβρυϊκός βόϊος ορός FBS
6. Επωαστικός κλίβανο 37 οC με παροχή CO<sub>2</sub>
7. Αιθανόλη 90%
8. Υδατόλουτρο
9. Αποστειρωμένα κωνικά σωληνάρια με πώμα 10 ή 15 ml
10. Θάλαμος BSL2

#### Εκτέλεση

- Αποστείρωση θαλάμου νηματικής ροής για τουλάχιστον 30' με χρήση UV
- Θέρμανση DMEM & FBS στους 37οC
- Αφαίρεση του κρυοφιαλιδίου με τα κύτταρα απο το άζωτο και μεταφορά στο υδατόλουτρο στους 37 οC για την απόψυξη των κυττάρων
- Μετά την απόψυξη του περιεχομένου, απολύμανση του κρυοφιαλιδίου εξωτερικά με αιθανόλη
- Μεταφορά του κρυοφιαλιδίου εντός του θαλάμου νηματικής ροής βιολογικής ασφάλειας II

- Αναρρόφηση του εναιωρήματος των κυττάρων με σιφόνι και μεταφορά σε κωνικό σωληνάριο με πώμα αποστειρωμένο.
- Φυγοκέντρηση του εναιωρήματος στις 1000 στροφές για 5 λεπτά
- Απόρριψη του υπερκειμένου
- Προσθήκη 7ml DMEM στο σωληνάριο, ομογενοποίηση και μεταφορά σε φλάσκα 25cm<sup>2</sup>
- Προσθήκη στη φλάσκα 700μl FBS
- Μεταφορά της φλασκας στον επωαστικό κλίβανο στους 37oC με 5% CO<sub>2</sub>
- Εκτίμηση την επομένη σε ανάστροφο μικροσκόπιο της ανάπτυξης των κυττάρων

## 2.6.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕΙΡΑΣ VERO(ATCC® CCL-81™) ΣΕ ΦΛΑΣΚΕΣ 25 CM<sup>2</sup>

### Απαραίτητα υλικά

1. Φιάλες κυτταροκαλλιεργειών 25 cm<sup>2</sup>
2. Αποστειρωμένα σιφώνια 2ml, 5ml, 10ml, 25ml
3. Ανάστροφο Μικροσκόπιο
4. Θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιεργειών DMEM w L-Glut., High glucose 4g/l
5. Εμβρυϊκός βόϊος ορός FBS
6. Επωαστικός κλίβανο 37 °C με παροχή CO<sub>2</sub>
7. Αιθανόλη 90%
8. Υδατόλουτρο
9. Διάλυμα Trypsin + EDTA
10. Διάλυμα PBS
11. Θάλαμος BSL2

Ανακαλλιέργεια σε δυο (2) φλάσκες

### Εκτέλεση τεχνικής

- Αποστειρώνουμε το θαλάμου νηματικής ροής βιολογικής ασφάλειας II για τουλάχιστον 30' με χρήση UV

- Προθερμαίνουμε τα διαλύματα Trypsin + EDTA, DMEM, FBS στους 37°C
- Απόψυξη ορού FBS
- Μακροσκοπικός και μικροσκοπικός έλεγχος της κυτταροκαλλιέργειας στο ανάστροφο μικροσκόπιο για βακτηριακή μόλυνση.
- Σε περίπτωση βακτηριακής μόλυνσης απόρριψη και καταστροφή της φιάλης
- Έλεγχος στο ανάστροφο μικροσκόπιο για την πληρότητα της φιάλης (κυτταρική μονοστοιβάδα)
- Μεταφορά της φιάλης εντός του θαλάμου νηματικής ροής
- Έντονη ανακίνηση μια φορά της φιάλης ώστε να αποκολληθούν τα νεκρά κύτταρα από τον πυθμένα
- Απόρριψη του υπερκειμένου της καλλιέργειας
- Πλύση της κυτταρικής μονοστοιβάδας με 5 ml PBS 2 φορές ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα FBS
- Προσθήκη 1.5 ml διαλύματος Trypsin + EDTA και ελαφρά ανακίνηση
- Πωματισμό της φιάλης και επώαση για 3'-5' στο κλίβανο στους 37°C για επιτάχυνση της αποκόλλησης των κυττάρων
- Μετά από 3 λεπτά έλεγχος της φιάλης για την αποκόλληση των κυττάρων. Σε περίπτωση μερικής αποκόλλησης επανατοποθέτηση στο κλίβανο και επανέλεγχο σε 2 λεπτά.
- Μετά την πλήρη αποκόλληση τοποθέτηση της φιάλης εντός του θαλάμου νηματικής ροής
- Φυγοκέντρηση των αποκολληθέντων κυττάρων σε 700 x g για 4' ώστε να απομακρύνουμε τη θρυψίνη
- Μεταφορά στο θάλαμο και απόρριψη του υπερκειμένου.
- Προσθήκη 7 ml DMEM, ομογενοποίηση και μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε φλάσκα.
- Προσθήκη επιπλέον 7 ml DMEM και 1,4 ml FBS.
- Ομογενοποίηση και μεταφορά του μισού όγκου σε νέα φλάσκα
- Κλείσιμο της φιάλης και καθαρισμός εξωτερικά με αιθανόλη σε ύπαρξη υπολειμμάτων MEM στην περιοχή του πώματος
- Τοποθέτηση της φιάλης στον επωαστικό κλίβανο στους 37 °C με 5% CO<sup>2</sup> παρουσία υγρασίας.

- Έλεγχος σε 24 ώρες σε ανάστροφο μικροσκόπιο της ανάπτυξης των κυττάρων

### 2.6.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ VERO(ATCC® CCL-81™) ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ

#### Απαραίτητα υλικά

- Φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών 25 cm<sup>2</sup>
- Αποστειρωμένα σιφώνια 2ml, 5ml, 10ml, 25ml
- Ανάστροφο Μικροσκόπιο
- Θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιιεργειών DMEM w/L-Glut., High glucose 4g/l
- Εμβρυϊκός βόϊος ορός FBS
- Επωαστικός κλίβανο 37 οC με παροχή CO<sub>2</sub>
- Αιθανόλη 90%
- Υδατόλουτρο
- Αποστειρωμένα κωνικά σωληνάρια με πώμα 10 ή 15 ml
- Διάλυμα Trypsin + EDTA 10mg/ml
- Θάλαμος BSL2

#### Εκτέλεση

- Αποστείρωση θαλάμου νηματικής ροής για τουλάχιστον 30' με χρήση UV
- Θέρμανση DMEM & FBS στους 37°C
- Μεταφέρουμε 3 ml διαρροϊκών κοπράνων σε αποστειρωμένο κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα με πώμα και φυγοκεντρούμε σε 2.000 x g για 10 λεπτά στους 4°C ώστε να καθιζάνουν βακτήρια και στερεά.
- Λαμβάνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και διηθούμε με φίλτρο 200nm για την κατακράτηση βακτηρίων.
- Λαμβάνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και διηθούμε με φίλτρο 200nm για την κατακράτηση βακτηρίων.
- Σε σωληνάριο 1,5ml ετοιμάζουμε 1 ml διαλύματος κοπράνων 15% (w/v) χρησιμοποιώντας ως αραιωτικό DMEM χωρίς FBS.
- Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από την φλάσκα με τα κύτταρα τα οποία έχουν καλύψει περίπου το 85% της διαθέσιμης επιφάνειας.

- Ενεργοποιούμε τον ιό προσθέτοντας θρυψίνη με τελική συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα να είναι 10μg/ml
- Αναδεύουμε και επωάζουμε σε υδατόλουτρο στους 37οC για 60'.
- Μετά την ενεργοποίηση του ιού κάνουμε αραιώση στο δείγμα 1:5 με DMEM ώστε η τελική συγκέντρωση της θρυψίνης να μην υπερβαίνει τα 2μg/ml.
- Ξεπλένουμε την κυτταρική μονοστοιβάδα 2-3 φορές με 5 ml DMEM χωρίς FBS προθερμασμένου στους 37οC. (Το FBS αναστέλλει την ενεργοποίηση των Ρόταϊων για αυτό και δεν πρέπει να υπάρχει στο υλικό καλλιέργειας)
- Ενοφθαλμίζουμε στη φλάσκα το κλινικό δείγμα και επωάζουμε για 60'σε θερμαινόμενο αναδευτήρα (πλάκα ανάδευσης) στους 37οC για να προσκολληθούν οι ιοί στα κύτταρα.
- Μετά την επώαση απορρίπτουμε το υπερκείμενο της κυτταροκαλλιέργειας και ξεπλένουμε με 4 ml DMEM χωρίς FBS
- Προσθέτουμε τέλος 7 ml DMEM χωρίς FBS με συγκέντρωση θρυψίνης 0,5μg/ml και επωάζουμε στους σε κλίβανο στους 37οC με 5% CO2 παρουσία υγρασίας έως 7 ημέρες ή μέχρι την εμφάνιση κυτταρικών αλλοιώσεων. Οι κυτταρικές αλλοιώσεις διαπιστώνονται με την εμφάνιση διόγκωσης των κυττάρων, κενотоπιών και εν τέλει νέκρωσης και αποκόλλησης.
- Μετά την εμφάνιση των κυτταρικών αλλοιώσεων μεταφέρουμε καταψύχουμε τη φλάσκα (κατά προτίμηση -80). Επαναλαμβάνουμε τον κύκλο ψύξης απόψυξης 3 φορές ώστε να διαρραγούν όλα τα κύτταρα και να εξέλθουν οι ιοί.
- Απομακρύνουμε τα υπολείμματα των κυττάρων με φυγοκέντρηση σε 300 x g στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -80°C ή για μακροχρόνια συντήρηση σε υγρό άζωτο.
- Εάν χρειάζεται περαιτέρω αύξηση του ιικού φορτίου αραιώνουμε το υπερκείμενο που συλλέξαμε παραπάνω 1:2 με DMEM 0,5% θρυψίνη και ενοφθαλμίζουμε σε νέα κυτταροκαλλιέργεια

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

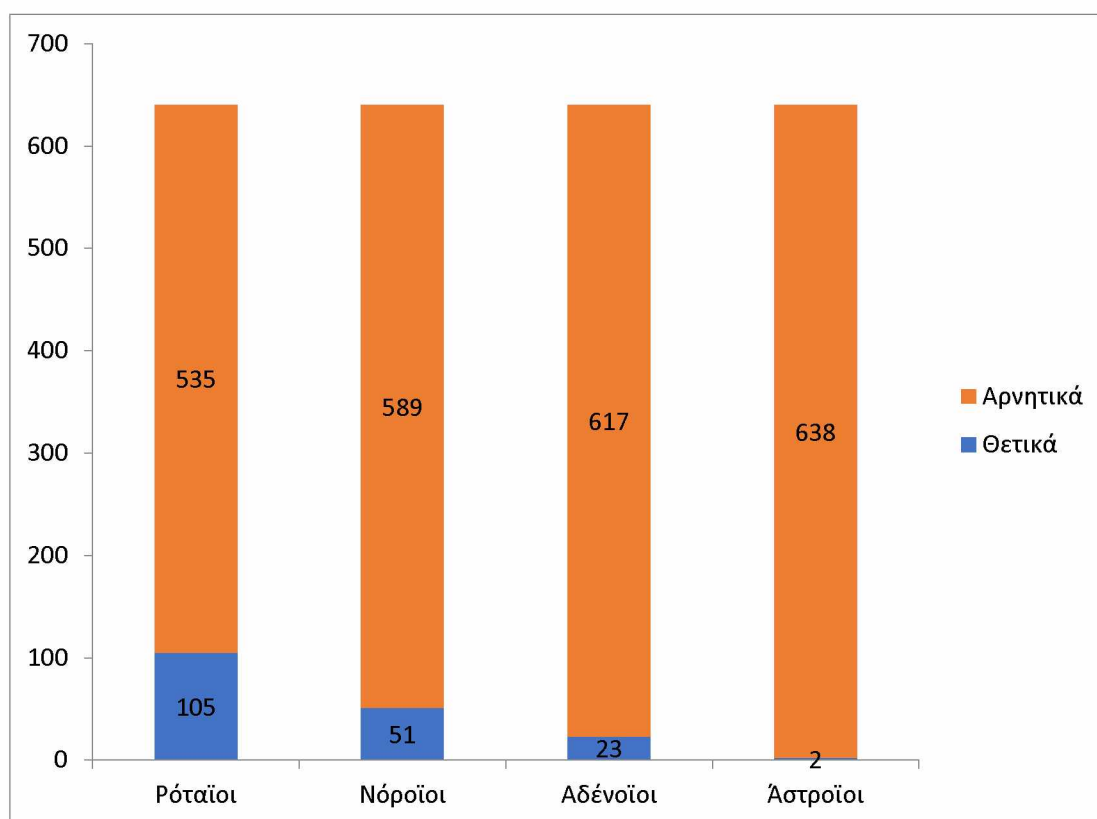
Για την διεξαγωγή της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 640 δείγματα διαρροϊκών κοπράνων τα οποία είχαν συλλεχθεί από νοσηλευόμενους ασθενείς στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, κατά τη χρονική περίοδο 2008-2013 και αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-80 °C). Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Τα δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν ήταν αρνητικά για την παρουσία *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp.

#### 3.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

##### 3.1.1. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013

Συλλέχθηκαν συνολικά 640 δείγματα διαρροϊκών κοπράνων. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ανιχνεύθηκαν και οι 4 ιοί που αναζητούνταν. Πιο συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν 105 δείγματα θετικά σε Ρόταϊους, 51 δείγματα θετικά σε Νόροϊους, 23 θετικά σε Αδένοϊους και 2 θετικά δείγματα σε Άστροϊους. Στα ανωτέρω θετικά δείγματα υπάρχουν 3 σύγχρονες μολύνσεις Αδένοϊου με Νόροϊο και 4 σύγχρονες μολύνσεις απο Ρόταϊο και Αδένοϊο.

**Γράφημα 5:** Συνολικά εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, για τη περίοδο 2008-2013.



3.1.1.1. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΑΝΑ ΦΥΛΟ ΑΣΘΕΝΗ, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

Από τα 640 συλλεχθέντα δείγματα, τα 315 προέρχονταν από άνδρες και τα 325 από γυναίκες. Ανιχνεύθηκαν σε δείγματα ανδρών 48 Ρόταϊοι, 28 Νόροϊοι, 8 Αδένοϊοι και 1 Άστροϊος ενώ σε δείγματα γυναικών 57 Ρόταϊοι, 23 Νόροϊοι, 5 Αδένοϊοι και 1 Άστροϊος. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανδρών και γυναικών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test,  $p=0.46, 0.47, 0.20, 1$  για Ρόταϊους, Νόροϊους, Αδένοϊους, Άστροϊους αντίστοιχα). Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

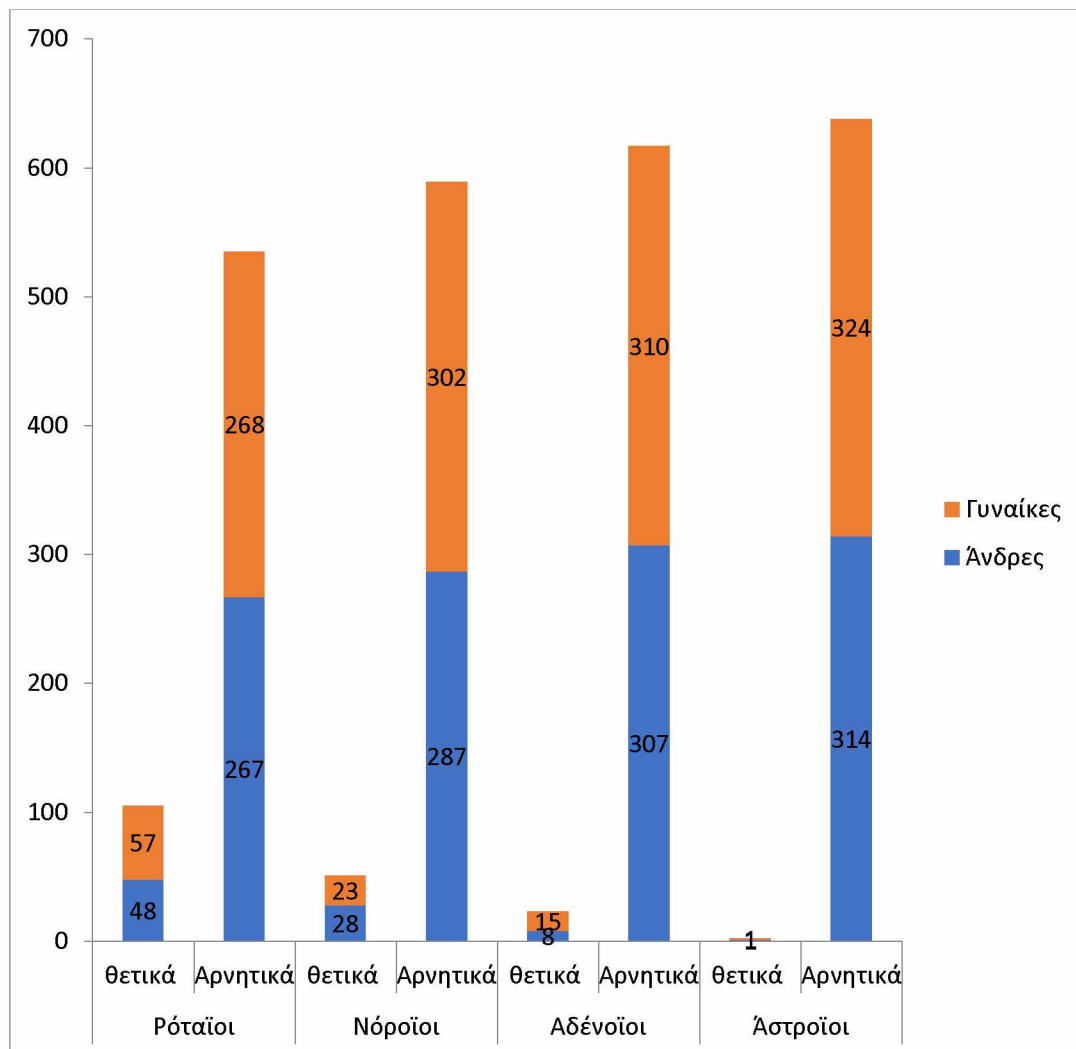
**Πίνακας 6:** Συγκεντρωτικά εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο, για την περίοδο 2008-2013. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

	Ρόταϊοι				Νόροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	315	48/267	15.24	11.69 – 19.63	315	28/287	8.89	6.22 – 12.55
Γυναίκες	325	57/268	17.54	13.79 – 22.05	325	23/302	7.08	4.76 – 10.40
Σύνολο	640	105/535	16.41	13.74 – 19.48	640	51/589	7.97	6.11 – 10.33

	Αδένοϊοι				Άστροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	315	8/307	2.54	1.29 – 4.93	315	1/314	0.32	0,06 – 1.78
Γυναίκες	325	15/310	4.62	2.82 – 7.48	325	1/324	0.31	0.06 – 1.73
Σύνολο	640	23/617	3.59	2.40 – 5.33	640	2/638	0,31	0.08 – 1.13



**Γράφημα 6:** Συνολικά εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο του ασθενή, για τη περίοδο 2008-2013.



3.1.1.2. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΑΝΑ ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΑΣΘΕΝΗ, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

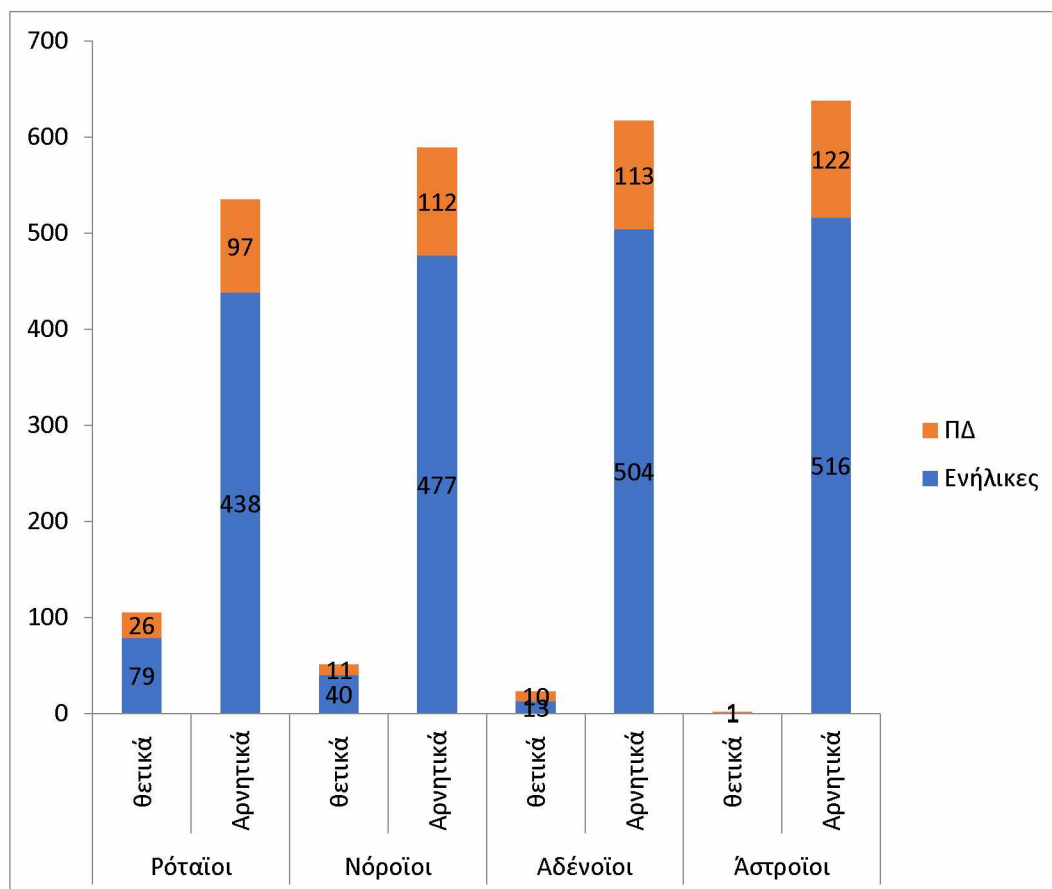
Από τα 640 συλλεχθέντα δείγματα, τα 517 προέρχονταν από ενήλικες και τα 123 από γυναίκες. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ταυτοποιήθηκαν και οι 4 ιοί που αναζητούνταν. Πιο συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν 79 Ρόταϊοι, 40 Νόροϊοι 13 Αδένοϊοι και 1 Άστροϊος σε δείγματα ενηλίκων και 26 Ρόταϊοι, 11 Νόροϊοι, 10 Αδένοϊοι και 1 Άστροϊος σε δείγματα παιδιών. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ενηλίκων και των παιδιών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test,  $p=0.14$ , 0.71, 0.35 για Ρόταϊους, Νόροϊους, και Άστροϊους αντίστοιχα) εκτός από τους Αδενοϊούς όπου τα θετικά είναι περισσότερα στα παιδιά ( $p=0.006$ ). Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

**Πίνακας 7:** Συγκεντρωτικά εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, ανά ηλικιακή κατηγορία, για την περίοδο 2008-2013. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

	Ρόταϊοι				Νόροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Ενήλικες	517	79/438	15.28	12.44 – 18.64	517	40/477	7.74	5.74 – 10.37
ΠΔ	123	26/97	21.14	14.85 – 29.17	123	11/112	8.94	5.06 – 15.30
<b>Σύνολο</b>	<b>640</b>	<b>105/535</b>	<b>16.41</b>	<b>13.74 – 19.48</b>	<b>640</b>	<b>51/589</b>	<b>7.97</b>	<b>6.11 – 10.33</b>

	Αδένοϊοι				Άστροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Ενήλικες	517	13/504	2.51	1.47 – 4.25	517	1/516	0.19	0.03 – 1.08
ΠΔ	123	10/113	8.13	4.48 – 14.32	123	1/122	0.81	0.14 – 4.46
<b>Σύνολο</b>	<b>640</b>	<b>23/617</b>	<b>3.59</b>	<b>2.40 – 5.33</b>	<b>640</b>	<b>2/638</b>	<b>0.31</b>	<b>0.08 – 1.13</b>

**Γράφημα 7 . Κλινικά δείγματα θετικά για τους 4 ιούς, συνολικά και για τις 2 ηλικιακές κατηγορίες με real time PCR συγκεντρωτικά για τα έτη 2008 - 2013**



### 3.1.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑ ΕΤΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ

#### 3.1.2.1. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ ΕΤΟΣ 2008, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

Κατά το έτος 2008 συλλέχθηκαν 137 δείγματα εκ των οποίων τα 69 προέρχονταν από άνδρες και τα 65 από γυναίκες. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ταυτοποιήθηκαν οι 3 από τους 4 ιούς που αναζητούνταν. Πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν 20 Ρόταϊοι, 9 Νόροϊοι και 3 Αδένοϊοι ενώ δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα για Άστροϊο. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανδρών και γυναικών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test  $p=0.63, 0.50, 0.12, 1$  για Ρόταϊους, Νόροϊους, Αδενοϊους και Άστροϊους αντίστοιχα) . Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

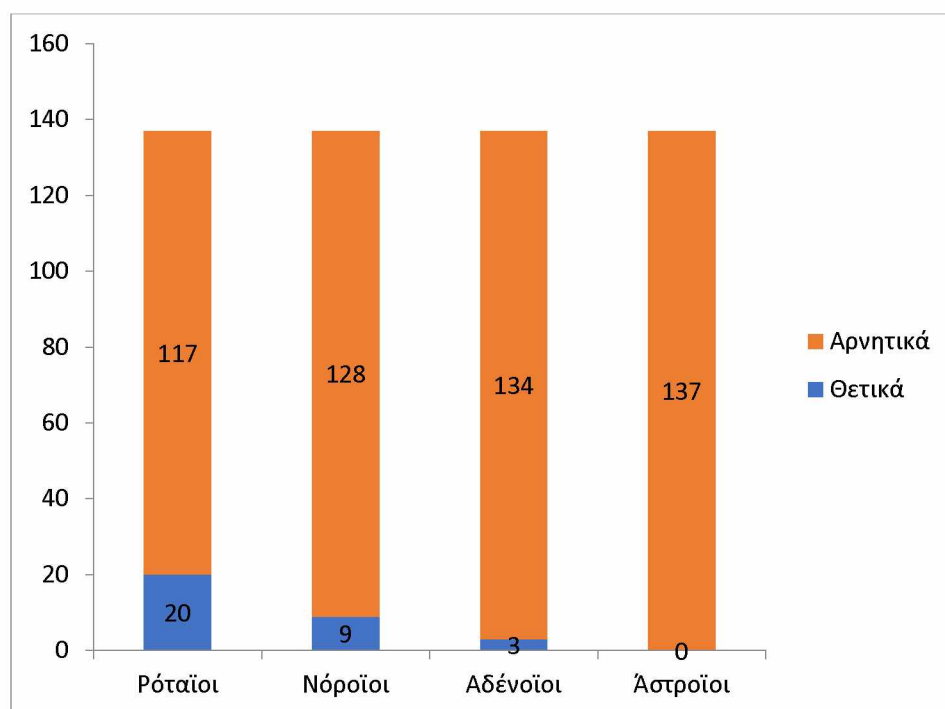
**Πίνακας 8:** Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο, για το έτος 2008. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

Σημ: Ανευρέθηκε μία ταυτόχρονη μόλυνση από Αδένοϊο και Νόροϊο σε παιδιατρικό δείγμα

	Ρόταϊοι				Νόροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	69	9/60	13.04	7.01 - 22.96	69	6/63	8.70	4.05 – 18.61
Γυναίκες	68	11/57	16.18	9.28 - 26.69	68	3/65	4.11	1.51 – 12.18
Σύνολο	137	20/117	14.60	9.65 - 21.48	137	9/128	6.57	3.49 – 12.01

	Αδένοϊοι				Άστροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	69	0/69	0.00	0.00 – 5.27	69	0/69	0.00	0.00 – 5.27
Γυναίκες	68	3/65	4.11	1.51 – 12.18	68	0/65	0.00	0.00 – 5.35
Σύνολο	137	3/134	2.19	0.75 – 6.24	137	0/137	0.00	0.00 – 2.73

**Γράφημα 8:** Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, για το έτος 2008.



3.1.2.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ ΕΤΟΣ 2009, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

Κατά το έτος 2009 συλλέχθηκαν 114 δείγματα εκ των οποίων τα 62 προέρχονταν από άνδρες και τα 52 από γυναίκες. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ταυτοποιήθηκαν και οι 4 ιοί που αναζητούνταν. Πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν 18 Ρόταϊοι, 11 Νόροϊοι και 5 Αδένοϊοι και 1 θετικό δείγμα για Άστροϊο. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανδρών και γυναικών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test  $p=0.61, 0.34, 0.37, 1$  Ρόταϊους, Νόροϊους, Αδένοϊους Άστροϊους αντίστοιχα). Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

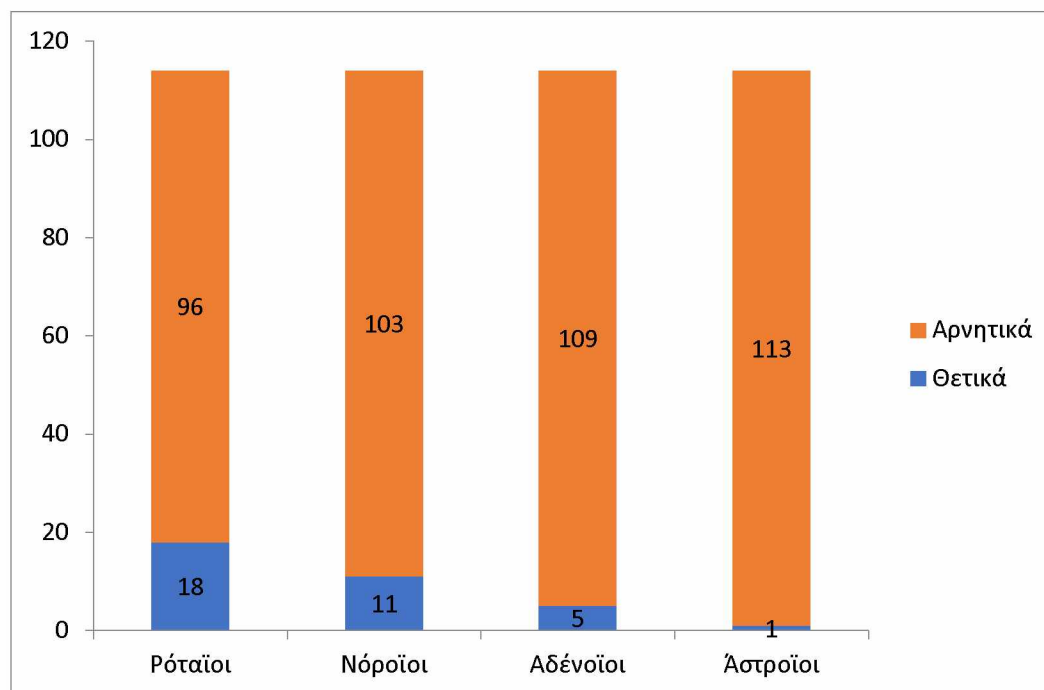
**Πίνακας 9:** Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο, για το έτος 2009. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

Σημ: Ανευρέθηκαν 4 ταυτόχρονες μολύνσεις: Ρόταϊου και Αδένοϊου σε δείγμα ενήλικα, Αδένοϊου και Νόροϊου σε δείγμα ενήλικα, Αδένοϊου και Νόροϊου σε παιδιατρικό δείγμα.

	Ρόταϊοι				Νόροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	62	11/51	17.74	10.20 – 29.04	62	8/54	.8.90	6.68 – 23.45
Γυναίκες	52	7/45	13.46	6.68 – 25.27	52	3/49	5.77	1.98 – 15.64
Σύνολο	114	18/96	15.79	10.23 – 23.58	114	11/103	9.65	5.47 – 16.46

	Αδένοϊοι				Άστροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	62	4/58	6.45	2.54 – 15.45	62	1/61	1.61	0.28 – 8.58
Γυναίκες	52	1/51	1.92	0.34 – 10.12	52	0/52	0.00	0.00 – 6.88
Σύνολο	114	5/109	4.39	1.89 – 9.86	114	1/113	0.88	0.16 – 4.81

**Γράφημα 9:** Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, για το έτος 2009.



### 3.1.2.3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ ΕΤΟΣ 2010, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

Κατά το έτος 2010 συλλέχθηκαν 99 δείγματα εκ των οποίων τα 40 προέρχονταν από άνδρες και τα 59 από γυναίκες. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ταυτοποιήθηκαν και οι 4 ιοί που αναζητούνταν. Πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν 15 Ρόταϊοι, 12 Νόροϊοι και 4 Αδένοϊοι και 1 θετικό δείγμα για Άστροϊο. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανδρών και γυναικών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test  $p=0.59$ , 0.76, 1, 1 Ρόταϊους, Νόροϊους Αδένοϊους και Άστροϊους αντίστοιχα). Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

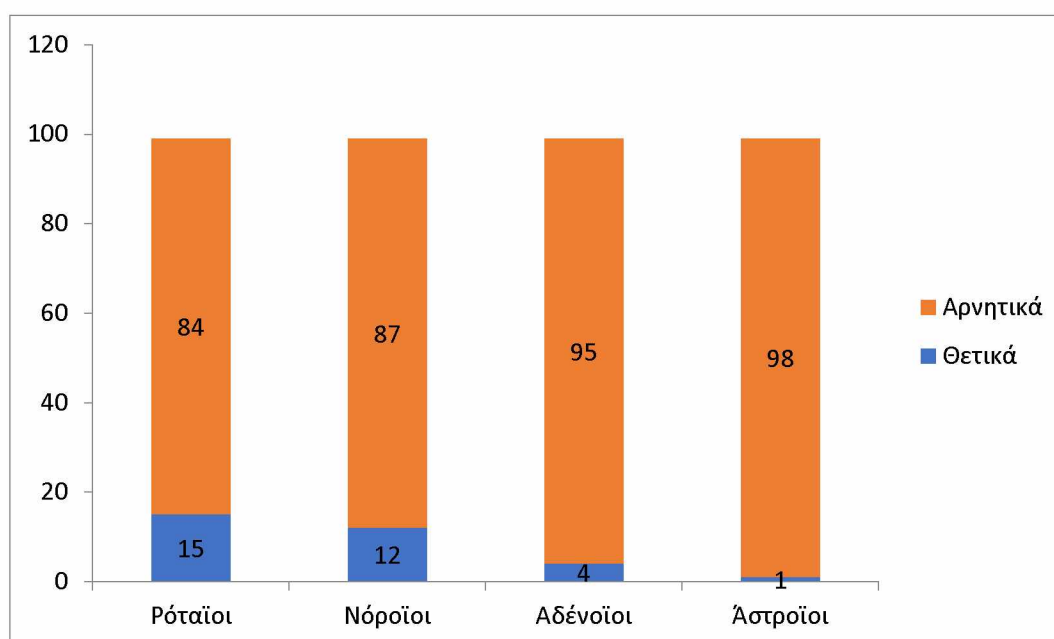
**Πίνακας 10:** Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο, για το έτος 2010. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

Σημ: Ανευρέθηκαν 2 σύγχρονες μολύνσεις Ρόταϊου και Αδένοϊου σε δείγματα ενήλικα.

	Ρόταϊοι				Νόροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	40	7/33	17.50	8.75 – 31.95	40	4/36	10.00	3.96 – 23.05
Γυναίκες	59	8/51	13.56	7.03 – 24.54	59	8/51	13.56	7.03 – 24.54
Σύνολο	99	15/84	15.15	9.40 – 23.50	99	12/87	12.12	7.07 – 20.00

	Αδένοϊοι				Άστροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	40	2/38	5.00	1.38 – 16.50	40	0/40	0.00	0.00 – 8.76
Γυναίκες	59	2/57	3.39	0.93 – 11.54	59	1/58	1.69	0.30 – 8.99
Σύνολο	99	4/95	4.04	1.58 – 9.93	99	1/98	1.01	0.18 – 5.50

**Γράφημα 10:** Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, για το έτος 2010.



3.1.2.4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ ΕΤΟΣ 2011, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

Κατά το έτος 2011 συλλέχθηκαν 109 δείγματα εκ των οποίων τα 51 προέρχονταν από άνδρες και τα 58 από γυναίκες. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ταυτοποιήθηκαν οι 3 από τους 4 ιούς που αναζητούνταν. Πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν 21 Ρόταϊοι, 5 Νόροϊοι και 4 Αδένοϊοι ενώ δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα για Άστροϊο. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανδρών και γυναικών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test  $p=1, 0.37, 0.62, 1$  για Ρόταϊους, Νόροϊους, Αδένοϊους και Άστροϊους αντίστοιχα). Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

**Πίνακας 11:** Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο, για το έτος 2011. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

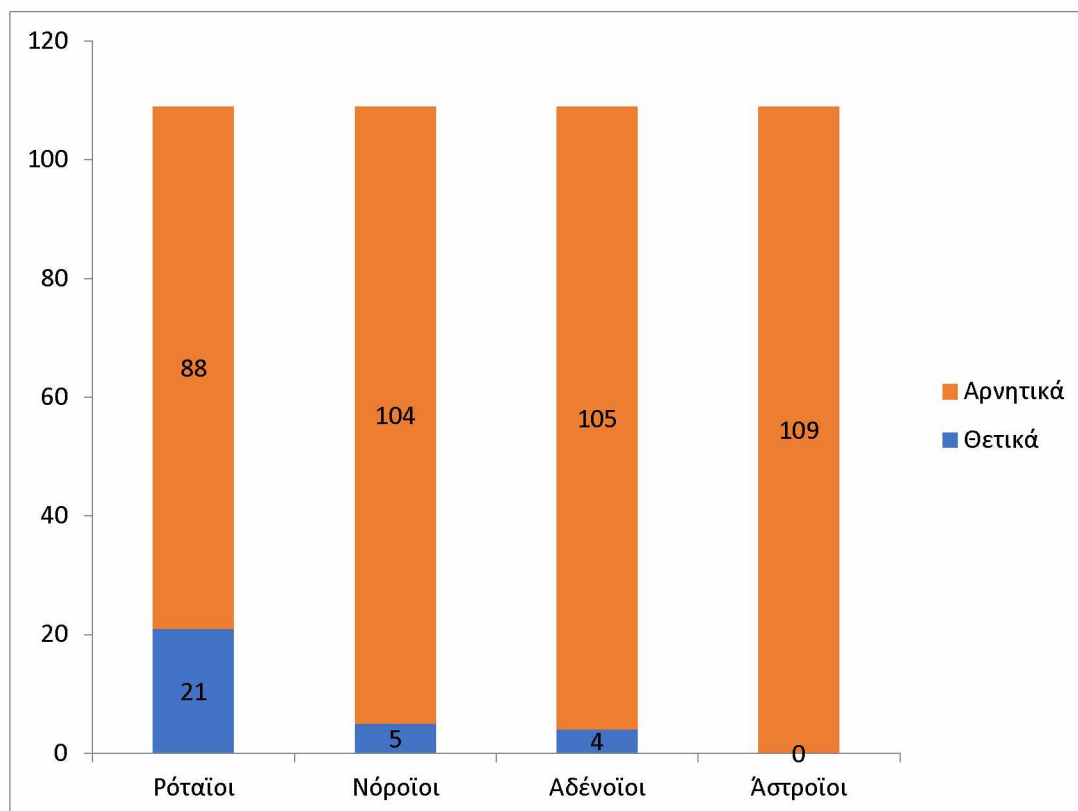
Σημ: Ανευρέθηκε 1 σύγχρονη μόλυνση Ρόταϊου και Αδένοϊου σε δείγμα ενήλικα.

	Ρόταϊοι				Νόροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	51	10/41	19.61	11.02 – 32.46	51	1/50	1.96	0.35 – 10.30
Γυναίκες	58	11/47	18.97	10.94 – 30.86	58	4/54	6.90	2.72 – 16.44
Σύνολο	109	21/88	19.27	12.96 – 27.67	109	5/104	4.59	1.98 – 10.29

	Αδένοϊοι				Άστροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	51	1/50	1.96	0.35 – 10.30	51	0/51	0.00	0.00 – 7.00
Γυναίκες	58	3/55	5.17	1.77 – 14.14	58	0/58	0.00	0.00 – 6.21
Σύνολο	109	4/105	3.81	1.49 – 9.39	109	0/109	0.00	0.00 – 3.40



**Γράφημα 11:** Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, για το έτος 2011.



### 3.1.2.5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ ΕΤΟΣ 2012, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

Κατά το έτος 2012 συλλέχθηκαν 94 δείγματα εκ των οποίων τα 45 προέρχονταν από άνδρες και τα 49 από γυναίκες. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ταυτοποιήθηκαν οι 3 από τους 4 ιούς που αναζητούνταν. Πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν 19 Ρόταϊοι, 8 Νόροϊοι και 3 Αδένοϊοι ενώ δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα για Άστροϊο. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανδρών και γυναικών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test  $p=0.13$ , 1, 0.61 και 1 για Ρόταϊους, Νόροϊους, Αδένοϊους και Άστροϊους αντίστοιχα). Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

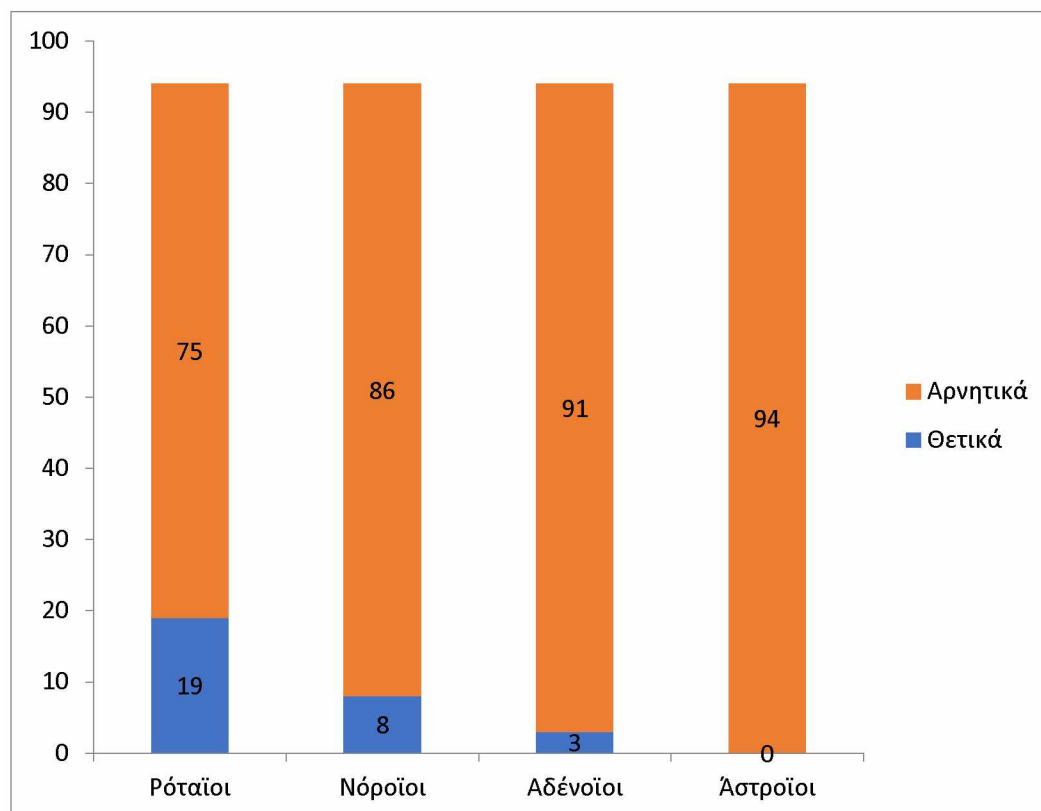
Πίνακας 12: Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο, για το έτος 2012. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

Σημ: Ανευρέθηκε 1 σύγχρονη μόλυνση Ρόταϊου και Αδένοϊου σε δείγμα ενήλικα.

	Ρόταϊοι				Νόροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	45	6/39	13.33	6.25 – 26.17	45	4/41	8.89	3.51 – 20.73
Γυναίκες	49	13/36	26.53	16.21 – 40.26	49	4/45	8.16	3.22 – 19.18
Σύνολο	94	19/75	20.21	13.34 – 29.42	94	8/86	8.51	4.38 – 15.90

	Αδένοϊοι				Άστροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	45	2/43	4.44	1.23 – 14.82	45	0/45	0.00	0.00 – 7.87
Γυναίκες	49	1/48	2.04	0.36 – 10.69	49	0/49	0.00	0.00 – 7.27
Σύνολο	94	3/91	3.19	1.09 – 8.97	94	0/94	0.00	0.00 – 3.93

**Γράφημα 12:** Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, για το έτος 2012.



### 3.1.2.6. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΟ ΕΤΟΣ 2013, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

Κατά το έτος 2013 συλλέχθηκαν 87 δείγματα εκ των οποίων τα 48 προέρχονταν από άνδρες και τα 39 από γυναίκες. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ταυτοποιήθηκαν οι 3 από τους 4 ιούς που αναζητούνταν. Πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν 12 Ρόταϊοι, 6 Νόροϊοι και 5 Αδένοϊοι ενώ δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα για Άστροϊο. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανδρών και γυναικών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test  $p=0.36$ ,  $0.22$ ,  $1$  Ρόταϊους Νόροϊους και Άστροϊους αντίστοιχα) εκτός των Αδενοϊών όπου τα θετικά ήταν περισσότερα στις γυναίκες ( $p=0.02$ ). Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

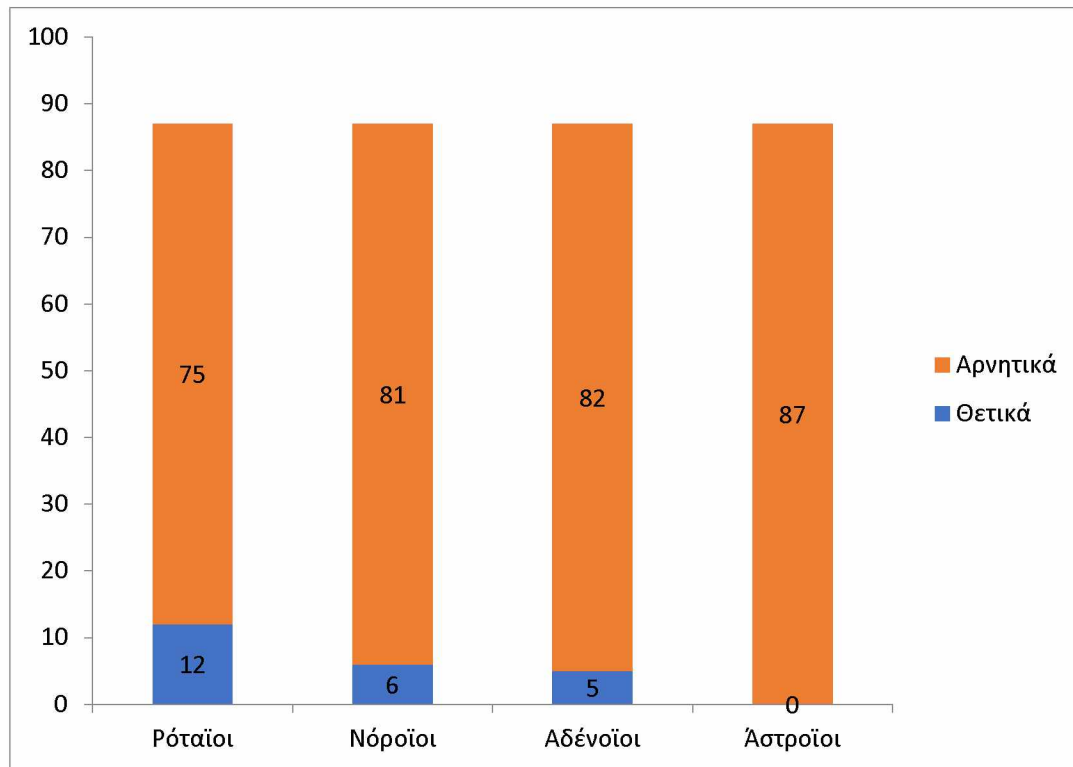
**Πίνακας 13:** Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο, για το έτος 2013. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

Σημ: Ανευρέθηκε 1 σύγχρονη μόλυνση Ρόταϊου και Αδένοϊου σε δείγμα ενήλικα.

	Ρόταϊοι				Νόροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	48	5/43	10.42	4.53 – 22.17	48	5/43	10.42	4.53 – 22.17
Γυναίκες	39	7/32	17.95	8.98 – 32.67	39	1/38	2.56	0.45 – 13.17
Σύνολο	87	12/75	13.79	8.07 – 22.58	87	6/81	6.90	3.20 – 14.24

	Αδένοϊοι				Άστροϊοι			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	48	0/48	0.00	0.00 – 7.41	48	0/48	0.00	0.00 – 7.41
Γυναίκες	39	5/34	12.82	5.60 – 26.71	39	0/39	0.00	0.00 – 8.97
Σύνολο	87	5/82	5.78	2.48 – 12.76	87	0/87	0.00	0.00 – 4.23

Γράφημα 13: Εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού των τεσσάρων υπό διερεύνηση ιών με τη χρήση real time PCR, για το έτος 2013.



## 3.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑ ΤΥΠΟ ΙΟΥ

### 3.2.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΡΟΤΑΪΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

Κατά το έτη 2008- 2013 συλλέχθηκαν 640 δείγματα από άνδρες και γυναίκες. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ταυτοποιήθηκαν 105 δείγματα θετικά σε Ρόταϊο. Πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν 20 θετικά δείγματα το έτος 2008, 18 θετικά δείγματα το έτος 2009, 15 θετικά δείγματα το έτος 2010, 21 θετικά δείγματα το έτος 2011, 19 θετικά δείγματα το έτος 2012, 12 θετικά δείγματα το έτος 2013. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανδρών και γυναικών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test,  $p=0.63, 0.61, 0.58, 1, 0.13, 0.36$  για κάθε έτος 2008-2013 αντίστοιχα). Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

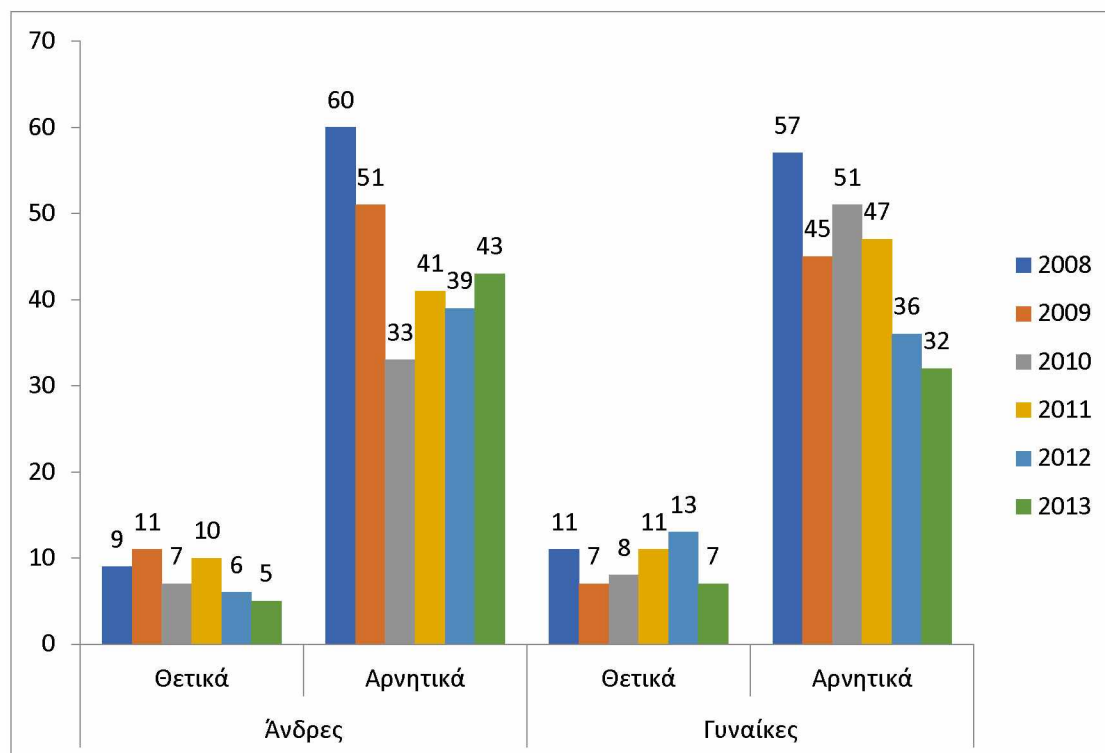
**Πίνακας 14:** Συγκεντρωτικά εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού Ρόταϊων με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο, για την περίοδο 2008-2013. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

	2008				2009			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	69	9/60	13.04	7.01 - 22.96	62	11/51	17.74	10.20 – 29.04
Γυναίκες	68	11/57	16.18	9.28 - 26.69	52	7/45	13.46	6.68 – 25.27
Σύνολο	137	20/117	14.60	9.65 - 21.48	114	18/96	15.79	10.23 – 23.58

	2010				2011			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	40	7/33	17.50	8.75 – 31.95	51	10/41	19.61	11.02 – 32.46
Γυναίκες	59	8/51	13.56	7.03 – 24.54	58	11/47	18.97	10.94 – 30.86
Σύνολο	99	15/84	15.15	9.40 – 23.50	109	21/88	19.27	12.96 – 27.67

	2012				2013			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	45	6/39	13.33	6.25 – 26.17	48	5/43	10.42	4.53 – 22.17
Γυναίκες	49	13/36	26.53	16.21 – 40.26	39	7/32	17.95	8.98 – 32.67
Σύνολο	94	19/75	20.21	13.34 – 29.42	87	12/75	13.79	8.07 – 22.58

**Γράφημα 14:** Κλινικά δείγματα θετικά και αρνητικά για Ροταϊό ανά φύλο με real time PCR συγκεντρωτικά για τα έτη 2008 - 2013



### 3.2.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΡΟΤΑΪΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

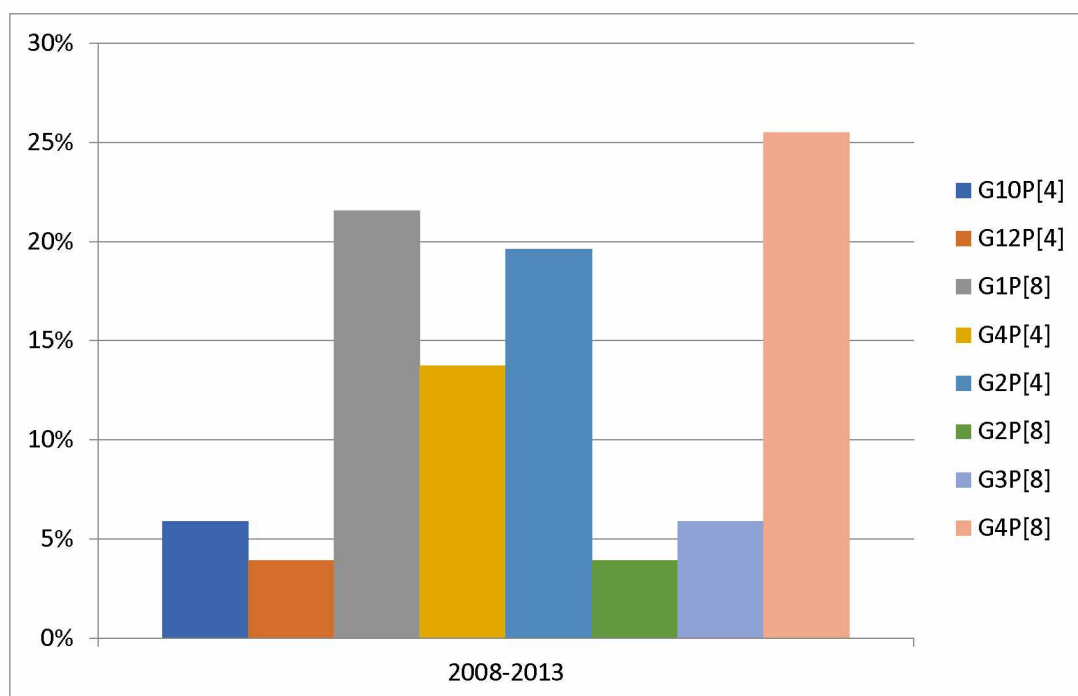
Ένας συνολικός αριθμός 51 δειγμάτων θετικών στη παρουσία Ροταϊών τυποποιήθηκαν ως προς τη VP4 και VP7 γενωμική περιοχή (G και P) μετά την εφαρμογή τεχνικής multiplex PCR όπως περιεγράφηκε στην ενότητα της Μεθοδολογίας.

Ο πιο συχνός τύπος που ανιχνεύθηκε ήταν ο G4P[8] (13 από τα 51 δείγματα) και ο αμέσως επόμενος ήταν ο G1P[8] (11 από τα 51). Οι τύποι G2P[4] και G4P[4] ακολούθησαν με 10 και 7 θετικά δείγματα αντίστοιχα, ενώ υπήρξαν μερικά θετικά δείγματα τύπων G3P[8], G10P[4], G2P[8] και G12P[4]. Στον Πίνακα Α13 αναγράφονται αναλυτικά οι τύποι και η συχνότητα αυτών.

Πίνακας 18: Τυποποίηση των Ρόταϊών με multiplex PCR συγκεντρωτικά για τη περίοδο 2008 - 2013

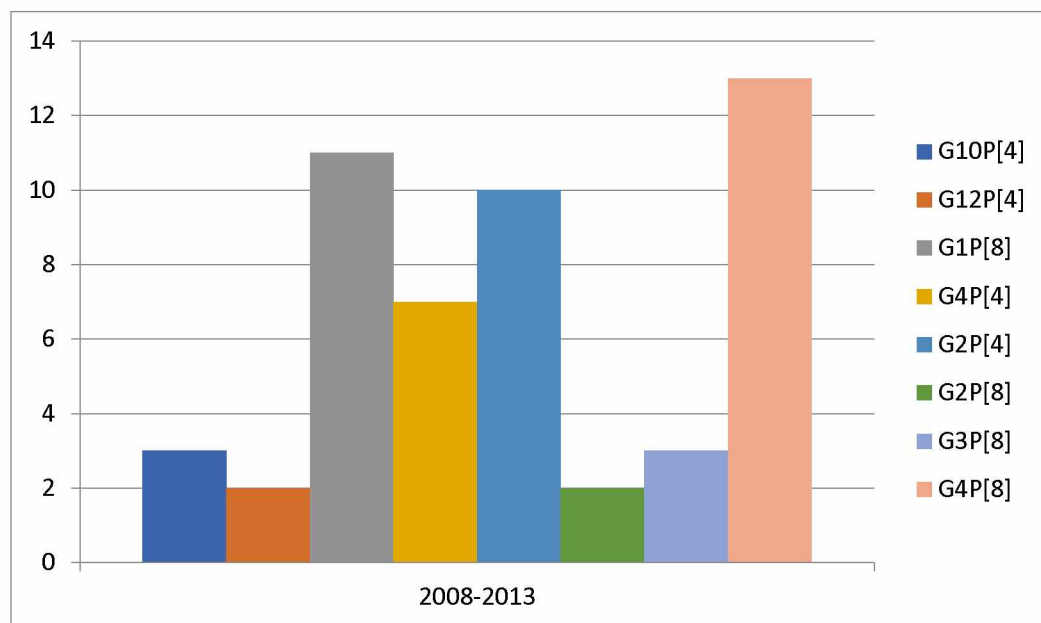
	G10P[4]	G12P[4]	G1P[8]	G4P[4]	G2P[4]	G2P[8]	G3P[8]	G4P[8]	Σύν
2008				1	2				3
2009	1	1	1	1	2			3	9
2010			1	1	1	1	1	3	8
2011	2		5	1	2		1	2	13
2012		1		2	2	1	1	3	10
2013			4	1	1			2	8
Σύνολο	3	2	11	7	10	2	3	13	51
	5,88%	3,92%	21,57%	13,73%	19,61%	3,92%	5,88%	25,49%	

Γράφημα 18: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα τυποποίησης των Ρόταϊών με multiplex PCR για τη περίοδο 2008-2013. Ποσοστά του κάθε τύπου επί του συνόλου των τυποποιημένων στελεχών.

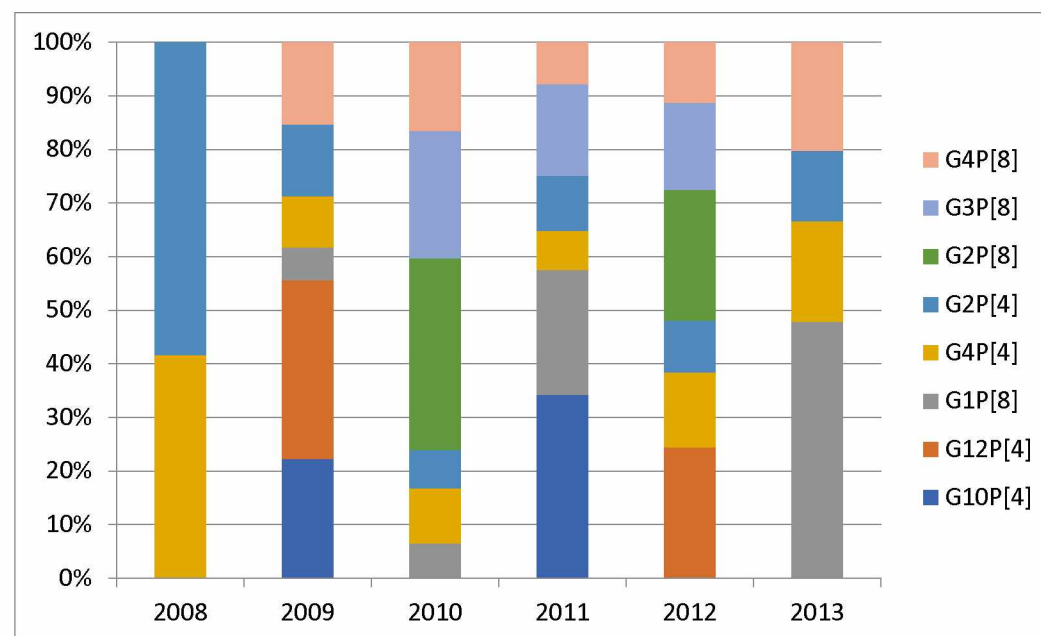




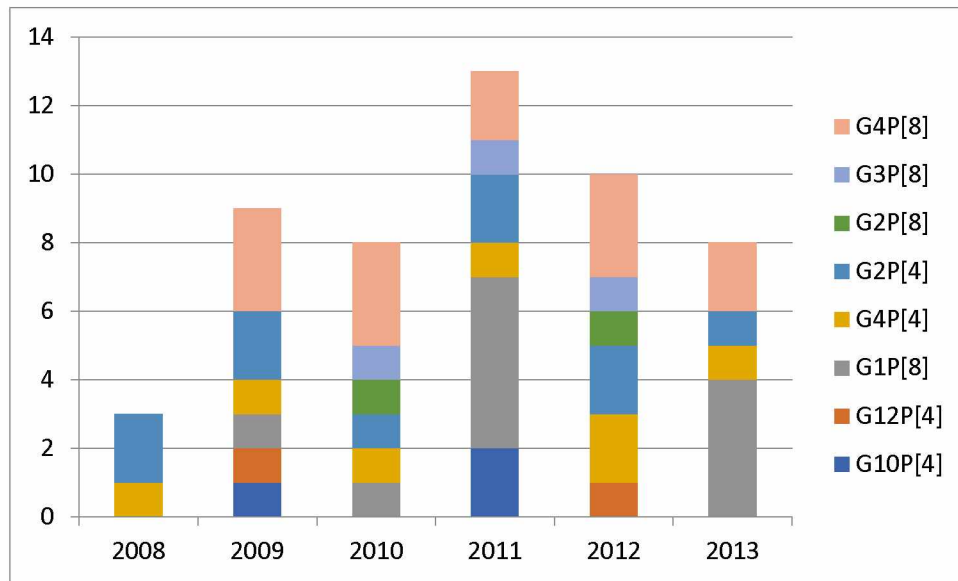
**Γράφημα 19:** Αριθμός του κάθε τύπου Ρόταϊου που τυποποιήθηκε με multiplex PCR για τη περίοδο 2008-2013.



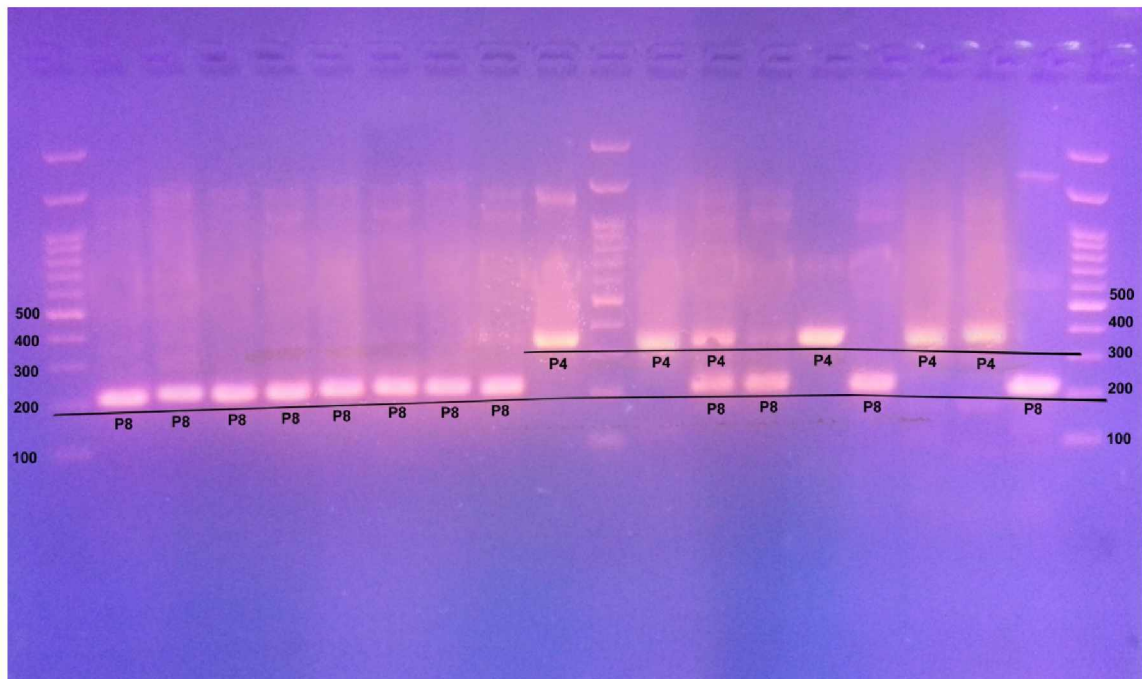
**Γράφημα 20:** Αποτελέσματα τυποποίησης των Ρόταϊων με multiplex PCR, ανά έτος συλλογής. Ποσοστά του κάθε τύπου επί του συνόλου των τυποποιημένων στελεχών.



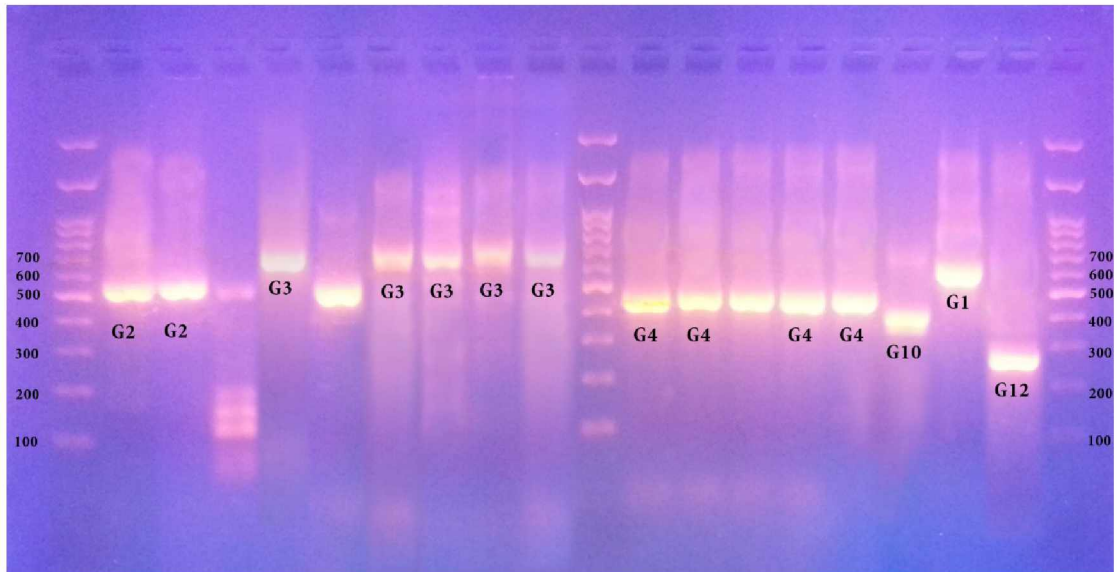
**Γράφημα 21:** Αριθμός του κάθε τύπου Ροταϊού που τυποποιήθηκε με multiplex PCR, ανά έτος συλλογής.



**Εικόνα 16.** Εικόνα γέλης ενδεικτική της τυποποίησης των Ροταϊών κατά P



Εικόνα 17. Εικόνα γέλης ενδεικτική της τυποποίησης των Ροταϊών κατά G



Εκτός των 51 πλήρως τυποποιημένων στελεχών των Ροταϊών υπήρξαν και 7 στελέχη στα οποία υπήρξε μερική τυποποίηση. Συγκεκριμένα 3 στελέχη τυποποιήθηκαν μερικώς ως G4, 1 στέλεχος ως G1, ένα στέλεχος ως P4 και ένα στέλεχος ως P8.

Πίνακας 19: Τυποποίηση Ροταϊών (ανά τύπο, μερικώς τυποποιημένα) 2008 - 2013

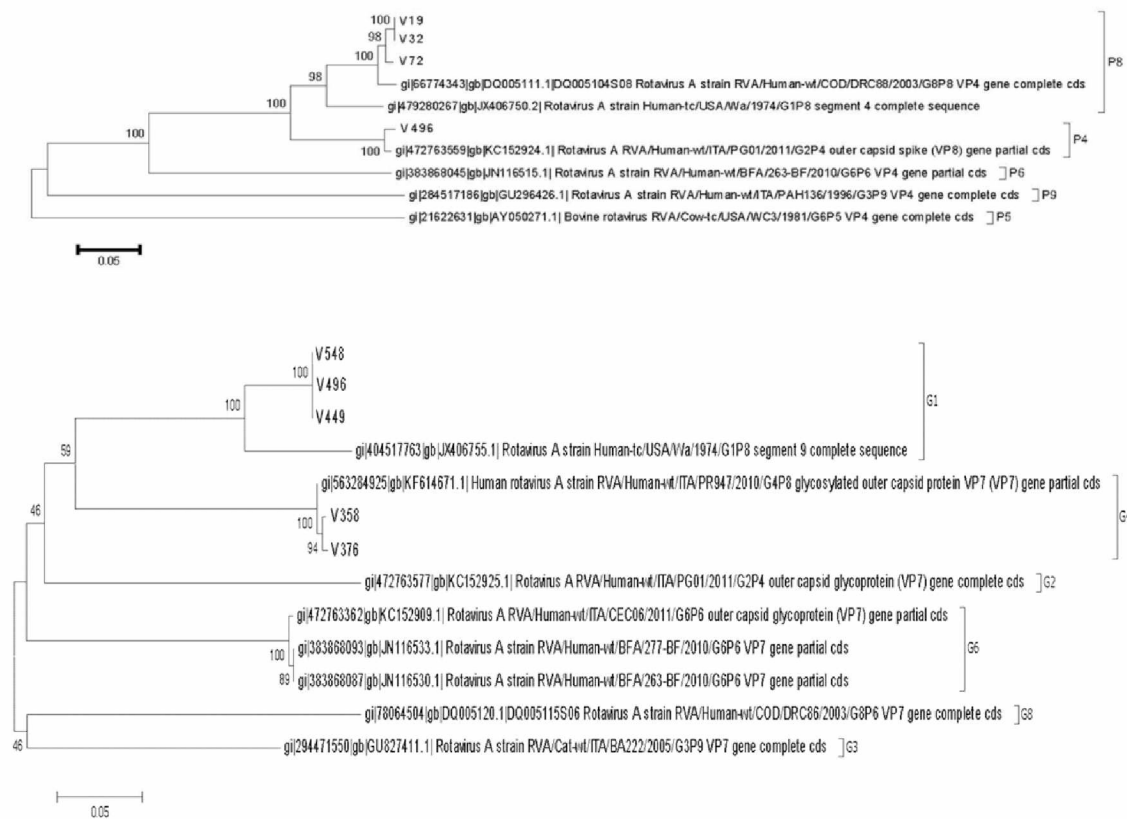
	G4	G1	P4	P8
Ροταϊοί	3	1	2	1
%				

### 3.2.3. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΡΟΤΑΙΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Σε έναν μικρό αριθμό θετικών δειγμάτων στην παρουσία Ροταϊών πραγματοποιήθηκε η ανάγνωση των γενετικών αλληλουχιών που προέκυψαν κατά την εφαρμογή των πρωτοκόλλων PCR με τη χρήση εκκινητών που στόχευσαν τις γενωμικές περιοχές VP4 και VP7, από τις οποίες προκύπτει η τυποποίηση G και P των Ροταϊών. Κατά την ανάγνωση των αλληλουχιών επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα τυποποίησης όπως αυτά προέκυψαν κατά την εφαρμογή των πρωτοκόλλων multiplex PCR. Το μεγάλο κόστος της τεχνικής sequencing καθιστά απαγορευτική την εφαρμογή της σε όλο το φάσμα των θετικών δειγμάτων, παρά σε έναν ενδεικτικό αριθμό προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της multiplex PCR.

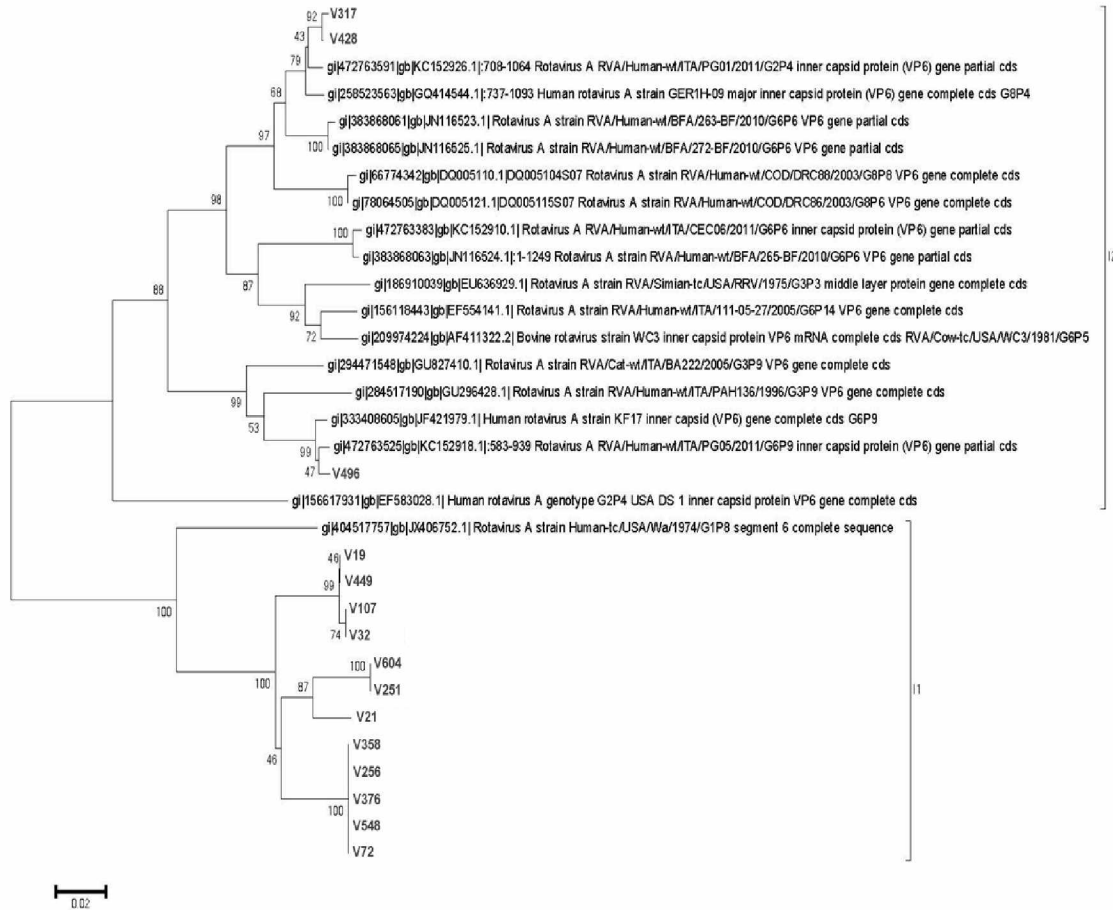
Ενδεικτικά παρουσιάζονται δύο φυλογενετικά δέντρα τα οποία δημιουργήθηκαν με τη χρήση όμοιων αλληλουχιών άλλων ροταϊών διαφόρων οροτύπων όπως ανακτήθηκαν από τη γενετική βάση δεδομένων GenBank (NCBI). Τα θετικά δείγματα αποτέλεσαν κοινούς κλάδους με ροταϊούς ιδίων τύπων οι οποίοι έχουν απομονωθεί τα προηγούμενα χρόνια από ανθρώπινα δείγματα, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της τυποποίησης μέσω multiplex PCR.

**Εικόνα 18:** Φυλογενετικά δέντρα για θετικά δείγματα Ροταϊών χρησιμοποιώντας τις γενωμικές περιοχές VP4 (P Typing) και VP7 (G Typing) με τη χρήση της μεθόδου Neighbour Joining (NJ) και έλεγχο της αξιοπιστίας με τη μέθοδο bootstrap με 100 επαναλήψεις.



Παράλληλα πραγματοποιήθηκε η ανάγνωση της γενετικής αλληλουχίας της γενωμικής περιοχής VP6 σε θετικά δείγματα και δημιουργήθηκε αντίστοιχο φυλογενετικό δέντρο χρησιμοποιώντας αλληλουχίες Ροταϊών τύπου I1 και I2 όπως ανακτήθηκαν από τη GenBank. Όπως παρατηρείται στο σχετικό γράφημα, η πλειονότητα των δειγμάτων που ελέγχθηκαν ανήκουν στον τύπο I1 και λίγα μόνο ανήκουν στον τύπο I2. Επιπρόσθετα όλα τα δείγματα ήταν φυλογενετικά συγγενή με στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί αποκλειστικά από ανθρώπους τα πρόσφατα έτη ανά τον κόσμο.

Εικόνα 19: Φυλογενετικό δέντρο για θετικά δείγματα Ροταϊών χρησιμοποιώντας τη γενωμική περιοχή VP6 με τη χρήση της μεθόδου Neighbour Joining (NJ) και έλεγχο της αξιοπιστίας με τη μέθοδο bootstrap με 100 επαναλήψεις.



3.2.4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΡΟΪΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

Κατά το έτη 2008- 2013 συλλέχθηκαν 640 δείγματα από άνδρες και γυναίκες. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ταυτοποιήθηκαν 51 δείγματα θετικά σε Νόροϊο. Πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν 9 θετικά δείγματα το έτος 2008, 11 θετικά δείγματα το έτος 2009, 12 θετικά δείγματα το έτος 2010, 5 θετικά δείγματα το έτος 2011, 8 θετικά δείγματα το έτος 2012, 6 θετικά δείγματα το έτος 2013. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανδρών και γυναικών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test  $p=0.49, 0.34, 0.76, 0.37, 1, 0.22$  για κάθε έτος 2008-2013 αντίστοιχα). Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

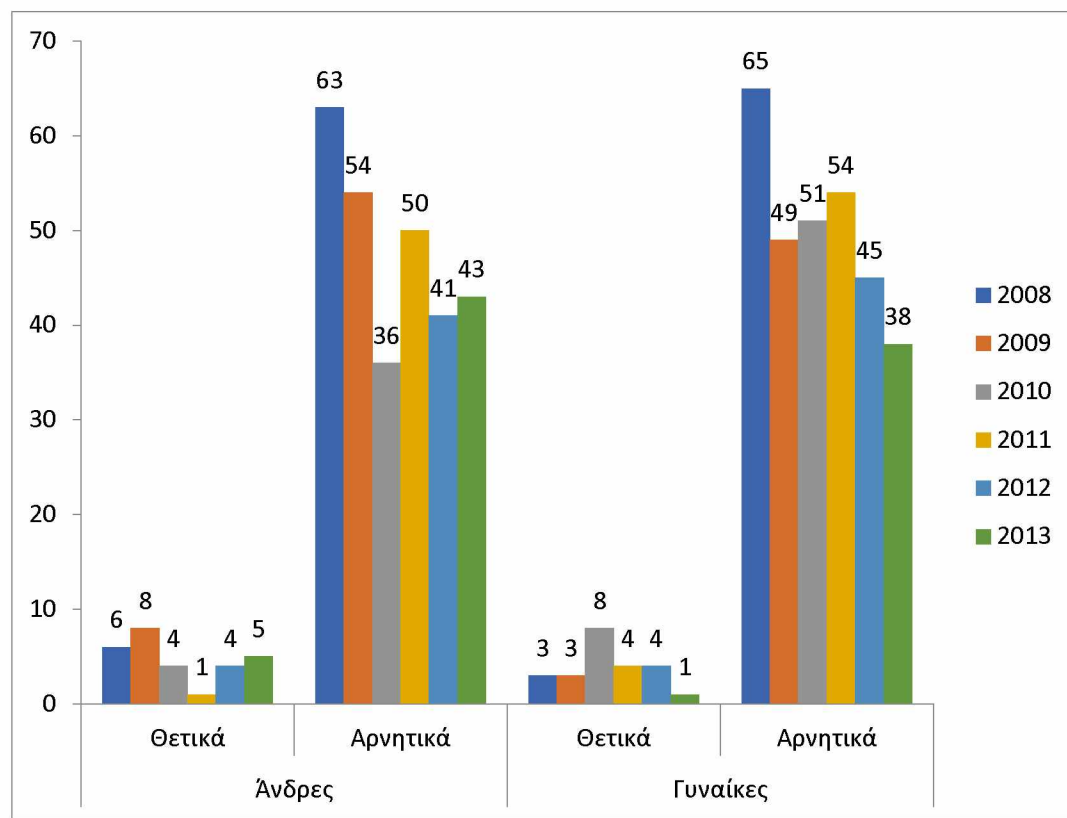
**Πίνακας 15:** Συγκεντρωτικά εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού Νόροϊων με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο, για την περίοδο 2008-2013. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

	2008				2009			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Ανδρες	69	6/63	8.70	4.05 – 18.61	62	8/54	.8.90	6.68 – 23.45
Γυναίκες	68	3/65	4.11	1.51 – 12.18	52	3/49	5.77	1.98 – 15.64
<b>Σύνολο</b>	<b>137</b>	<b>9/128</b>	<b>6.57</b>	<b>3.49 – 12.01</b>	<b>114</b>	<b>11/103</b>	<b>9.65</b>	<b>5.47 – 16.46</b>

	2010				2011			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Ανδρες	40	4/36	10.00	3.96 – 23.05	51	1/50	1.96	0.35 – 10.30
Γυναίκες	59	8/51	13.56	7.03 – 24.54	58	4/54	6.90	2.72 – 16.44
<b>Σύνολο</b>	<b>99</b>	<b>12/87</b>	<b>12.12</b>	<b>7.07 – 20.00</b>	<b>109</b>	<b>5/104</b>	<b>4.59</b>	<b>1.98 – 10.29</b>

	2012				2013			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Ανδρες	45	4/41	8.89	3.51 – 20.73	48	5/43	10.42	4.53 – 22.17
Γυναίκες	49	4/45	8.16	3.22 – 19.18	39	1/38	2.56	0.45 – 13.17
<b>Σύνολο</b>	<b>94</b>	<b>8/86</b>	<b>8.51</b>	<b>4.38 – 15.90</b>	<b>87</b>	<b>6/81</b>	<b>6.90</b>	<b>3.20 – 14.24</b>

**Γράφημα 15:** Κλινικά δείγματα θετικά και αρνητικά για Νόροϊο ανά φύλο με real time PCR συγκεντρωτικά για τα έτη 2008 - 2013



### 3.2.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΡΟΪΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Κατά την εκτέλεση της Real Time PCR, το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο επέτρεψε, πέραν της ανίχνευσης των θετικών, και τη τυποποίηση αυτών στους τύπους GI και GII.

Από τα 51 συνολικά θετικά δείγματα, τα 47 εξ' αυτών τυποποιήθηκαν ως GII και τα 4 εξ αυτών ως GI.

**Πίνακας 20:** Αποτελέσματα τυποποίησης Νόροϊων που ανιχνεύθηκαν με real time PCR σε δείγματα που συλλέχθηκαν τη περίοδο 2008 - 2013

	<b>GI</b>	<b>GI I</b>
<b>Νόροϊοι</b>	<b>4</b>	<b>47</b>
<b>%</b>	<b>7,8</b>	<b>92,2</b>

### 3.2.6. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Σε έναν μικρό αριθμό θετικών δειγμάτων στην παρουσία Νοροϊών με τη χρήση της Real Time PCR, πραγματοποιήθηκε η ανάγνωση των γενετικών αλληλουχιών που προέκυψαν κατά την εφαρμογή των πρωτοκόλλων cPCR με τη χρήση εκκινητών που στόχευαν γενωμική περιοχή του καψιδίου του ιού, όπως περιγράφηκε στη σχετική μεθοδολογία. Κατά την ανάγνωση των αλληλουχιών επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα τυποποίησης όπως αυτά προέκυψαν κατά την εφαρμογή των πρωτοκόλλων Real Time PCR. Το μεγάλο κόστος της τεχνικής sequencing καθιστά απαγορευτική την εφαρμογή της σε όλο το φάσμα των θετικών δειγμάτων, παρά σε έναν ενδεικτικό αριθμό προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR.

Ενδεικτικά παρουσιάζεται φυλογενετικό δέντρο το οποίο δημιουργήθηκε με τη χρήση αλληλουχιών άλλων Νοροϊών διαφόρων τύπων όπως ανακτήθηκαν από τη γενετική βάση δεδομένων GenBank (NCBI). Τα θετικά δείγματα αποτέλεσαν κοινούς κλάδους με νοροϊούς ιδίων τύπων οι οποίοι έχουν απομονωθεί τα προηγούμενα χρόνια από ανθρώπινα δείγματα, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της τυποποίησης μέσω Real Time PCR.

Πιο συγκεκριμένα: Κατά την εφαρμογή της συμβατικής PCR σε 6 θετικά με τη Real Time PCR δείγματα για τη παρουσία Νοροϊών τύπου GII, υπήρξε παραγωγή προϊόντος του αναμενόμενου μεγέθους (387 bp) (εικόνα 11)

**Εικόνα 20.** Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης προϊόντων για Νόροϊο GII.





Οι αλληλουχίες αναγνώστηκαν και μετά από αναζήτηση στην γενετική βάση Genbank με τη χρήση της μηχανής αναζήτησης BLAST, βρέθηκε ότι όλες οι ελεχθείσες αλληλουχίες ανήκουν στον τύπο GII-4.

Οι ακόλουθες αλληλουχίες αποτίστηκαν:

Δείγμα V25:

```
TGGATGAGATTCTCGGATCTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAGTTTTGT
GAATGAAGATGGCGTCGAATGACGCCAACCCATCTGATGGGTCCGCAGCCAACCTCGTCCCA
GAGGTCAACAATGAGGTTATGGCTTTGGAGCCCGTTGTTGGTGCCGCTATTGCGGCGCCTGT
AGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGAAATAATTTTGTACAAGCCCCTGGTG
GAGAGTTCACAGTATCCCCTAGAAACGCTCCAGGTGAAATACTATGGAGCGCGCCCTTAGGC
CCTGATCTGAATCCCTACCTATCTCATTTGGCCAGAATGTA
```

Δείγμα V54:

```
TGGATGAGATTCTCGGATCTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAGTTTTGT
GAATGAAGATGGCGTCGAATGACGCCAACCCATCTGATGGGTCCGCAGCCAACCTCGTCCCA
GAGGTCAACAATGAGGTTATGGCTTTGGAGCCCGTTGTTGGTGCCGCTATTGCGGCGCCTGT
AGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGAAATAATTTTGTACAAGCCCCTGGTG
GAGAGTTCACAGTATCCCCTAGAAACGCTCCAGGTGAAATACTATGGAGCGCGCCCTTAGGC
CCTGATCTGAATCCCTACCTATCTCATTTGGCCAGAATGTA
```

Δείγμα V93:

```
TGGATGAGATTCTCGGATCTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAGTTTTGT
GAATGAAGATGGCGTCGAATGACGCCAACCCATCTGATGGGTCCGCAGCCAACCTCGTCCCA
GAGGTCAACAATGAGGTTATGGCTTTGGAGCCCGTTGTTGGTGCCGCTATTGCGGCGCCTGT
AGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGAAATAATTTTGTACAAGCCCCTGGTG
GAGAGTTCACAGTATCCCCTAGAAACGCTCCAGGTGAAATACTATGGAGCGCGCCCTTAGGC
CCTGATCTGAATCCCTACCTATCTCATTTGGCCAGAATGTA
```

Δείγμα V146:

```
TGGATGAGATTCTCGGATCTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAGTTTTGT
GAATGAAGATGGCGTCGAATGACGCCAACCCATCTGATGGGTCCGCAGCCAACCTCGTCCCA
GAGGTCAACAATGAGGTTATGGCTTTGGAGCCCGTTGTTGGTGCCGCTATTGCGGCGCCTGT
AGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGAAATAATTTTGTACAAGCCCCTGGTG
GAGAGTTCACAGTATCCCCTAGAAACGCTCCAGGTGAAATACTATGGAGCGCGCCCTTAGGC
CCTGATCTGAATCCCTACCTATCTCATTTGGCCAGAATGTA
```

Δείγμα V477:

```
TGGATGAGATTCTCGGATCTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAGTTTTGT  
GAATGAAGATGGCGTCTGAATGACGCCAACCCATCTGATGGGTCCGCAGCCAACCTCGTCCCA  
GAGGTCAACAATGAGGTCATGGCTTTGGAGCCCGTTGTTGGTGCCGCTATTGCGGCGCCTGT  
GGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGAAATAATTTTGTACAAGCCCCTGGTG  
GAGAGTTCACAGTATCCCCTAGAAACGCTCCAGGTGAAATACTATGGAGCGCGCCCTTAGGC  
CCTGATCTGAATCCCTACCTATCTCATTTGGCCAGAATGTA
```

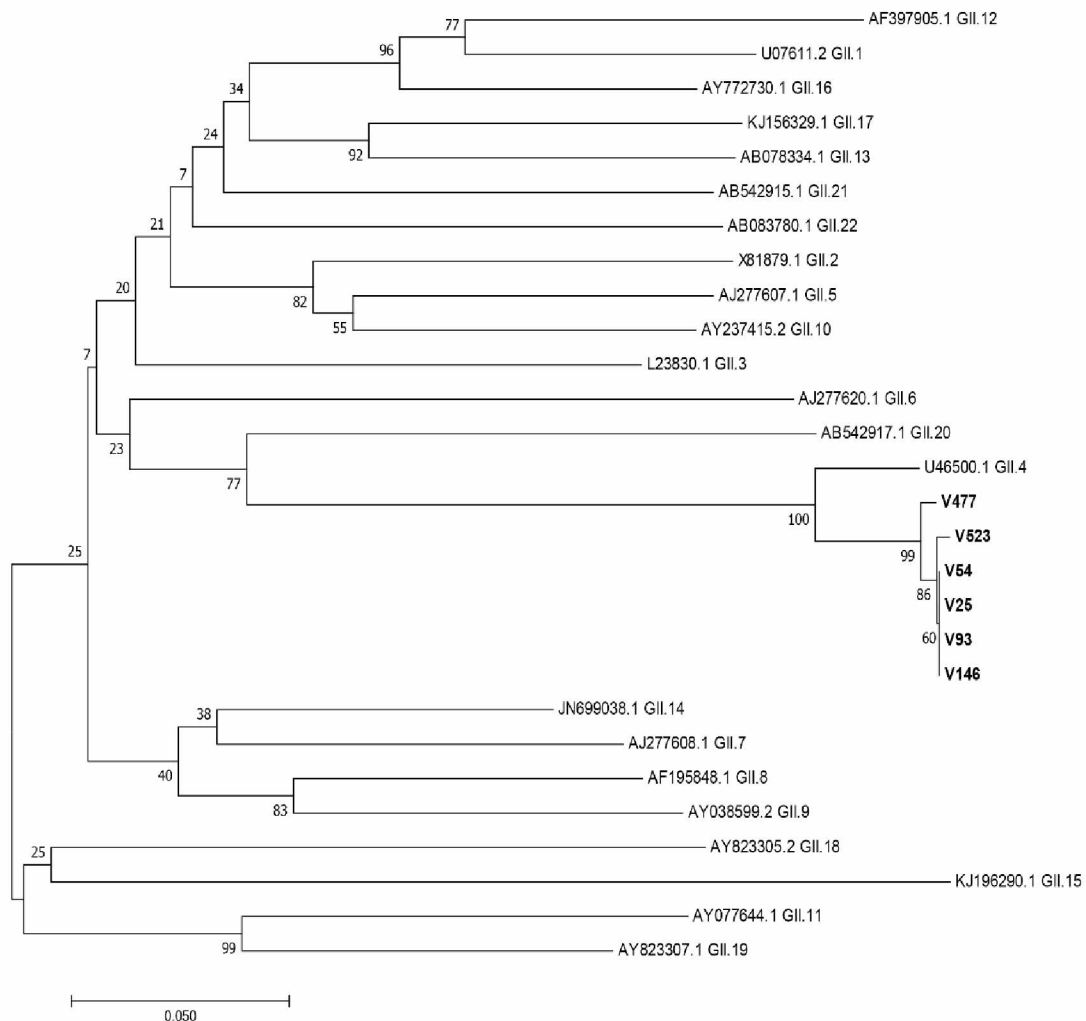
Δείγμα V523:

```
TTTTGTGAATGAAGATGGCGTCTGAATGACGCCAACCCATCTGATGGGTCCGCAGCCAACCTC  
GTCCCAGAGGTCAACAATGAGGTTATGGCTTTGGAGCCCGTTGTCGGTGCCGCTATTGCGGC  
GCCTGTAGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGAAATAATTTTGTACAAGCCC  
CTGGTGGAGAGTTCACAGTATCCCCTAGAAACGCTCCAGGTGAAATACTATGGAGCGCGCCC  
TTAGGCCCTGATCTGAATCCCTACCTATCTCATTTGGCCAGAATGTA
```

Οι 4 αλληλουχίες ήταν πανομοιότυπες (Δείγμα V54, V25, V93, V146), το δείγμα V477 είχε 2 SNPs σε σχέση με αυτές και το δείγμα V523 είχε ένα SNP σε σχέση με τις τέσσερις πανομοιότυπες.

Η κατασκευή φυλογενετικού δέντρου εύκολα κατέδειξε και επιβεβαίωσε αυτό που διαφάνηκε και από τη χρήση της μηχανής αναζήτησης BLAST: Τα στελέχη ανήκουν στον γενότυπο GII.4. Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε με την ανάκτηση από την GenBank χαρακτηριστικών για τους γενότυπους GII.1 – GII.22 στελεχών, με τα δείγματα της παρούσας μελέτης να δημιουργούν ξεχωριστό κλάδο με το G II.4 στέλεχος (U46500.1) (Εικόνα 12)

**Εικόνα 21.** Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο με βάση τις μερικές αλληλουχίες του γονιδίου του καψιδίου του ιού. Τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με την GII.4 γενετική ομάδα



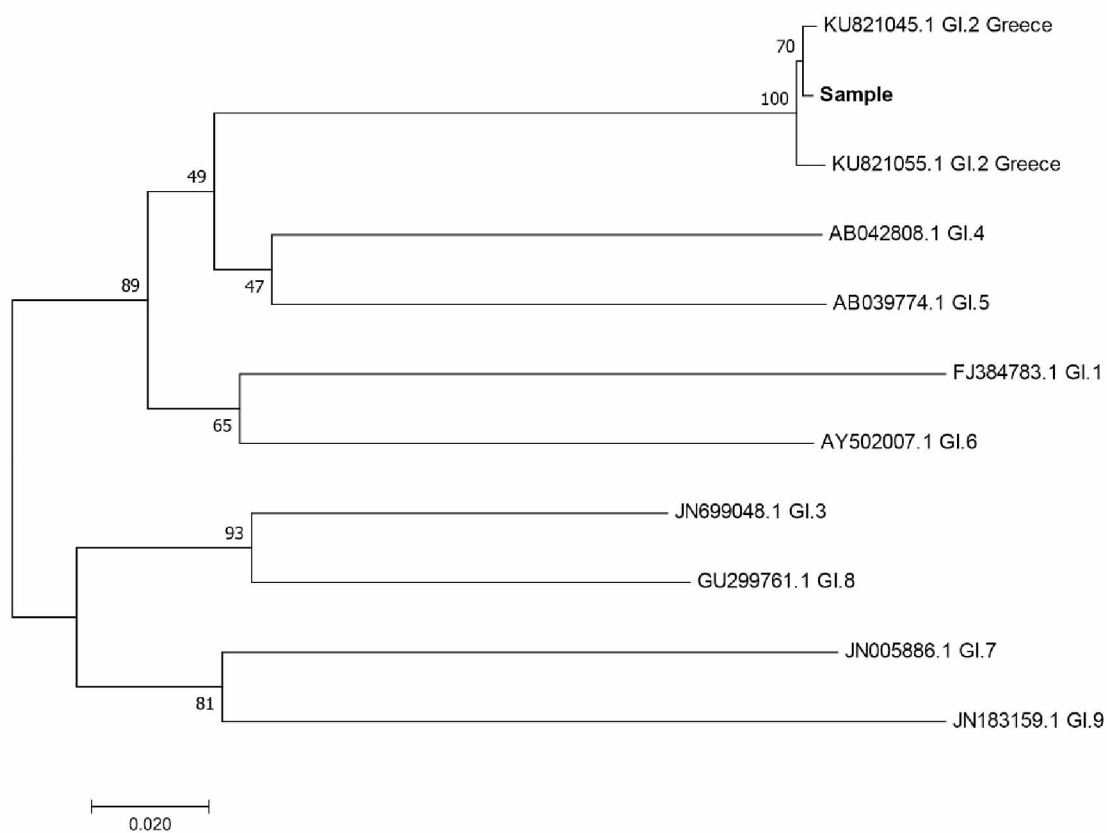
Κατά την εφαρμογή της συμβατικής PCR σε 1 θετικό με τη Real Time PCR δείγμα για τη παρουσία Νοροϊών τύπου GI, υπήρξε παραγωγή προϊόντος του αναμενόμενου μεγέθους (330 bp). Μετά από ανάγνωση της αλληλουχίας (sequencing) εντοπίστηκε η ακόλουθη γενετική ακολουθία:

```
CCCGAATTTGTAATGATGATGGCGTCTAAGGACGCCCTCAAAGCGCTGATGGCGCAAGC
GGCGCAGGTCAACTGGTGCCGGAGGTTAATACAGCTGACCCCTTACCCATGGAACCTGTGG
CTGGGCCACACAGCCGTAGCCACTGCTGGCAAGTTAATATGATTGACCCCTGGATTGTT
AATAATTTTGTCCAGTCACCTCAAGGTGAGTTCACAATCTCTCCTAACAATACCCCGGTGAT
ATTTTGTGTTGATTACAATTAGGTCCA
```

Η αλληλουχία μετά τη χρήση της αναζήτησης BLAST, βρέθηκε να διαφέρει μόλις σε μία νουκλεοτιδική θέση, χωρίς αλλαγή αμινοξέος (synonymous SNP) από αλληλουχία

στελέχους που εντοπίστηκε στην Νότια Ελλάδα (Norovirus GI.2 isolate 66230/ATH/GI.2 RdRp and VP1 genes, partial cds) το 2014. Η κατασκευή φυλογενετικού δέντρου εύκολα κατέδειξε και επιβεβαίωσε αυτό που διαφάνηκε και από τη χρήση της μηχανής αναζήτησης BLAST: Το στέλεχος ανήκει στον γενότυπο GI.2. Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε με την ανάκτηση από την GenBank χαρακτηριστικών για τους γενότυπους GI.1 – GI.9 στελεχών, με το αναγνωσθέν δείγμα της παρούσας μελέτης να δημιουργεί ξεχωριστό κλάδο με το GI.2 στελέχη (Εικόνα 13)

**Εικόνα 22.** Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο με βάση μερικές αλληλουχίες του γονιδίου VP1. Τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν με την GI.2 γενετική ομάδα



### 3.2.7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΔΕΝΟΪΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

Κατά το έτη 2008 - 2013 συλλέχθηκαν 640 δείγματα από άνδρες και γυναίκες. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ταυτοποιήθηκαν 24 δείγματα θετικά σε Αδένοϊο. Πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν 3 θετικά δείγματα το έτος 2008, 5 θετικά δείγματα το έτος 2009, 4 θετικά δείγματα το έτος 2010, 4 θετικά δείγματα το έτος 2011, 3 θετικά δείγματα το έτος 2012, 5 θετικά δείγματα το έτος 2013. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανδρών και γυναικών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test,  $df=1$   $p=$  0.12, 0.37, 1, 0.62, 0.61, για κάθε έτος 2008-2012 αντίστοιχα) εκτός του 2013 όπου υπήρξαν περισσότερα κρούσματα στις γυναίκες (Fisher exact test  $p=0.01$ ). Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

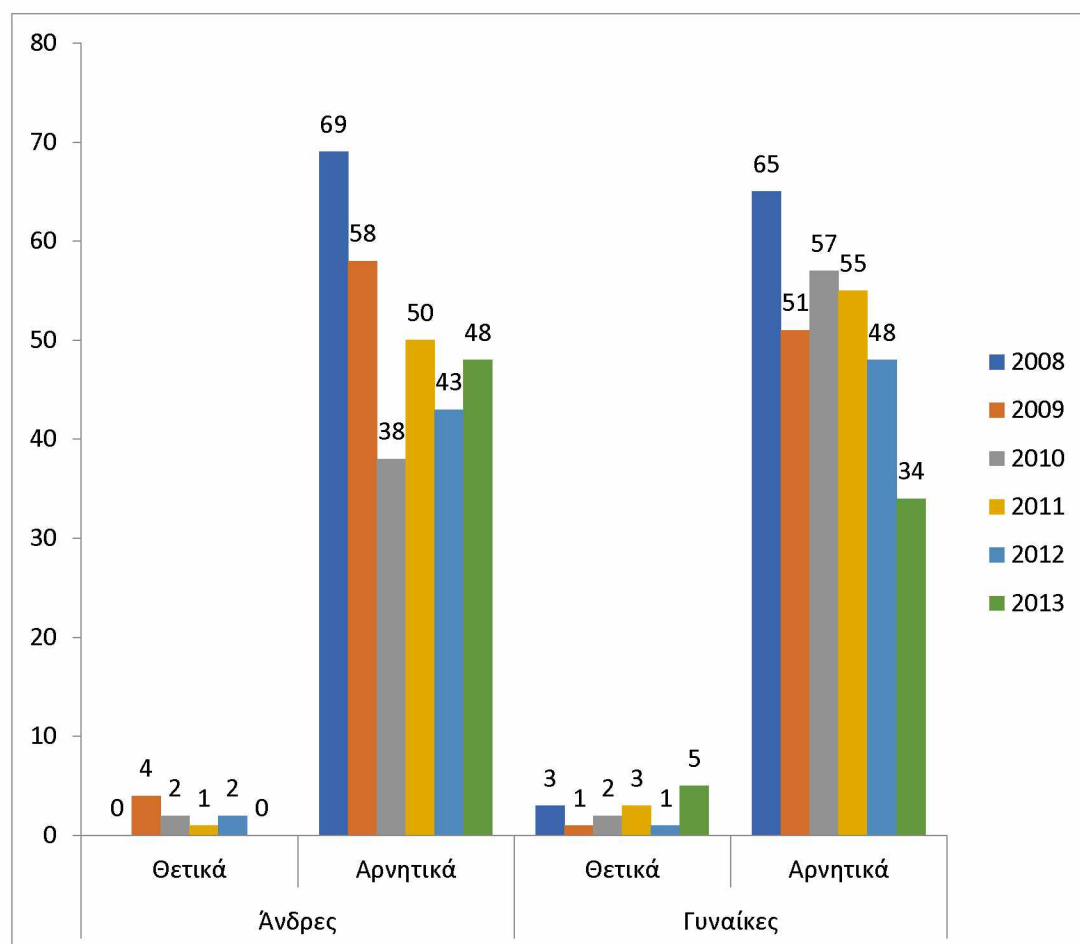
**Πίνακας 16:** Συγκεντρωτικά εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού Αδένοϊων με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο, για την περίοδο 2008-2013. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

	2008				2009			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	69	0/69	0.00	0.00 – 5.27	62	4/58	6.45	2.54 – 15.45
Γυναίκες	68	3/65	4.11	1.51 – 12.18	52	1/51	1.92	0.34 – 10.12
Σύνολο	137	3/134	2.19	0.75 – 6.24	114	5/109	4.39	1.89 – 9.86

	2010				2011			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	40	2/38	5.00	1.38 – 16.50	51	1/50	1.96	0.35 – 10.30
Γυναίκες	59	2/57	3.39	0.93 – 11.54	58	3/55	5.17	1.77 – 14.14
Σύνολο	99	4/95	4.04	1.58 – 9.93	109	4/105	3.81	1.49 – 9.39

	2012				2013			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	45	2/43	4.44	1.23 – 14.82	48	0/48	0.00	0.00 – 7.41
Γυναίκες	49	1/48	2.04	0.36 – 10.69	39	5/34	12.82	5.60 – 26.71
Σύνολο	94	3/91	3.19	1.09 – 8.97	87	5/82	5.78	2.48 – 12.76

**Γράφημα 16:** Κλινικά δείγματα θετικά και αρνητικά για Αδένοϊο ανά φύλο με real time PCR συγκεντρωτικά για τα έτη 2008 - 2013



### 3.2.8. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΣΤΡΟΪΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΧΘΗΚΑΝ ΤΗ ΠΕΡΙΟΔΟ 2008-2013, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ REAL TIME PCR

Κατά το έτη 2008- 2013 συλλέχθηκαν 640 δείγματα από άνδρες και γυναίκες. Μετά τον μοριακό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με real time PCR ταυτοποιήθηκαν 2 δείγματα θετικά σε Αστροϊο. Πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν 1 θετικό δείγμα το 2009 και 1 θετικό δείγμα το 2010. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανδρών και γυναικών ως προς τα θετικά δείγματα (Fisher exact test,  $p= 1, 1, 1, 1, 1$  και  $1$  για κάθε έτος 2008-2013 αντίστοιχα). Στον πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου.

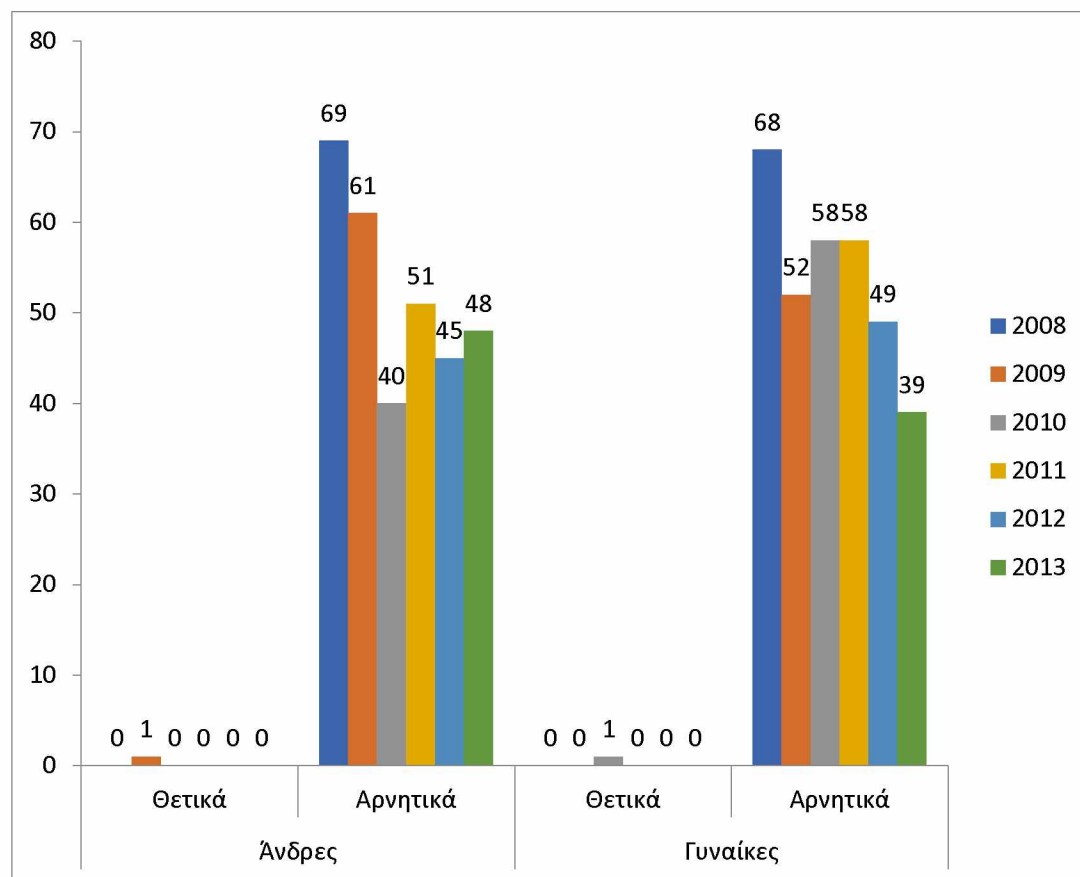
Πίνακας 17: Συγκεντρωτικά εργαστηριακά αποτελέσματα ανίχνευσης γενωμικού υλικού Άστροϊών με τη χρήση real time PCR, ανά φύλο, για την περίοδο 2008-2013. Σ=Σύνολο, Θ=Θετικά, Α=Αρνητικά, %=Ποσοστό θετικών επί το σύνολο, 95% CI = Διάστημα εμπιστοσύνης επί του ποσοστού.

	2008				2009			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	69	0/69	0.00	0.00 – 5.27	62	1/61	1.61	0.28 – 8.58
Γυναίκες	68	0/68	0.00	0.00 – 5.35	52	0/52	0.00	0.00 – 6.88
Σύνολο	137	0/137	0.00	0.00 – 2.73	114	1/113	0.88	0.16 – 4.81

	2010				2011			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	40	0/40	0.00	0.00 – 8.76	51	0/51	0.00	0.00 – 7.00
Γυναίκες	59	1/58	1.69	0.30 – 8.99	58	0/58	0.00	0.00 – 6.21
Σύνολο	99	1/98	1.01	0.18 – 5.50	109	0/109	0.00	0.00 – 3.40

	2012				2013			
	Σ	Θ/Α	%	95% CI	Σ	Θ/Α	%	95% CI
Άνδρες	45	0/45	0.00	0.00 – 7.87	48	0/48	0.00	0.00 – 7.41
Γυναίκες	49	0/49	0.00	0.00 – 7.27	39	0/39	0.00	0.00 – 8.97
Σύνολο	94	0/94	0.00	0.00 – 3.93	87	0/87	0.00	0.00 – 4.23

**Γράφημα 17:** Κλινικά δείγματα θετικά και αρνητικά για Άστροϊο ανά φύλο με real time PCR συγκεντρωτικά για τα έτη 2008 - 2013



### 3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΡΟΤΑΪΩΝ

Στον πίνακα 21 καταγράφονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κάθε τεχνικής που εφαρμόστηκε ενώ στον πίνακα 22 καταγράφονται η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική προγνωστική αξία, η αρνητική προγνωστική αξία του ανοσοχρωματογραφικού τεστ (ICT) και της cPCR σε αντιπαραβολή με την rt-PCR.

Η rt-PCR έδωσε τα περισσότερα θετικά αποτελέσματα και θεωρικά λαμβάνοντας υπόψη την πολύ υψηλή ευαισθησία της τεχνικής, τα αποτελέσματα αυτά θεωρούνται ως πραγματικά θετικά. Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, η ευαισθησία του ανοσοχρωματογραφικού τεστ (ICT) και της συμβατικής cPCR είναι σχεδόν παρόμοια με τιμές 75,24% και 77,14 αντίστοιχα.



Πίνακας 21: Αποτελέσματα για κάθε τεχνική που χρησιμοποιήθηκε

Δείγματα	Ανοσοχρωματογραφική δοκιμή (ICT)		Real-time PCR		Συμβατική PCR	
	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό	Αρνητικό
Σύνολο	89	551	105	535	81	559

Πίνακας 22: Σύγκριση διαγνωστικής αξίας τεχνικών λαμβάνοντας υπόψη ως τιμή αναφοράς τα αποτελέσματα της rt-PCR

Αποτελέσματα rt-PCR	Αριθμός δειγμάτων		0			
	ICT Θετικά	ICT Αρνητικά	% Ευαισθησία (95% CI)	% Ειδικότητα (95% CI)	ΘΠΑ (95% CI)	ΑΠΑ (95% CI)
Θετικά	79	26	75,24 (66,98-83,49)	98,13 (96,98-99,28)	88,76 (82,20-95,33)	95,28 (93,51-97,05)
Αρνητικά	10	525				
	cPCR Θετικά	cPCR Αρνητικά				
Θετικά	81	24	77,14 (69,11-85,17)	100	100	95,71 (94,03-97,39)
Αρνητικά	0	535				

Επιπρόσθετα εφαρμόστηκε μία ανάλυση των αποτελεσμάτων θεωρώντας κάθε δείγμα που βρέθηκε θετικό με 2 διαφορετικές τεχνικές ως πραγματικά θετικό (93 δείγματα) και όλα τα υπόλοιπα ως πραγματικά αρνητικά (547 δείγματα) υπολογίστηκε η διαγνωστική αξία (πίνακας 23) της κάθε τεχνικής. Και με αυτή τη προσέγγιση, οι ευαισθησίες του ανοσοχρωματογραφικού τεστ (ICT) και της συμβατικής cPCR είναι επίσης σχεδόν παρόμοιες και υψηλές, με τιμές 82,98% και 89,01% αντίστοιχα.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη γνώση μας, η παρούσα μελέτη αποτελεί τη πρώτη ταυτόχρονη διερεύνηση δειγμάτων για τη παρουσία των κύριων ιών που προκαλούν γαστρεντερίτιδες σε δείγματα τα οποία συλλεχθηκαν από ενήλικες και παιδιά στην περιοχή της Θεσσαλίας. Για όλα τα δείγματα υπάρχει ο περιορισμός της μη ύπαρξης δεδομένων από μικροσκοπική εξέταση κοπράνων. Η διερεύνηση αφορούσε ένα αρκετά μεγάλο αριθμό δειγμάτων τα οποία επιτρέπουν μια ασφαλή εκτίμηση επί της παρουσίας των ιών αυτών σε ασθενείς που νοσηλεύονται στα νοσοκομεία και οι οποίοι παρουσίασαν εντερίτιδες.

Τα ευρήματά μας συμφωνούν συνολικά με παρόμοιες μελέτες οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλες χώρες αλλά και με αποτελέσματα μικρότερης κλίμακας μελετών στον Ελληνικό χώρο.

### 4.1. ΠΕΡΙ ΡΟΤΑΪΩΝ

Ο κύριος ιός ο οποίος εντοπίστηκε στα συλλεχθέντα δείγματα ήταν ο Ροταϊός. Το εύρημα αυτό δε προκαλεί εντύπωση, καθώς οι ροταϊοί αποτελούν το 5-10% όλων των περιστατικών οξείας γαστρεντερίτιδας σε βρέφη και νεαρά παιδιά [191–193]. Η θετικότητα σε συνολικό ποσοστό της τάξεως του 21% σε δείγματα παιδιών κατά τη μελέτη μας αν και υψηλή θεωρείται αναμενόμενη αν αναλογιστούμε ότι η συλλογή των δειγμάτων αφορούσε δείγματα ήδη νοσηλευόντων με εντερίτιδα ανηλίκων και όχι το συνολικό πληθυσμό, στον οποίο η πλειονότητα των περιστατικών αντιμετωπίζονται χωρίς νοσηλεία [324]. Η υψηλή θετικότητα σε ροταϊούς αιτιολογείται από τη μικρή μολυσματική δόση [217,218], το μεγάλο ιικό φορτίο που αποβάλλεται στα κόπρανα [219] και τη μεγάλη ανθεκτικότητα που παρουσιάζει ο ιός στις περιβαλλοντικές συνθήκες [221,222]. Η μόλυνση με ροταϊό αποτελεί την πιο συχνή ιογενή γαστρεντερίτιδα, κάτι που επιβεβαιώθηκε και στη περιοχή της μελέτης μας.

Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και στους ενήλικες, με το ποσοστό θετικότητας να φτάνει το 15% και να είναι το υψηλότερο όσον αφορά τους υπό διερεύνηση ιούς. Το ποσοστό θεωρείται αρκετά υψηλό, αν αναλογιστούμε ποσοστά θετικότητας που έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες: Σε μια μικρής κλίμακας μελέτη στην Αγγλία, οι Ροταϊοί ευθύνονταν για το 4% των διαρροιών σε ενήλικες που νοσηλεύτηκαν σε νοσοκομείο [697]. Το ποσοστό αυτό κυμάνθηκε στο 3% στην Ελβετία και στη Σουηδία [698,699]. Σε άλλες μη Ευρωπαϊκές γεωγραφικές περιοχές παρατηρήθηκαν παρόμοια ποσοστά: της τάξεως του 5% (Ταϊλάνδη) [700],

2-4% σε ενήλικες άνω των 45 ετών στο Μίσιγκαν [701]. Υπάρχουν όμως και μελέτες όπου έχουν αναφερθεί πολύ υψηλότερα ποσοστά όπως 14% στην Ιαπωνία, 17% στην Αυστραλία και το ακραίο ποσοστό του 42% στην Ινδονησία ή 63% στο Μεξικό [702–705]. Πάντως αξίζει να αναφερθεί ότι ακόμη και αυτά τα ποσοστά μπορεί να υποτιμούν την συχνότητα, καθώς συνήθως οι Ροταϊοί της Ομάδας C δεν αναζητούνται σε συνθήκες ρουτίνας και σε μια μελέτη στην Αγγλία υπήρξε οροθετικότητα 42% σε ασθενείς [706]. Επομένως, το ποσοστό του 15% σε ενήλικες που νοσηλεύτηκαν με διάρροια αποτελεί ένα υψηλό ποσοστό για τα Ευρωπαϊκά δεδομένα, όχι όμως και σε παγκόσμιο επίπεδο. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας δε προκύπτει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που προήλθαν από άνδρες ή γυναίκες.

Κατά τη μελέτη μας πραγματοποιήθηκε και η τυποποίηση ενός σημαντικού αριθμού θετικών δειγμάτων Ροταϊών με τη χρήση multiplex PCR. Η τυποποίηση είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς ως γνωστόν οι ροταϊοί παρουσιάζουν μεγάλη γενετική και αντιγονική ποικιλομορφία και συνήθως πολλαπλά στελέχη συνυπάρχουν σε μια περιοχή οποιαδήποτε στιγμή. Συνήθως, στις ανεπτυγμένες χώρες, υπάρχει ένας μόνο γονότυπος ο οποίος κυριαρχεί σε μια γεωγραφική περιοχή σε αντιθεση με τις αναπτυσσόμενες όπου δεν μπορεί να προσδιοριστεί ένα μεμονωμένο επικρατέστερο στέλεχος [326]. Κάτι παρόμοιο παρατηρήθηκε και στα αποτελέσματά μας: 1 στα 4 θετικά δείγματα περιείχε τον G4P[8], υψηλά ποσοστά (21,57% και 19,61%) περιείχαν τον G1P[8] και G2P[4] αντίστοιχα, για να ακολουθήσουν σε μικρότερα ποσοστά οι G3P[8], G10P[4], G2P[8] και G12P[4]. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν σε ένα βαθμό με τη παρούσα ερευνητική βιβλιογραφία: Ένας μικρός αριθμός διαφορετικών γονοτύπων Ροταϊών επικράτησαν στους ανθρώπους κατά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες παγκοσμίως. Οι γονότυποι που κυκλοφορούν σε υψηλή συχνότητα είναι οι G1, G2, G3, G4 και πιο πρόσφατα οι G9 και G12, προκαλώντας το 80-90% όλων των μολύνσεων με ροταϊούς στη Βόρεια Αμερική, την Ευρώπη και την Αυστραλία [199–201]. Αντίθετα, στις χώρες της Αφρικής, της Ασίας και της Νότιας Αμερικής, άλλοι γονότυποι όπως οι G5, G6 και G8 είναι οι επικρατέστεροι [184,202–205]. Οι μελέτες επιτήρησης έχουν αναγνωρίσει 14 τύπους G (G1-G6, G8-G12, G14, G20 και G26) και 17 τύπους P (P[1] έως P[11], P[14], P[15], P[24], P[25] και P[28]) και σχεδόν 90 συνδυασμούς αντιγόνων ροταϊών τύπου A σε παιδιά παγκοσμίως. Μεταξύ αυτών, ωστόσο, μόνο λίγοι είναι υπεύθυνοι για την πλειοψηφία των λοιμώξεων που εκδηλώνονται κλινικά. Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα πιο κοινά ανθρώπινα στελέχη είναι τα G1P[8] (31 - 53%), G2P[4] (10-13%), G3P[8] (5-11%), G4P[8] (5-14%), G9P[8] (10-11%) και G12P[8] (1-3%). Παρατηρούμε λοιπόν, ότι κατά τη μελέτη μας παρατηρήθηκε ένα αρκετά σημαντικό ποσοστό παρουσίας του τύπου G4P[8], διπλάσιο από τη συνήθη συχνότητα σε παγκόσμιο επίπεδο. Παρόλα αυτά, σε προηγούμενη μελέτη στον Ελληνικό χώρο τα ποσοστά που ανιχνεύθηκαν σε δείγματα συλλεχθέντα από τη Στερεά Ελλάδα τη περίοδο 2008-2010 όσον αφορά

τους διάφορους τύπους ήταν: G4P[8] (70.7%), G1P[8] (10.9%), G2P[4] (5.4%) και G9P[8] (2.2%) [707]. Η αλλαγή στη συχνότητα των γενότυπων είναι κάτι που έχει ήδη αναφερθεί πολλάκις ανά τον κόσμο και αποτελεί ένα αναμενόμενο εύρημα και σε επίπεδο χώρας, μέσα στο πέρασμα των ετών [201]. Πέραν αυτού όμως, παρατηρούμε και στη παρούσα μελέτη ότι οι τρεις επικρατούντες γενότυποι παραμένουν οι G4P[8], G1P[8] και G2P[4] σε όλη τη περίοδο (2008-2013).

Όσον αφορά τη διακύμανση της παρουσίας των γενότυπων ανά έτος, δεν παρατηρήθηκε καμμία σημαντική αυξομείωση. Μοναδικό ίσως εύρημα μπορεί να θεωρηθεί η σχετικά μεγαλύτερη παρουσία θετικών δειγμάτων τύπου G1P[8] μετά το 2011. Στα τρία πρώτα έτη της μελέτης (2008-2010) ο τύπος G1P[8] αντιπροσωπεύει το 10% των θετικών δειγμάτων, ενώ από το 2011-2013 αντιπροσωπεύει το 29% των θετικών δειγμάτων. Ο μικρός σχετικά αριθμός τυποποιημένων θετικών δειγμάτων δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Η επιδημιολογική υπεροχή των έξι κοινών γενότυπων φαίνεται να μην έχει αλλάξει μετά την εισαγωγή του εμβολίου, αν και μερικά από τα μείζονα στελέχη τείνουν να είναι πιο κοινά από άλλα.

Η ιατρική σημασία των G4P[8], G1P[8], G2P[4] και G3P[8] έγινε εμφανής στα τέλη της δεκαετίας του 1980 [327,328]. Αντίθετα, τα στελέχη G9P[8] και G12P[8] έχουν γίνει κοινά παγκοσμίως μόνο από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 και μετά. Στελέχη G1P[4] και G2P[8] αναφέρθηκε να συνυπάρχουν συνήθως με στελέχη G1P[8] και G2P[4] [199,328]. Στελέχη G2P[4] εμφανίστηκαν να κυριαρχούν σε διαδοχικές εποχές σε χώρες όπου το ετεροτυπικό εμβόλιο G1P[8] (Rotarix) χρησιμοποιείται στα εθνικά προγράμματα ανοσοποίησης ρουτίνας [329].

Κατά τη διερεύνηση των δειγμάτων για τη παρουσία Ροταϊών, χρησιμοποιήθηκαν η Real-time PCR, η συμβατική PCR με πολλαπλασιασμό γενωμικής περιοχής του γονιδίου VP6 αλλά και τεστ ταχείας ανοσοχρωματογραφίας για ανίχνευση αντιγόνου του ιού. Συγκρίνοντας τις τρεις αυτές διαγνωστικές τεχνικές και θεωρώντας τη real time-PCR ως μέθοδο αναφοράς, η σημαντική διαπίστωση είναι οι σχετικά χαμηλές ευαισθησίες των δύο άλλων τεχνικών. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στη δυνατότητα της real-time PCR να ανιχνεύει πολύ χαμηλές ποσότητες ιικού φορτίου. Ένας άλλος περιορισμός της μελέτης μας ήταν ότι υπήρχαν μόνο 84 αληθώς θετικά δείγματα και αυτό μπορεί να επηρεάσει την ασφάλεια γύρω από τους υπολογισμούς ευαισθησίας, όπως απεικονίζεται από τα μεγάλα διαστήματα εμπιστοσύνης που σχετίζονται με αυτά τα δεδομένα.

Όσον αφορά το κόστος των τεχνικών και την ευκολία χρήσης, είναι προφανές ότι η ταχεία ανοσοχρωματογραφία παρέχει ένα φθινό (το κόστος μπορεί να είναι ακόμη και 2 ευρώ ανά δείγμα, ενώ είναι περίπου 4-6 ευρώ για τη συμβατική PCR και τη real-

time PCR), γρήγορο και αξιόπιστο τρόπο για τον έλεγχο των δειγμάτων με σχετικά ικανοποιητικά αποτελέσματα. Σε αντίθεση με τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης για τα ιϊκά παθογόνα, όπως το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, την ανοσοενζυμική τεχνική και τη PCR, η ταχεία ανοσοχρωματογραφία μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς ακριβό εργαστηριακό εξοπλισμό και είναι επομένως κατάλληλο για χρήση σε χαμηλού κόστους κλινική πρακτική. Αντίθετα, οι μοριακές τεχνικές είναι δύσκολο να εκτελεστούν την ημέρα της δειγματοληψίας σε ένα σχήμα ρουτίνας σε νοσοκομείο, και απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και προσωπικό. Συνήθως, ύποπτα δείγματα συλλέγονται από διάφορες ημέρες και αποστέλλονται για μοριακή ανίχνευση σε μια παρτίδα. Αυτό μειώνει σημαντικά τις δυνατότητες ταχείας διάγνωσης, κάτι σημαντικό σε περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας.

Ωστόσο, ένα αρνητικό αποτέλεσμα ταχείας ανοσοχρωματογραφίας δεν αποκλείει την παρουσία ροταϊών, όπως φαίνεται στη μελέτη αυτή. Είναι γνωστό ότι η PCR είναι η πλέον ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση των ροταϊών. Ειδικά στη real time PCR μπορεί να ανιχνευθεί ένα εξαιρετικά χαμηλό ιϊκό φορτίο. Η βέλτιστη προσέγγιση θα ήταν η εφαρμογή της ταχείας ανοσοχρωματογραφίας, όσο και μια μοριακή τεχνική, real-time PCR κατά προτίμηση. Η συμβατική PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε θετικά δείγματα για την απόκτηση σχετικά μεγάλου μεγέθους προϊόντος PCR για ανάγνωση της γενετικής αλληλουχίας και ανάλυση μοριακής επιδημιολογίας. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας συμφωνούν με άλλες πρόσφατες μελέτες αξιολόγησης τεχνικών ανίχνευσης, οι οποίες επίσης διαπίστωσαν ότι ο έλεγχος του αντιγόνου παρέμεινε κατάλληλη τεχνική για την ταχεία διάγνωση της λοίμωξης από ροταϊό σε κλινικά δείγματα [708,709].

#### 4.2. ΠΕΡΙ ΝΟΡΟΪΩΝ

Κατά τη διερεύνηση των συλλεχθέντων δειγμάτων για τη παρουσία Νοροϊών, 51 δείγματα ευρέθησαν θετικά, ένα ποσοστό της τάξης του 8%. Τόσο στους ενήλικες όσο και τα παιδιά τα ποσοστά ήταν παρόμοια (7,74% και 8,94% αντίστοιχα) ενώ δε παρουσιάστηκαν και στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ δειγμάτων ανδρών και γυναικών (8,89% και 7,08% αντίστοιχα). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με παρόμοιες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί ανά τον κόσμο. Οι Νοροϊοί παρουσιάζουν παγκόσμια κατανομή και ο εκτιμώμενος συνολικός επιπολασμός στα βρέφη και στα μικρά παιδιά που νοσηλεύονται για θεραπεία γαστρεντερίτιδας είναι περίπου 12% [371], γεγονός που καθιστά τους νοροϊούς το δεύτερο σημαντικότερο αιτιολογικό παράγοντα σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε αυτή την ηλικιακή ομάδα μετά τους ροταϊούς. Σε μια ανασκόπηση δημοσιευμένων μελετών, οι νοροϊοί αναφέρθηκαν σταθερά ως η δεύτερη πιο σημαντική αιτία σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε βρέφη και μικρά παιδιά παγκοσμίως, με 200.000 θανάτους ετησίως σε παιδιά

ηλικίας κάτω των 5 ετών στις αναπτυσσόμενες χώρες [442]. Στην Ελλάδα στο παρελθόν σε παρόμοια μελέτη το ποσοστό παρουσίας των Νοροϊών σε κόπρανα παιδιών που νοσηλεύτηκαν με γαστρεντερίτιδα, κυμάνθηκε στο 4% [710].

Παρόμοια ποσοστά όμως αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία και όσον αφορά τους ενήλικες. Στην Ολλανδία, το 18% των κοινοτικών περιπτώσεων γαστρεντερίτιδας κατά τη διάρκεια μίας μόνο χειμερινής περιόδου και τουλάχιστον 5% των περιπτώσεων γαστρεντερίτιδας που οδήγησαν σε επίσκεψη σε γιατρό, συνδέθηκαν με λοίμωξη από νοροϊό [455]. Στη Σουηδία, παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας σε ηλικιωμένους ασθενείς που νοσηλεύτηκαν για τη θεραπεία σοβαρής γαστρεντερίτιδας λόγω λοίμωξης από νοροϊούς [445]. Επιπλέον, θνησιμότητα 2% αναφέρθηκε σε μια σημαντική έξαρση κρουσμάτων από νοροϊούς σε έξι νοσηλευτικά ιδρύματα στο Ισραήλ [446]. Στη Γερμανία, η συχνότητα εμφάνισης γαστρεντερίτιδας από νοροϊούς στην κοινότητα που απαιτεί ιατρική φροντίδα, αναφέρθηκε σε 626 περιπτώσεις / ανά 100.000 ανθρωπο-έτη, καθιστώντας την κυρίαρχη γνωστή αιτία οξείας γαστρεντερίτιδας σε αυτή τη χώρα [457]. Στην Αγγλία, η συχνότητα εμφάνισης γαστρεντερίτιδας από νοροϊούς ήταν 4,5 περιπτώσεις / ανά 100 ανθρωπο-έτη, που αντιστοιχεί σε περίπου 2 εκατομμύρια επεισόδια ανά έτος [458].

Κατά την τυποποίηση των 51 θετικών δειγμάτων, με τη χρήση Real time PCR, ανευρέθησαν 47 δείγματα του τύπου GII και 4 δείγματα του τύπου GI, κάτι το οποίο συμφωνεί με τη διεθνή βιβλιογραφία: Σε μια μελέτη που έγινε σε βρέφη και παιδιά ηλικίας 0 έως 14 ετών στη Φιλανδία, διαπιστώθηκε ότι ο επιπολασμός αντισωμάτων έναντι των νοροϊών GII φθάνει στο 91,2% σε παιδιά ηλικίας άνω των 5 ετών [454]. Ο επιπολασμός αντισωμάτων έναντι των νοροϊών GII (Μεξικό, Χαβάη ή Lordsdale) φαίνεται να είναι υψηλότερος από εκείνη των ιών GI στις περισσότερες αλλά όχι σε όλες τις μελέτες το οποίο πιθανώς αντανακλά την κυριαρχία των στελεχών GII. Στον ελληνικό χώρο, σε μία μεγάλη έξαρση κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας στη περιοχή της Ξάνθης πριν μία δεκαετία (1640 κρούσματα σε μία περίοδο 3 μηνών), ως αιτιολογικός παράγοντας αναγνωρίστηκε ο Νοροϊός τύπου GII με την απομόνωση 15 διαφορετικών στελεχών [711]. Ως αίτιο θεωρήθηκε το μολυσμένο πόσιμο νερό. Σε μία μεγάλη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στην Νότια Ελλάδα για τη περίοδο 2013-2015, από 69 μοριακά θετικά δείγματα κοπράνων παιδιών, ανιχνεύθηκαν οι εξής γενότυποι: Ο GII.4 σε ποσοστό 74%, ο GII.2 σε ποσοστό 8.7%, ο GII.3 σε ποσοστό 5.8%, ο GII.6 σε ποσοστό 2.9%, ενώ εντοπίστηκαν και 2 στελέχη τύπου GI.2 (2.9%). Στη παρούσα μελέτη σε ενδεικτική περαιτέρω μοριακή τυποποίηση μερικών θετικών με τη Real Time PCR δειγμάτων, έξι δείγματα τύπου GII βρέθηκε ότι ανήκουν στο γενότυπο GII.4 ενώ ένα δείγμα του τύπου GI ανήκε επίσης στο γενότυπο GI.2, συμφωνώντας σε μεγάλο βαθμό με τα αποτελέσματα της μελέτης στη Νότια Ελλάδα [712]. Η σύγκριση μέσω της μηχανής αναζήτησης BLAST με άλλα στελέχη ανά τον κόσμο, καθώς και η φυλογενετική ανάλυση επέδειξε ότι όλα τα στελέχη των οποίων

οι αλληλουχίες αναγνώστηκαν είναι όμοια σε μεγάλο βαθμό με στέλεχη που κυκλοφορούν παγκοσμίως και εμπλέκονται σε εξάρσεις ή σποραδικά κρούσματα γαστρεντερίτιδας τη τελευταία δεκαετία.

#### 4.3. ΠΕΡΙ ΑΔΕΝΟΙΩΝ

Όσον αφορά την ανίχνευση των Αδενοϊών, ανευρέθησαν μόλις 23 θετικά δείγματα (3,59%) με τα 13 να εντοπίστηκαν σε ενήλικες και τα 10 σε παιδιά. Εντοπίστηκε μία στατιστικώς σημαντική διαφορά καθώς τα 10 θετικά δείγματα στα παιδιά εντοπίστηκαν σε ένα σύνολο μόλις 113 δειγμάτων (8,13%) ενώ στους ενήλικες το ποσοστό είναι 2,51% (13/504). Το εύρημα αυτό συμφωνεί με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν σε άλλες χώρες και κατά τις οποίες οι αδενοϊοί εντοπίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στα κόπρανα παιδιών [713,714]. Στον άνθρωπο, η μετάδοση των αδενοϊών και η νόσος που προκαλούν ποικίλλουν από τη σποραδική μέχρι την επιδημική μορφή. Το μοτίβο μετάδοσης συσχετίζεται συχνά με τον ορότυπο του ιού και την ηλικία (παιδιά ή ενήλικες) του ευπαθούς πληθυσμού. Μέχρι στιγμής, έχει τεκμηριωθεί η ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού ασυμπτωματικών λοιμώξεων από αδενοϊούς. Στα παιδιά η πιο συχνή οδός μετάδοσης είναι η κοπρανοστοματική.

Οι αδενοϊοί εκτιμάται ότι προκαλούν το 8% ιογενών γαστρεντερίτιδων παγκοσμίως. Σε μια πρόσφατη μελέτη που βασίστηκε σε εξέταση δειγμάτων με PCR, το 4,4% των παιδιατρικών ασθενών με διάρροια στην Ασία είχαν PCR θετικό αποτέλεσμα στα κόπρανα, για Ad40 και 41. Οι εντερικοί αδενοϊοί ανιχνεύθηκαν σε ένα τμήμα δειγμάτων κοπράνων παιδιών με γαστρεντερίτιδα σε ορισμένες χώρες, ως εξής: 6,9% στις Ηνωμένες Πολιτείες, 8% στη Σουηδία. 8,3% στη Γερμανία. 7,9% στην Ανατολική Αγγλία, Ηνωμένο Βασίλειο, 9% στο Μπέλφαστ, Ηνωμένο Βασίλειο. 1,4% στο Blantyre, Μαλάουι. 1,5% στη Βραζιλία. 6,7% στο Ιράν. 4% στην Τζακάρτα, Ινδονησία και 10,8% στο Shenzhen, Κίνα. Οι Levidiotou et al. σε εξαετή μελέτη, εξέτασαν 4604 δείγματα κοπράνων από παιδιά που προσήλθαν στο νοσοκομείο και το ποσοστό θετικών δειγμάτων για αδενοϊό ανέρχονταν σε 3.5% [710]. Τα ποσοστά αυτά είναι όμοια τόσο μεταξύ τους όσο και με τη συχνότητα εντόπισης της μελέτης μας.

#### 4.4. ΠΕΡΙ ΑΣΤΡΟΪΩΝ

Η παρουσία των Αστροϊών στα δείγματα ήταν πολύ μικρή: Μόλις δύο δείγματα βρέθηκαν θετικά, το ένα αφορούσε ενήλικα και το άλλο ανήλικο, σε ποσοστά μικρότερα του 1%. Παρόμοια όμως αποτελέσματα υπήρξαν και σε μια προηγούμενη μελέτη στον Ελληνικό χώρο, κατά την οποία εντοπίστηκαν μόλις 70 θετικά δείγματα Αστροϊών σε 4604 συνολικά δείγματα κοπράνων [710]. Οι λοιμώξεις από Αστροϊούς έχουν παγκόσμια κατανομή και αφορούν κυρίως, αλλά όχι αποκλειστικά, μικρά

παιδιά που παρουσιάζουν διάρροια. Οι αστροϊοί έχουν επίσης συσχετιστεί με διάρροια σε ανοσοκατεσταλμένους ανήλικες και ενήλικες ασθενείς [552,553,557–560] και με νεκρωτική εντεροκολίτιδα σε παιδιά που έχουν γεννηθεί πρόωρα [549,550]. Η κατανομή του HAstV με βάση την ηλικία μπορεί να ποικίλλει, εξαρτώμενη από διάφορους παράγοντες. Ωστόσο, σε μία μελέτη που διεξήχθη στην Ισπανία, περίπου το 80% των λοιμώξεων από αστροϊούς εμφανίστηκαν σε παιδιά ηλικίας κάτω των 3 ετών [565].

Η επίπτωση του HAstV σύμφωνα με την ηλικία (επεισόδια ανά έτος) που βρέθηκε σε μια μελέτη στην Αίγυπτο (0,38 για βρέφη <6 μηνών, 0,40 για βρέφη 6 έως 11 μηνών και 0,16 για παιδιά μεταξύ 12 και 23 μηνών) ήταν παρόμοια με αυτή που βρέθηκε για τον ροταϊό [566].

Οι περισσότερες λοιμώξεις από αστροϊούς ανιχνεύονται τους χειμερινούς μήνες σε εύκρατες περιοχές και σε περίοδο βροχών σε πιο τροπικά κλίματα [564,567]. Η γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από τον HAstV είναι συνήθως μια ήπια, αυτοπεριοριζόμενη νόσος που δεν απαιτεί νοσηλεία.

Πρόσφατη ταυτοποίηση, με εξαιρετικά ευαίσθητες μεθόδους, νέων AstV σε ανθρώπους [87,545,573] υπογραμμίζουν την ανάγκη διερεύνησης του επιπολασμού αυτών των νέων ιών προκειμένου να προσδιοριστεί ο πραγματικός τους αντίκτυπος στη δημόσια υγεία. Περιορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι αυτοί οι ιοί, όπως και ο HAstV, μπορούν να έχουν παγκόσμια κατανομή στον ανθρώπινο πληθυσμό.[481,574] Δεδομένης της γενετικής σχέσης τους με τους ιούς των ζώων και της πιθανότητας μετάδοσής τους μεταξύ διαφορετικών ειδών, είναι πιθανό τα άγρια ζώα να παίζουν κάποιο ρόλο στην επιδημιολογία αυτών των ιών.

#### 4.5. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Τα αποτελέσματα της διατριβής επιβεβαιώνουν την αναγνώριση των ιικών εντεροπαθογόνων ως μία από τις κυριότερες αιτίες γαστρεντερίτιδας στον άνθρωπο: Σχεδόν ένα στα τέσσερα κλινικά δείγματα διαρροϊκών κοπράνων τα οποία εξετάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής περιείχε κάποιον ή κάποιους από τους τέσσερις σημαντικότερους εντερικούς ιούς. Σε κάποιες περιπτώσεις όπως η παρουσία των ροταϊών, τα ποσοστά συχνότητας βρέθηκαν να είναι ασυνήθιστα υψηλά σε σύγκριση με Ευρωπαϊκές χώρες. Η χρήση σύγχρονων μοριακών τεχνικών κατά τη διερεύνηση κλινικών δειγμάτων αποδεικνύεται ένα σημαντικό εργαλείο βελτιώνοντας σημαντικά την ευαισθησία των διαγνωστικών μας προσεγγίσεων. Η περαιτέρω μοριακή διερεύνηση και τυποποίηση των δειγμάτων επέδειξε μία σημαντική γενετική ποικιλομορφία των κυκλοφορούντων στελεχών. Αυτό προφανώς και εγείρει σημαντικά θέματα όσον αφορά την αποτελεσματικότητα των



εφαρμοζόμενων θεραπευτικών και προληπτικών μέτρων π.χ. τη χρήση εμβολίων συγκεκριμένων τύπων. Η διατριβή επέδειξε μία συνεχή διακύμανση στην συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων τύπων, ιδίως των Ροταϊών, στη περιοχή της μελέτης, με σημαντικές εναλλαγές μεταξύ των ετών.

Τα δεδομένα και ευρήματα τα οποία παρουσιάζονται μέσα από τη διατριβή αυτή αφορούν ένα συγκεκριμένο χρονικό και χωρικό πλαίσιο (περίοδος 2008-2013, περιοχή Θεσσαλίας) και αποτελούν έτσι μία σημαντική προσθήκη στη σχετική βιβλιογραφία. Τα δεδομένα αυτά γίνονται πλέον διαθέσιμα για μετα-αναλύσεις οι οποίες θα σχετίζονται με την εξέλιξη της παρουσίας των ιών αυτών αλλά και με τη μελέτη των παραγόντων που μπορεί να τις προκαλούν. Παράλληλα, η συγκέντρωση στοιχείων τυποποίησης των παθογόνων αποτελεί μια διαρκώς αναγκαία διαδικασία η οποία επιτρέπει την καλύτερη δυνατή πρόληψη και αντιμετώπιση των σχετικών νοσημάτων, επιτυγχάνοντας τον απώτερο σκοπό της προάσπισης της Δημόσιας Υγείας.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet Lond Engl* 1974;2:61–3.
- [2] Jayaram H, Estes MK, Prasad BVV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* 2004;101:67–81. doi:10.1016/j.virusres.2003.12.007.
- [3] McClain B, Settembre E, Temple BRS, Bellamy AR, Harrison SC. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol* 2010;397:587–99. doi:10.1016/j.jmb.2010.01.055.
- [4] Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:165–77. doi:10.1038/nrmicro2673.
- [5] Estrozi LF, Settembre EC, Goret G, McClain B, Zhang X, Chen JZ, et al. Location of the dsRNA-dependent polymerase, VP1, in rotavirus particles. *J Mol Biol* 2013;425:124–32. doi:10.1016/j.jmb.2012.10.011.
- [6] Periz J, Celma C, Jing B, Pinkney JNM, Roy P, Kapanidis AN. Rotavirus mRNAs are released by transcript-specific channels in the double-layered viral capsid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:12042–7. doi:10.1073/pnas.1220345110.
- [7] Li W, Manktelow E, von Kirchbach JC, Gog JR, Desselberger U, Lever AM. Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in rotavirus RNAs with potential cis-acting functions. *Nucleic Acids Res* 2010;38:7718–35. doi:10.1093/nar/gkq663.
- [8] Tortorici MA, Broering TJ, Nibert ML, Patton JT. Template recognition and formation of initiation complexes by the replicase of a segmented double-stranded RNA virus. *J Biol Chem* 2003;278:32673–82. doi:10.1074/jbc.M305358200.
- [9] Chizhikov V, Patton JT. A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. *RNA N Y N* 2000;6:814–25.
- [10] Matthijssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol* 2012;157:1177–82. doi:10.1007/s00705-012-1273-3.
- [11] Matthijssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 2011;156:1397–413. doi:10.1007/s00705-011-1006-z.
- [12] Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res* 2014;190:75–96. doi:10.1016/j.virusres.2014.06.016.
- [13] Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Ciarlet M, et al. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology* 2013;446:189–98. doi:10.1016/j.virol.2013.08.001.
- [14] Marthaler D, Rossow K, Gramer M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, et al. Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. *Virology* 2012;433:85–96. doi:10.1016/j.virol.2012.07.006.
- [15] Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virol*. 6th ed, Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013, p. 1347–401.

- [16] Lu X, McDonald SM, Tortorici MA, Tao YJ, Vasquez-Del Carpio R, Nibert ML, et al. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Struct Lond Engl* 1993 2008;16:1678–88. doi:10.1016/j.str.2008.09.006.
- [17] Patton JT, Spencer E. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* 2000;277:217–25. doi:10.1006/viro.2000.0645.
- [18] Troupin C, Schnuriger A, Duponchel S, Deback C, Schnepf N, Dehee A, et al. Rotavirus rearranged genomic RNA segments are preferentially packaged into viruses despite not conferring selective growth advantage to viruses. *PloS One* 2011;6:e20080. doi:10.1371/journal.pone.0020080.
- [19] López S, Arias CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* 2004;12:271–8. doi:10.1016/j.tim.2004.04.003.
- [20] Dormitzer PR. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J* 2002;21:885–97. doi:10.1093/emboj/21.5.885.
- [21] Dormitzer PR, Sun Z-YJ, Blixt O, Paulson JC, Wagner G, Harrison SC. Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8\* core. *J Virol* 2002;76:10512–7.
- [22] Isa P, Arias CF, López S. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J* 2006;23:27–37. doi:10.1007/s10719-006-5435-y.
- [23] Haselhorst T, Fleming FE, Dyason JC, Hartnell RD, Yu X, Holloway G, et al. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat Chem Biol* 2009;5:91–3. doi:10.1038/nchembio.134.
- [24] Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, et al. Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 2012;485:256–9. doi:10.1038/nature10996.
- [25] Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, et al. Spike protein VP8\* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J Virol* 2012;86:4833–43. doi:10.1128/JVI.05507-11.
- [26] Ramani S, Cortes-Penfield NW, Hu L, Crawford SE, Czako R, Smith DF, et al. The VP8\* domain of neonatal rotavirus strain G10P[11] binds to type II precursor glycans. *J Virol* 2013;87:7255–64. doi:10.1128/JVI.03518-12.
- [27] Imbert-Marcille B-M, Barbé L, Dupé M, Le Moullac-Vaidye B, Besse B, Peltier C, et al. A FUT2 gene common polymorphism determines resistance to rotavirus A of the P[8] genotype. *J Infect Dis* 2014;209:1227–30. doi:10.1093/infdis/jit655.
- [28] Le Pendu J, Nyström K, Ruvoën-Clouet N. Host-pathogen co-evolution and glycan interactions. *Curr Opin Virol* 2014;7:88–94. doi:10.1016/j.coviro.2014.06.001.
- [29] Gutiérrez M, Isa P, Sánchez-San Martín C, Pérez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF, et al. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2010;84:9161–9. doi:10.1128/JVI.00731-10.
- [30] Pérez-Vargas J, Romero P, López S, Arias CF. The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *J Virol* 2006;80:3322–31. doi:10.1128/JVI.80.7.3322-3331.2006.
- [31] Isa P, Realpe M, Romero P, López S, Arias CF. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* 2004;322:370–81. doi:10.1016/j.virol.2004.02.018.
- [32] Fleming FE, Böhm R, Dang VT, Holloway G, Haselhorst T, Madge PD, et al. Relative roles of GM1 ganglioside, N-acylneuraminic acids, and  $\alpha 2\beta 1$  integrin in mediating rotavirus infection. *J Virol* 2014;88:4558–71. doi:10.1128/JVI.03431-13.

- [33] Bastardo JW, Holmes IH. Attachment of SA-11 rotavirus to erythrocyte receptors. *Infect Immun* 1980;29:1134–40.
- [34] Fiore L, Greenberg HB, Mackow ER. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* 1991;181:553–63.
- [35] Rodríguez JM, Chichón FJ, Martín-Forero E, González-Camacho F, Carrascosa JL, Castón JR, et al. New Insights into Rotavirus Entry Machinery: Stabilization of Rotavirus Spike Conformation Is Independent of Trypsin Cleavage. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004157. doi:10.1371/journal.ppat.1004157.
- [36] Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J* 2011;30:408–16. doi:10.1038/emboj.2010.322.
- [37] Trask SD, Wetzel JD, Dermody TS, Patton JT. Mutations in the rotavirus spike protein VP4 reduce trypsin sensitivity but not viral spread. *J Gen Virol* 2013;94:1296–300. doi:10.1099/vir.0.050674-0.
- [38] Ludert JE, Michelangeli F, Gil F, Liprandi F, Esparza J. Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology* 1987;27:95–101.
- [39] Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. Rotavirus Replication: Plus-Sense Templates for Double-Stranded RNA Synthesis Are Made in Viroplasm. *J Virol* 2004;78:7763–74. doi:10.1128/JVI.78.14.7763-7774.2004.
- [40] Ayala-Breton C, Arias M, Espinosa R, Romero P, Arias CF, López S. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J Virol* 2009;83:8819–31. doi:10.1128/JVI.02308-08.
- [41] Fabbretti E, Afrikanova I, Vascotto F, Burrone OR. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol* 1999;80 ( Pt 2):333–9. doi:10.1099/0022-1317-80-2-333.
- [42] Campagna M, Eichwald C, Vascotto F, Burrone OR. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J Gen Virol* 2005;86:1481–7. doi:10.1099/vir.0.80598-0.
- [43] Criglar JM, Hu L, Crawford SE, Hyser JM, Broughman JR, Prasad BVV, et al. A Novel Form of Rotavirus NSP2 and Phosphorylation-Dependent NSP2-NSP5 Interactions Are Associated with Viroplasm Assembly. *J Virol* 2014;88:786–98. doi:10.1128/JVI.03022-13.
- [44] Martin D, Duarte M, Lepault J, Poncet D. Sequestration of free tubulin molecules by the viral protein NSP2 induces microtubule depolymerization during rotavirus infection. *J Virol* 2010;84:2522–32. doi:10.1128/JVI.01883-09.
- [45] Eichwald C, Arnoldi F, Laimbacher AS, Schraner EM, Fraefel C, Wild P, et al. Rotavirus Viroplasm Fusion and Perinuclear Localization Are Dynamic Processes Requiring Stabilized Microtubules. *PLoS ONE* 2012;7:e47947. doi:10.1371/journal.pone.0047947.
- [46] Arnoldi F, De Lorenzo G, Mano M, Schraner EM, Wild P, Eichwald C, et al. Rotavirus increases levels of lipidated LC3 supporting accumulation of infectious progeny virus without inducing autophagosome formation. *PloS One* 2014;9:e95197. doi:10.1371/journal.pone.0095197.
- [47] Jiang X, Jayaram H, Kumar M, Ludtke SJ, Estes MK, Prasad BVV. Cryoelectron Microscopy Structures of Rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA Complexes: Implications for Genome Replication. *J Virol* 2006;80:10829–35. doi:10.1128/JVI.01347-06.
- [48] Campagna M, Budini M, Arnoldi F, Desselberger U, Allende JE, Burrone OR. Impaired hyperphosphorylation of rotavirus NSP5 in cells depleted of casein kinase 1alpha is associated with the formation of viroplasms with altered morphology and a moderate decrease in virus replication. *J Gen Virol* 2007;88:2800–10. doi:10.1099/vir.0.82922-0.

- [49] Taylor JA, O'Brien JA, Yeager M. The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *EMBO J* 1996;15:4469–76.
- [50] Tian P, Hu Y, Schilling WP, Lindsay DA, Eiden J, Estes MK. The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *J Virol* 1994;68:251–7.
- [51] Hyser JM, Collinson-Pautz MR, Utama B, Estes MK. Rotavirus Disrupts Calcium Homeostasis by NSP4 Viroporin Activity. *MBio* 2010;1:e00265-10-e00265-20. doi:10.1128/mBio.00265-10.
- [52] Hyser JM, Utama B, Crawford SE, Estes MK. Genetic Divergence of Rotavirus Nonstructural Protein 4 Results in Distinct Serogroup-Specific Viroporin Activity and Intracellular Punctate Structure Morphologies. *J Virol* 2012;86:4921–34. doi:10.1128/JVI.06759-11.
- [53] Hyser JM, Utama B, Crawford SE, Broughman JR, Estes MK. Activation of the Endoplasmic Reticulum Calcium Sensor STIM1 and Store-Operated Calcium Entry by Rotavirus Requires NSP4 Viroporin Activity. *J Virol* 2013;87:13579–88. doi:10.1128/JVI.02629-13.
- [54] Berkova Z, Crawford SE, Trugnan G, Yoshimori T, Morris AP, Estes MK. Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm. *J Virol* 2006;80:6061–71. doi:10.1128/JVI.02167-05.
- [55] Crawford SE, Estes MK. Viroporin-mediated calcium-activated autophagy. *Autophagy* 2013;9:797–8. doi:10.4161/auto.23959.
- [56] Crawford SE, Hyser JM, Utama B, Estes MK. Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase signaling is required for rotavirus replication. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:E3405–13. doi:10.1073/pnas.1216539109.
- [57] Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 1996;272:101–4.
- [58] Bugarcic A, Taylor JA. Rotavirus Nonstructural Glycoprotein NSP4 Is Secreted from the Apical Surfaces of Polarized Epithelial Cells. *J Virol* 2006;80:12343–9. doi:10.1128/JVI.01378-06.
- [59] Seo N-S, Zeng CQ-Y, Hyser JM, Utama B, Crawford SE, Kim KJ, et al. Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 are receptors for the rotavirus enterotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8811–8. doi:10.1073/pnas.0803934105.
- [60] Zhang M, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol* 2000;74:11663–70.
- [61] Groft CM, Burley SK. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell* 2002;9:1273–83.
- [62] Montero H, Arias CF, Lopez S. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* 2006;80:9031–8. doi:10.1128/JVI.00437-06.
- [63] Rubio RM, Mora SI, Romero P, Arias CF, López S. Rotavirus prevents the expression of host responses by blocking the nucleocytoplasmic transport of polyadenylated mRNAs. *J Virol* 2013;87:6336–45. doi:10.1128/JVI.00361-13.
- [64] Feng N, Yasukawa LL, Sen A, Greenberg HB. Permissive replication of homologous murine rotavirus in the mouse intestine is primarily regulated by VP4 and NSP1. *J Virol* 2013;87:8307–16. doi:10.1128/JVI.00619-13.
- [65] Cheung W, Gill M, Esposito A, Kaminski CF, Courousse N, Chwetzoff S, et al. Rotaviruses Associate with Cellular Lipid Droplet Components To Replicate in Viroplasms, and Compounds Disrupting or Blocking Lipid Droplets Inhibit Viroplasm Formation and Viral Replication. *J Virol* 2010;84:6782–98. doi:10.1128/JVI.01757-09.

- [66] Gaunt ER, Cheung W, Richards JE, Lever A, Desselberger U. Inhibition of rotavirus replication by downregulation of fatty acid synthesis. *J Gen Virol* 2013;94:1310–7. doi:10.1099/vir.0.050146-0.
- [67] Berois M, Sapin C, Erk I, Poncet D, Cohen J. Rotavirus Nonstructural Protein NSP5 Interacts with Major Core Protein VP2. *J Virol* 2003;77:1757–63. doi:10.1128/JVI.77.3.1757-1763.2003.
- [68] Boudreaux CE, Vile DC, Gilmore BL, Tanner JR, Kelly DF, McDonald SM. Rotavirus core shell subdomains involved in polymerase encapsidation into virus-like particles. *J Gen Virol* 2013;94:1818–26. doi:10.1099/vir.0.052951-0.
- [69] Trask SD, Dormitzer PR. Assembly of Highly Infectious Rotavirus Particles Recoated with Recombinant Outer Capsid Proteins. *J Virol* 2006;80:11293–304. doi:10.1128/JVI.01346-06.
- [70] Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Patton JT. Rotavirus Glycoprotein NSP4 Is a Modulator of Viral Transcription in the Infected Cell. *J Virol* 2005;79:15165–74. doi:10.1128/JVI.79.24.15165-15174.2005.
- [71] McNulty MS, Curran WL, McFerran JB. The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells. *J Gen Virol* 1976;33:503–8. doi:10.1099/0022-1317-33-3-503.
- [72] Gardet A, Breton M, Fontanges P, Trugnan G, Chwetzoff S. Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies. *J Virol* 2006;80:3947–56. doi:10.1128/JVI.80.8.3947-3956.2006.
- [73] Blatt SE, Conner ME. Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:39–43. doi:10.1097/MOG.0b013e328011829d.
- [74] Blatt SE, Kirkwood CD, Parreño V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, et al. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet Lond Engl* 2003;362:1445–9. doi:10.1016/S0140-6736(03)14687-9.
- [75] Ramani S, Paul A, Saravanabavan A, Menon VK, Arumugam R, Sowmyanarayanan TV, et al. Rotavirus antigenemia in Indian children with rotavirus gastroenteritis and asymptomatic infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2010;51:1284–9. doi:10.1086/657069.
- [76] Feng N, Kim B, Fenaux M, Nguyen H, Vo P, Omary MB, et al. Role of interferon in homologous and heterologous rotavirus infection in the intestines and extraintestinal organs of suckling mice. *J Virol* 2008;82:7578–90. doi:10.1128/JVI.00391-08.
- [77] Ward LA, Rosen BI, Yuan L, Saif LJ. Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *J Gen Virol* 1996;77 ( Pt 7):1431–41. doi:10.1099/0022-1317-77-7-1431.
- [78] Feng N, Sen A, Wolf M, Vo P, Hoshino Y, Greenberg HB. Roles of VP4 and NSP1 in Determining the Distinctive Replication Capacities of Simian Rotavirus RRV and Bovine Rotavirus UK in the Mouse Biliary Tract. *J Virol* 2011;85:2686–94. doi:10.1128/JVI.02408-10.
- [79] Ramig RF. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J Virol* 2004;78:10213–20. doi:10.1128/JVI.78.19.10213-10220.2004.
- [80] Osborne MP, Haddon SJ, Worton KJ, Spencer AJ, Starkey WG, Thornber D, et al. Rotavirus-induced changes in the microcirculation of intestinal villi of neonatal mice in relation to the induction and persistence of diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991;12:111–20.
- [81] Chattopadhyay S, Basak T, Nayak MK, Bhardwaj G, Mukherjee A, Bhowmick R, et al. Identification of cellular calcium binding protein calmodulin as a regulator of rotavirus A infection during comparative proteomic study. *PloS One* 2013;8:e56655. doi:10.1371/journal.pone.0056655.

- [82] Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnoo I, Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science* 2000;287:491–5.
- [83] Hagbom M, Istrate C, Engblom D, Karlsson T, Rodriguez-Diaz J, Buesa J, et al. Rotavirus Stimulates Release of Serotonin (5-HT) from Human Enterochromaffin Cells and Activates Brain Structures Involved in Nausea and Vomiting. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002115. doi:10.1371/journal.ppat.1002115.
- [84] Hagbom M, Sharma S, Lundgren O, Svensson L. Towards a human rotavirus disease model. *Curr Opin Virol* 2012;2:408–18. doi:10.1016/j.coviro.2012.05.006.
- [85] Mohanty SK, Donnelly B, Bondoc A, Jafri M, Walther A, Coots A, et al. Rotavirus replication in the cholangiocyte mediates the temporal dependence of murine biliary atresia. *PLoS One* 2013;8:e69069. doi:10.1371/journal.pone.0069069.
- [86] Hertel PM, Crawford SE, Bessard BC, Estes MK. Prevention of cholestasis in the murine rotavirus-induced biliary atresia model using passive immunization and nonreplicating virus-like particles. *Vaccine* 2013;31:5778–84. doi:10.1016/j.vaccine.2013.07.023.
- [87] Finkbeiner SR, Allred AF, Tarr PI, Klein EJ, Kirkwood CD, Wang D. Metagenomic Analysis of Human Diarrhea: Viral Detection and Discovery. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000011. doi:10.1371/journal.ppat.1000011.
- [88] Minot S, Bryson A, Chehoud C, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. Rapid evolution of the human gut virome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:12450–5. doi:10.1073/pnas.1300833110.
- [89] Minot S, Grunberg S, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. Hypervariable loci in the human gut virome. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:3962–6. doi:10.1073/pnas.1119061109.
- [90] Sachsenröder J, Twardziok S, Hammerl JA, Janczyk P, Wrede P, Hertwig S, et al. Simultaneous Identification of DNA and RNA Viruses Present in Pig Faeces Using Process-Controlled Deep Sequencing. *PLoS ONE* 2012;7:e34631. doi:10.1371/journal.pone.0034631.
- [91] Kapusinszky B, Minor P, Delwart E. Nearly Constant Shedding of Diverse Enteric Viruses by Two Healthy Infants. *J Clin Microbiol* 2012;50:3427–34. doi:10.1128/JCM.01589-12.
- [92] Phan TG, Vo NP, Bonkougou IJO, Kapoor A, Barro N, O’Ryan M, et al. Acute diarrhea in West African children: diverse enteric viruses and a novel parvovirus genus. *J Virol* 2012;86:11024–30. doi:10.1128/JVI.01427-12.
- [93] Ryan ET. The intestinal pathobiome: its reality and consequences among infants and young children in resource-limited settings. *J Infect Dis* 2013;208:1732–3. doi:10.1093/infdis/jit509.
- [94] Virgin HW. The Virome in Mammalian Physiology and Disease. *Cell* 2014;157:142–50. doi:10.1016/j.cell.2014.02.032.
- [95] Azevedo MP, Vlasova AN, Saif LJ. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev Vaccines* 2013;12:169–81. doi:10.1586/erv.13.3.
- [96] Liu F, Li G, Wen K, Wu S, Zhang Y, Bui T, et al. Lactobacillus rhamnosus GG on Rotavirus-Induced Injury of Ileal Epithelium in Gnotobiotic Pigs: *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;57:750–8. doi:10.1097/MPG.0b013e3182a356e1.
- [97] Martella V, Bányai K, Matthijnsens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 2010;140:246–55. doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.028.
- [98] Feng N, Franco MA, Greenberg HB. Murine model of rotavirus infection. *Adv Exp Med Biol* 1997;412:233–40.

- [99] Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2002;34:1351–61. doi:10.1086/340103.
- [100] Offit PA. Rotaviruses: immunological determinants of protection against infection and disease. *Adv Virus Res* 1994;44:161–202.
- [101] Ray PG, Kelkar SD, Walimbe AM, Biniwale V, Mehendale S. Rotavirus immunoglobulin levels among Indian mothers of two socio-economic groups and occurrence of rotavirus infections among their infants up to six months. *J Med Virol* 2007;79:341–9. doi:10.1002/jmv.20804.
- [102] Johansson E, Istrate C, Charpilienne A, Cohen J, Hinkula J, Poncet D, et al. Amount of maternal rotavirus-specific antibodies influence the outcome of rotavirus vaccination of newborn mice with virus-like particles. *Vaccine* 2008;26:778–85. doi:10.1016/j.vaccine.2007.11.089.
- [103] Appaiahgari MB, Glass R, Singh S, Taneja S, Rongsen-Chandola T, Bhandari N, et al. Transplacental rotavirus IgG interferes with immune response to live oral rotavirus vaccine ORV-116E in Indian infants. *Vaccine* 2014;32:651–6. doi:10.1016/j.vaccine.2013.12.017.
- [104] Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* 2006;24:2718–31. doi:10.1016/j.vaccine.2005.12.048.
- [105] Deal EM, Lahl K, Narváez CF, Butcher EC, Greenberg HB. Plasmacytoid dendritic cells promote rotavirus-induced human and murine B cell responses. *J Clin Invest* 2013;123:2464–74. doi:10.1172/JCI60945.
- [106] Parra M, Herrera D, Calvo-Calle JM, Stern LJ, Parra-López CA, Butcher E, et al. Circulating human rotavirus specific CD4 T cells identified with a class II tetramer express the intestinal homing receptors  $\alpha 4\beta 7$  and CCR9. *Virology* 2014;452–453:191–201. doi:10.1016/j.virol.2014.01.014.
- [107] Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* 1996;272:104–7.
- [108] Aiyegbo MS, Sapparapu G, Spiller BW, Eli IM, Williams DR, Kim R, et al. Human Rotavirus VP6-Specific Antibodies Mediate Intracellular Neutralization by Binding to a Quaternary Structure in the Transcriptional Pore. *PLoS ONE* 2013;8:e61101. doi:10.1371/journal.pone.0061101.
- [109] Sapparapu G, Sims AL, Aiyegbo MS, Shaikh FY, Harth EM, Crowe JE. Intracellular neutralization of a virus using a cell-penetrating molecular transporter. *Nanomed* 2014;9:1613–24. doi:10.2217/nnm.13.139.
- [110] O’Neal CM, Harriman GR, Conner ME. Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A. *J Virol* 2000;74:4102–9.
- [111] Hou Z, Huang Y, Huan Y, Pang W, Meng M, Wang P, et al. Anti-NSP4 antibody can block rotavirus-induced diarrhea in mice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;46:376–85. doi:10.1097/MPG.0b013e3181661ae4.
- [112] Yuan L, Honma S, Ishida S-I, Yan X-Y, Kapikian AZ, Hoshino Y. Species-specific but not genotype-specific primary and secondary isotype-specific NSP4 antibody responses in gnotobiotic calves and piglets infected with homologous host bovine (NSP4[A]) or porcine (NSP4[B]) rotavirus. *Virology* 2004;330:92–104. doi:10.1016/j.virol.2004.09.021.
- [113] Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med* 1996;335:1022–8. doi:10.1056/NEJM199610033351404.



- [114] Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr Opin Virol* 2012;2:419–25. doi:10.1016/j.coviro.2012.05.003.
- [115] Feng N, Sen A, Nguyen H, Vo P, Hoshino Y, Deal EM, et al. Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts. *J Virol* 2009;83:6987–94. doi:10.1128/JVI.00585-09.
- [116] Sen A, Pruijssers AJ, Dermody TS, García-Sastre A, Greenberg HB. The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J Virol* 2011;85:3717–32. doi:10.1128/JVI.02634-10.
- [117] Nandi S, Chanda S, Bagchi P, Nayak MK, Bhowmick R, Chawla-Sarkar M. MAVS Protein Is Attenuated by Rotavirus Nonstructural Protein 1. *PLoS ONE* 2014;9:e92126. doi:10.1371/journal.pone.0092126.
- [118] Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Nayak MK, Chawla-Sarkar M. Rotavirus-Encoded Nonstructural Protein 1 Modulates Cellular Apoptotic Machinery by Targeting Tumor Suppressor Protein p53. *J Virol* 2013;87:6840–50. doi:10.1128/JVI.00734-13.
- [119] Bagchi P, Bhowmick R, Nandi S, Kant Nayak M, Chawla-Sarkar M. Rotavirus NSP1 inhibits interferon induced non-canonical NFκB activation by interacting with TNF receptor associated factor 2. *Virology* 2013;444:41–4. doi:10.1016/j.virol.2013.07.003.
- [120] Barro M, Patton JT. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J Virol* 2007;81:4473–81. doi:10.1128/JVI.02498-06.
- [121] Broquet AH, Hirata Y, McAllister CS, Kagnoff MF. RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *J Immunol Baltim Md 1950* 2011;186:1618–26. doi:10.4049/jimmunol.1002862.
- [122] Qin L, Ren L, Zhou Z, Lei X, Chen L, Xue Q, et al. Rotavirus nonstructural protein 1 antagonizes innate immune response by interacting with retinoic acid inducible gene I. *Virol J* 2011;8:526. doi:10.1186/1743-422X-8-526.
- [123] Arnold MM, Barro M, Patton JT. Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain. *J Virol* 2013;87:9813–21. doi:10.1128/JVI.01146-13.
- [124] Arnold MM, Sen A, Greenberg HB, Patton JT. The Battle between Rotavirus and Its Host for Control of the Interferon Signaling Pathway. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003064. doi:10.1371/journal.ppat.1003064.
- [125] Holloway G, Truong TT, Coulson BS. Rotavirus Antagonizes Cellular Antiviral Responses by Inhibiting the Nuclear Accumulation of STAT1, STAT2, and NF- B. *J Virol* 2009;83:4942–51. doi:10.1128/JVI.01450-08.
- [126] Holloway G, Coulson BS. Innate cellular responses to rotavirus infection. *J Gen Virol* 2013;94:1151–60. doi:10.1099/vir.0.051276-0.
- [127] Holloway G, Dang VT, Jans DA, Coulson BS. Rotavirus inhibits IFN-induced STAT nuclear translocation by a mechanism that acts after STAT binding to importin-. *J Gen Virol* 2014;95:1723–33. doi:10.1099/vir.0.064063-0.
- [128] Sen A, Rott L, Phan N, Mukherjee G, Greenberg HB. Rotavirus NSP1 protein inhibits interferon-mediated STAT1 activation. *J Virol* 2014;88:41–53. doi:10.1128/JVI.01501-13.
- [129] Zhang R, Jha BK, Ogden KM, Dong B, Zhao L, Elliott R, et al. Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:13114–9. doi:10.1073/pnas.1306917110.
- [130] Uzri D, Greenberg HB. Characterization of rotavirus RNAs that activate innate immune signaling through the RIG-I-like receptors. *PloS One* 2013;8:e69825. doi:10.1371/journal.pone.0069825.

- [131] Vancott JL, McNeal MM, Choi AHC, Ward RL. The role of interferons in rotavirus infections and protection. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res* 2003;23:163–70. doi:10.1089/107999003321532501.
- [132] González AM, Azevedo MSP, Jung K, Vlasova A, Zhang W, Saif LJ. Innate immune responses to human rotavirus in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. *Immunology* 2010;131:242–56. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03298.x.
- [133] Wang Y, Dennehy PH, Keyserling HL, Tang K, Gentsch JR, Glass RI, et al. Rotavirus infection alters peripheral T-cell homeostasis in children with acute diarrhea. *J Virol* 2007;81:3904–12. doi:10.1128/JVI.01887-06.
- [134] Ge Y, Mansell A, Ussher JE, Brooks AES, Manning K, Wang CJH, et al. Rotavirus NSP4 Triggers Secretion of Proinflammatory Cytokines from Macrophages via Toll-Like Receptor 2. *J Virol* 2013;87:11160–7. doi:10.1128/JVI.03099-12.
- [135] Rojas OL, González AM, González R, Pérez-Schael I, Greenberg HB, Franco MA, et al. Human rotavirus specific T cells: quantification by ELISPOT and expression of homing receptors on CD4+ T cells. *Virology* 2003;314:671–9.
- [136] Rojas OL, Narváez CF, Greenberg HB, Angel J, Franco MA. Characterization of rotavirus specific B cells and their relation with serological memory. *Virology* 2008;380:234–42. doi:10.1016/j.virol.2008.08.004.
- [137] Blutt SE, Miller AD, Salmon SL, Metzger DW, Conner ME. IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection. *Mucosal Immunol* 2012;5:712–9. doi:10.1038/mi.2012.51.
- [138] Blutt SE, Conner ME. The Gastrointestinal Frontier: IgA and Viruses. *Front Immunol* 2013;4. doi:10.3389/fimmu.2013.00402.
- [139] Desselberger U, Huppertz H-I. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis* 2011;203:188–95. doi:10.1093/infdis/jiq031.
- [140] Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:529–39. doi:10.1038/nrmicro1692.
- [141] Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012;12:136–41. doi:10.1016/S1473-3099(11)70253-5.
- [142] Patel NC, Hertel PM, Estes MK, de la Morena M, Petru AM, Noroski LM, et al. Vaccine-Acquired Rotavirus in Infants with Severe Combined Immunodeficiency. *N Engl J Med* 2010;362:314–9. doi:10.1056/NEJMoa0904485.
- [143] Desselberger U. Genome Rearrangements of Rotaviruses. *Adv. Virus Res.*, vol. 46, Elsevier; 1996, p. 69–95. doi:10.1016/S0065-3527(08)60070-6.
- [144] Liu J, Kibiki G, Maro V, Maro A, Kumburu H, Swai N, et al. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2011;50:308–13. doi:10.1016/j.jcv.2010.12.009.
- [145] Richardson S, Grimwood K, Gorrell R, Palombo E, Barnes G, Bishop R. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *Lancet Lond Engl* 1998;351:1844–8. doi:10.1016/S0140-6736(97)11257-0.
- [146] Fischer TK, Gentsch JR. Rotavirus typing methods and algorithms. *Rev Med Virol* 2004;14:71–82. doi:10.1002/rmv.411.
- [147] Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2004;31:259–65. doi:10.1016/j.jcv.2004.04.009.

- [148] Libonati MH, Dennis AF, Ramani S, McDonald SM, Akopov A, Kirkness EF, et al. Absence of genetic differences among G10P[11] rotaviruses associated with asymptomatic and symptomatic neonatal infections in Vellore, India. *J Virol* 2014;88:9060–71. doi:10.1128/JVI.01417-14.
- [149] Gómara MI, Green J, Gray J. Methods of rotavirus detection, sero- and genotyping, sequencing, and phylogenetic analysis. *Methods Mol Med* 2000;34:189–216. doi:10.1385/1-59259-078-0:189.
- [150] Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet Lond Engl* 1974;1:149–51.
- [151] Losonsky GA, Rennels MB, Lim Y, Krall G, Kapikian AZ, Levine MM. Systemic and mucosal immune responses to rhesus rotavirus vaccine MMU 18006. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:388–93.
- [152] Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:198–208. doi:10.1128/CMR.00029-07.
- [153] Wyatt RG, James HD, Pittman AL, Hoshino Y, Greenberg HB, Kalica AR, et al. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J Clin Microbiol* 1983;18:310–7.
- [154] Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus antigens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;185:179–227.
- [155] Woods PA, Gentsch J, Gouvea V, Mata L, Santosham M, Bai ZS, et al. Distribution of serotypes of human rotavirus in different populations. *J Clin Microbiol* 1992;30:781–5.
- [156] Santos N, Honma S, Timenetsky M d. CST, Linhares AC, Ushijima H, Armah GE, et al. Development of a Microtiter Plate Hybridization-Based PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Identification of Clinically Relevant Human Group A Rotavirus G and P Genotypes. *J Clin Microbiol* 2008;46:462–9. doi:10.1128/JCM.01361-07.
- [157] Redmond DL, Inglis NF, Fitzgerald TA, Snodgrass DR, Herring AJ. A liquid-hybridization method for typing the Vp4 and Vp7 genes of bovine rotaviruses. *J Virol Methods* 1992;39:165–77.
- [158] Nakagomi O, Oyamada H, Nakagomi T. Use of alkaline northern blot hybridization for the identification of genetic relatedness of the fourth gene of rotaviruses. *Mol Cell Probes* 1989;3:263–71.
- [159] Honma S, Chizhikov V, Santos N, Tatsumi M, Timenetsky M do CST, Linhares AC, et al. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. *J Clin Microbiol* 2007;45:2641–8. doi:10.1128/JCM.00736-07.
- [160] Dóro R, Farkas SL, Martella V, Bányai K. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015;13:1337–50. doi:10.1586/14787210.2015.1089171.
- [161] Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990;28:276–82.
- [162] Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 1994;32:1820–2.
- [163] DiStefano DJ, Kraiouchkine N, Mallette L, Maliga M, Kulnis G, Keller PM, et al. Novel rotavirus VP7 typing assay using a one-step reverse transcriptase PCR protocol and product sequencing and utility of the assay for epidemiological studies and strain

- characterization, including serotype subgroup analysis. *J Clin Microbiol* 2005;43:5876–80. doi:10.1128/JCM.43.12.5876-5880.2005.
- [164] Papp H, Borzák R, Farkas S, Kisfali P, Lengyel G, Molnár P, et al. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15-year period. *Infect Genet Evol* 2013;19:71–80. doi:10.1016/j.meegid.2013.06.013.
- [165] Ndze VN, Esona MD, Achidi EA, Gonsu KH, Dóró R, Marton S, et al. Full genome characterization of human Rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010–2011: diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 2014;28:537–60. doi:10.1016/j.meegid.2014.10.009.
- [166] Zhou X, Wang Y-H, Ghosh S, Tang W-F, Pang B-B, Liu M-Q, et al. Genomic characterization of G3P[6], G4P[6] and G4P[8] human rotaviruses from Wuhan, China: Evidence for interspecies transmission and reassortment events. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 2015;33:55–71. doi:10.1016/j.meegid.2015.04.010.
- [167] Jeong S, Than VT, Lim I, Kim W. Whole-Genome Analysis of a Rare Human Korean G3P[9] Rotavirus Strain Suggests a Complex Evolutionary Origin Potentially Involving Reassortment Events between Feline and Bovine Rotaviruses. *PLoS ONE* 2014;9:e97127. doi:10.1371/journal.pone.0097127.
- [168] Mijatovic-Rustempasic S, Roy S, Sturgeon M, Rungsririyachai K, Esona MD, Degroot D, et al. Full-Genome Sequence of a Rare Human G3P[9] Rotavirus Strain. *Genome Announc* 2014;2. doi:10.1128/genomeA.00143-14.
- [169] Guarino A, Dupont C, Gorelov AV, Gottrand F, Lee JKF, Lin Z, et al. The management of acute diarrhea in children in developed and developing areas: from evidence base to clinical practice. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13:17–26. doi:10.1517/14656566.2011.634800.
- [170] Atia AN, Buchman AL. Oral rehydration solutions in non-cholera diarrhea: a review. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2596–604; quiz 2605. doi:10.1038/ajg.2009.329.
- [171] Pizarro D, Posada G, Sandi L, Moran JR. Rice-based oral electrolyte solutions for the management of infantile diarrhea. *N Engl J Med* 1991;324:517–21. doi:10.1056/NEJM199102213240802.
- [172] Practice parameter: the management of acute gastroenteritis in young children. American Academy of Pediatrics, Provisional Committee on Quality Improvement, Subcommittee on Acute Gastroenteritis. *Pediatrics* 1996;97:424–35.
- [173] Salazar-Lindo E, Santisteban-Ponce J, Chea-Woo E, Gutierrez M. Racecadotril in the treatment of acute watery diarrhea in children. *N Engl J Med* 2000;343:463–7. doi:10.1056/NEJM200008173430703.
- [174] Kordasti S, Sjövall H, Lundgren O, Svensson L. Serotonin and vasoactive intestinal peptide antagonists attenuate rotavirus diarrhoea. *Gut* 2004;53:952–7.
- [175] Saulsbury FT, Winkelstein JA, Yolken RH. Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. *J Pediatr* 1980;97:61–5.
- [176] Ebina T. Prophylaxis of rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. *Arch Virol Suppl* 1996;12:217–23.
- [177] van der Vaart JM, Pant N, Wolvers D, Bezemer S, Hermans PW, Bellamy K, et al. Reduction in morbidity of rotavirus induced diarrhoea in mice by yeast produced monovalent llama-derived antibody fragments. *Vaccine* 2006;24:4130–7. doi:10.1016/j.vaccine.2006.02.045.
- [178] Garaicoechea L, Olichon A, Marcoppido G, Wigdorovitz A, Mozgovoij M, Saif L, et al. Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein

- possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice. *J Virol* 2008;82:9753–64. doi:10.1128/JVI.00436-08.
- [179] Aladin F, Einerhand AWC, Bouma J, Bezemer S, Hermans P, Wolvers D, et al. In Vitro Neutralisation of Rotavirus Infection by Two Broadly Specific Recombinant Monovalent Llama-Derived Antibody Fragments. *PLoS ONE* 2012;7:e32949. doi:10.1371/journal.pone.0032949.
- [180] Vega CG, Bok M, Vlasova AN, Chattha KS, Gómez-Sebastián S, Nuñez C, et al. Recombinant monovalent llama-derived antibody fragments (VHH) to rotavirus VP6 protect neonatal gnotobiotic piglets against human rotavirus-induced diarrhea. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003334. doi:10.1371/journal.ppat.1003334.
- [181] Sarker SA, Jäkel M, Sultana S, Alam NH, Bardhan PK, Chisti MJ, et al. Anti-rotavirus protein reduces stool output in infants with diarrhea: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2013;145:740-748.e8. doi:10.1053/j.gastro.2013.06.053.
- [182] Tokuhara D, Álvarez B, Mejima M, Hiroiwa T, Takahashi Y, Kurokawa S, et al. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J Clin Invest* 2013;123:3829–38. doi:10.1172/JCI70266.
- [183] Joosten V, Lokman C, Van Den Hondel CA, Punt PJ. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microb Cell Factories* 2003;2:1.
- [184] Kang G, Desai R, Arora R, Chitamabar S, Naik TN, Krishnan T, et al. Diversity of circulating rotavirus strains in children hospitalized with diarrhea in India, 2005-2009. *Vaccine* 2013;31:2879–83. doi:10.1016/j.vaccine.2013.04.030.
- [185] Rossignol J-F, Abu-Zekry M, Hussein A, Santoro MG. Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhoea: randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2006;368:124–9. doi:10.1016/S0140-6736(06)68852-1.
- [186] Teran CG, Teran-Escalera CN, Villarroel P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 2009;13:518–23. doi:10.1016/j.ijid.2008.09.014.
- [187] La Frazia S, Ciucci A, Arnoldi F, Coira M, Gianferretti P, Angelini M, et al. Thiazolidines, a new class of antiviral agents effective against rotavirus infection, target viral morphogenesis, inhibiting viroplasm formation. *J Virol* 2013;87:11096–106. doi:10.1128/JVI.01213-13.
- [188] Corrêa NBO, Penna FJ, Lima FMLS, Nicoli JR, Filho LAP. Treatment of acute diarrhea with *Saccharomyces boulardii* in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;53:497–501. doi:10.1097/MPG.0b013e31822b7ab0.
- [189] Ciccarelli S, Stolfi I, Caramia G. Management strategies in the treatment of neonatal and pediatric gastroenteritis. *Infect Drug Resist* 2013;6:133–61. doi:10.2147/IDR.S12718.
- [190] Azevedo MSP, Zhang W, Wen K, Gonzalez AM, Saif LJ, Yousef AE, et al. *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* modulate cytokine responses in gnotobiotic pigs infected with human rotavirus. *Benef Microbes* 2012;3:33–42. doi:10.3920/BM2011.0041.
- [191] Malek MA, Curns AT, Holman RC, Fischer TK, Bresee JS, Glass RI, et al. Diarrhea- and rotavirus-associated hospitalizations among children less than 5 years of age: United States, 1997 and 2000. *Pediatrics* 2006;117:1887–92. doi:10.1542/peds.2005-2351.
- [192] Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:304–6. doi:10.3201/eid1202.050006.
- [193] Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time

- trends since 2000. *The Lancet* 2012;379:2151–61. doi:10.1016/S0140-6736(12)60560-1.
- [194] Fischer TK, Viboud C, Parashar U, Malek M, Steiner C, Glass R, et al. Hospitalizations and deaths from diarrhea and rotavirus among children <5 years of age in the United States, 1993-2003. *J Infect Dis* 2007;195:1117–25. doi:10.1086/512863.
- [195] Esposito DH, Holman RC, Haberling DL, Tate JE, Podewils LJ, Glass RI, et al. Baseline estimates of diarrhea-associated mortality among United States children before rotavirus vaccine introduction. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:942–7. doi:10.1097/INF.0b013e3182254d19.
- [196] Soriano-Gabarró M, Mrukowicz J, Vesikari T, Verstraeten T. Burden of rotavirus disease in European Union countries. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:S7–11.
- [197] Van Damme P, Giaquinto C, Huet F, Gothefors L, Maxwell M, Van der Wielen M, et al. Multicenter prospective study of the burden of rotavirus acute gastroenteritis in Europe, 2004-2005: the REVEAL study. *J Infect Dis* 2007;195 Suppl 1:S4–16. doi:10.1086/516714.
- [198] Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Steele D, et al. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis* 2009;200 Suppl 1:S9–15. doi:10.1086/605025.
- [199] Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis* 2005;192 Suppl 1:S146-159. doi:10.1086/431499.
- [200] Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2005;15:29–56. doi:10.1002/rmv.448.
- [201] Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, et al. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect* 2011;139:895–909. doi:10.1017/S0950268810001810.
- [202] Todd S, Page NA, Steele AD, Peenze I, Cunliffe NA. Rotavirus strain types circulating in africa: Review of studies published during 1997-2006. *J Infect Dis* 2010;202:S34–42. doi:10.1086/653555.
- [203] Mwenda JM, Ntoto KM, Abebe A, Enweronu-Laryea C, Amina I, Mchomvu J, et al. Burden and epidemiology of rotavirus diarrhea in selected african countries: Preliminary results from the african rotavirus surveillance network. *J Infect Dis* 2010;202:S5–11. doi:10.1086/653557.
- [204] Da Silva MFM, Tort LFL, Goméa MM, Assis RMS, Volotão EDM, De Mendonça MCL, et al. VP7 Gene of human rotavirus A genotype G5: Phylogenetic analysis reveals the existence of three different lineages worldwide. *J Med Virol* 2011;83:357–66. doi:10.1002/jmv.21968.
- [205] Luchs A, Timenetsky MCST. G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: Close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains. *J Gen Virol* 2014;95:627–41. doi:10.1099/vir.0.058099-0.
- [206] Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1365–73.
- [207] Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 2011;156:1397–413. doi:10.1007/s00705-011-1006-z.

- [208] Matthijssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol* 2012;2:426–33. doi:10.1016/j.coviro.2012.04.007.
- [209] Hung T, Chen GM, Wang CG, Chou ZY, Chao TX, Ye WW, et al. Rotavirus-like agent in adult non-bacterial diarrhoea in China. *Lancet* 1983;2:1078–9.
- [210] Kelkar SD, Zade JK. Group B rotaviruses similar to strain CAL-1, have been circulating in Western India since 1993. *Epidemiol Infect* 2004;132:745–9. doi:10.1017/S0950268804002171.
- [211] Lahon A, Maniya NH, Tambe GU, Chinchole PR, Purwar S, Jacob G, et al. Group B rotavirus infection in patients with acute gastroenteritis from India: 1994-1995 and 2004-2010. *Epidemiol Infect* 2013;141:969–75. doi:10.1017/S0950268812001537.
- [212] Nilsson M, Svenungsson B, Hedlund K-O, Uhnöo I, Lagergren Å, Akre T, et al. Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. *J Infect Dis* 2000;182:678–84. doi:10.1086/315772.
- [213] Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, et al. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1491–3. doi:10.3201/eid1708.101466.
- [214] Molinari BLD, Lorenzetti E, Otonel RAA, Alfieri AF, Alfieri AA. Species H rotavirus detected in piglets with Diarrhea, Brazil, 2012. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1019–22. doi:10.3201/eid2006.130776.
- [215] Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, Matthijssens J, et al. Widespread rotavirus H in domesticated pigs, United States. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1195–8. doi:10.3201/eid2007.140034.
- [216] Jiang S, Ji S, Tang Q, Cui X, Yang H, Kan B, et al. Molecular characterization of a novel adult diarrhoea rotavirus strain J19 isolated in China and its significance for the evolution and origin of group B rotaviruses. *J Gen Virol* 2008;89:2622–9. doi:10.1099/vir.0.2008/001933-0.
- [217] Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM. Human rotavirus studies in volunteers: Determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis* 1986;154:871–80. doi:10.1093/infdis/154.5.871.
- [218] Graham DY, Dufour GR, Estes MK. Minimal infective dose of rotavirus. *Arch Virol* 1987;92:261–71. doi:10.1007/BF01317483.
- [219] Ward RL, Knowlton DR, Pierce MJ. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *J Clin Microbiol* 1984;19:748–53.
- [220] Patel NC, Hertel PM, Estes MK, de la Morena M, Petru AM, Noroski LM, et al. Vaccine-Acquired Rotavirus in Infants with Severe Combined Immunodeficiency. *N Engl J Med* 2010;362:314–9. doi:10.1056/NEJMoa0904485.
- [221] Estes MK, Graham DY. Establishment of rotavirus persistent infection in cell culture. *Arch Virol* 1980;65:187–92. doi:10.1007/BF01317330.
- [222] Keswick BH, Pickering LK, DuPont HL, Woodward WE. Survival and detection of rotaviruses on environmental surfaces in day care centers. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:813–6.
- [223] Pickering LK, Bartlett III AV, Reves RR, Morrow A. Asymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care centers. *J Pediatr* 1988;112:361–5. doi:10.1016/S0022-3476(88)80313-5.
- [224] Dennehy PH, Cortese MM, Bégué RE, Jaeger JL, Roberts NE, Zhang R, et al. A case-control study to determine risk factors for hospitalization for rotavirus gastroenteritis in U.S. children. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:1123–31. doi:10.1097/01.inf.0000243777.01375.5b.
- [225] Hrdy DB. Epidemiology of rotaviral infection in adults. *Rev Infect Dis* 1987;9:461–9.

- [226] Gleizes O, Desselberger U, Tatochenko V, Rodrigo C, Salman N, Mezner Z, et al. Nosocomial rotavirus infection in European countries: A review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:S12–21. doi:10.1097/01.inf.0000197563.03895.91.
- [227] Iturriza Gómara M, Desselberger U, Gray J. Molecular epidemiology of rotaviruses: Genetic mechanisms associated with diversity. *Viral Gastroenteritis* 2003:317–44.
- [228] Blackhall J, Fuentes A, Magnusson G. Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology* 1996;225:181–90. doi:10.1006/viro.1996.0586.
- [229] Iturriza-Gómara M, Green J, Gray J. Methods of rotavirus detection, sero- and genotyping, sequencing, and phylogenetic analysis. *Methods Mol Med* 2000;34:189–216.
- [230] Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V, Cascio A, et al. G2 rotavirus infections in an infantile population of the South of Italy: Variability of viral strains over time. *J Med Virol* 2005;77:587–94. doi:10.1002/jmv.20496.
- [231] Simmonds MK, Armah G, Asmah R, Banerjee I, Damanka S, Esona M, et al. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *J Clin Virol* 2008;42:368–73. doi:10.1016/j.jcv.2008.02.011.
- [232] Martínez-Laso J, Román A, Rodríguez M, Cervera I, Head J, Rodríguez-Avial I, et al. Diversity of the G3 genes of human rotaviruses in isolates from Spain from 2004 to 2006: Cross-species transmission and inter-genotype recombination generates alleles. *J Gen Virol* 2009;90:935–43. doi:10.1099/vir.0.007807-0.
- [233] Ianiro G, Heylen E, Delogu R, Zeller M, Matthijssens J, Ruggeri FM, et al. Genetic diversity of G9P[8] rotavirus strains circulating in Italy in 2007 and 2010 as determined by whole genome sequencing. *Infect Genet Evol* 2013;16:426–32. doi:10.1016/j.meegid.2013.03.031.
- [234] Hemming M, Vesikari T. Genetic diversity of G1P[8] rotavirus VP7 and VP8\* antigens in Finland over a 20-year period: No evidence for selection pressure by universal mass vaccination with RotaTeq<sup>®</sup> vaccine. *Infect Genet Evol* 2013;19:51–8. doi:10.1016/j.meegid.2013.06.026.
- [235] Hemming M, Vesikari T. Detection of Rotateq<sup>®</sup> vaccine-derived double reassortant rotavirus in a 7-year-old child with acute gastroenteritis. *Pediatr Infect J* 2013.
- [236] De Grazia S, Bonura F, Colomba C, Cascio A, Di Bernardo F, Collura A, et al. Data mining from a 27-years rotavirus surveillance in Palermo, Italy. *Infect Genet Evol* 2014;28:377–84. doi:10.1016/j.meegid.2014.03.001.
- [237] Iturriza-Gómara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J. Reassortment in vivo: Driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol* 2001;75:3696–705. doi:10.1128/JVI.75.8.3696-3705.2001.
- [238] Steyer A, Poljšak-Prijatelj M, Barlič-Maganja D, Marin J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: Evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J Gen Virol* 2008;89:1690–8. doi:10.1099/vir.0.2008/001206-0.
- [239] Martella V, Bányai K, Matthijssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 2010;140:246–55. doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.028.
- [240] Matthijssens J, De Grazia S, Piessens J, Heylen E, Zeller M, Giammanco GM, et al. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Infect Genet Evol* 2011;11:1396–406. doi:10.1016/j.meegid.2011.05.007.
- [241] Mullick S, Mukherjee A, Ghosh S, Pazhani GP, Sur D, Manna B, et al. Genomic analysis of human rotavirus strains G6P[14] and G11P[25] isolated from Kolkata in 2009



- reveals interspecies transmission and complex reassortment events. *Infect Genet Evol* 2013;14:15–21. doi:10.1016/j.meegid.2012.11.010.
- [242] Soma J, Tsunemitsu H, Miyamoto T, Suzuki G, Sasaki T, Suzuki T. Whole-genome analysis of two bovine rotavirus C strains: Shintoku and Toyama. *J Gen Virol* 2013;94:128–35. doi:10.1099/vir.0.046763-0.
- [243] Cowley D, Donato CM, Roczo-Farkas S, Kirkwood CD. Novel G10P[14] rotavirus strain, Northern Territory, Australia. *Emerg Infect Dis* 2013;19:1324–7. doi:10.3201/eid1908.121653.
- [244] Pedley S, Hundley F, Chrystie I, McCrae MA, Desselberger U. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *J Gen Virol* 1984;65:1141–50. doi:10.1099/0022-1317-65-7-1141.
- [245] Desselberger U. Genome Rearrangements of Rotaviruses. *Adv. Virus Res.*, vol. 46, Elsevier; 1996, p. 69–95.
- [246] Kojima K, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. Sequence analysis of normal and rearranged NSP5 genes from human rotavirus strains isolated in nature: Implications for the occurrence of the rearrangement at the step of plus strand synthesis. *Virology* 1996;224:446–52. doi:10.1006/viro.1996.0551.
- [247] Kojima K, Taniguchi K, Kawagishi-Kobayashi M, Matsuno S, Urasawa S. Rearrangement generated in double genes, NSP1 and NSP3, of viable progenies from a human rotavirus strain. *Virus Res* 2000;67:163–71. doi:10.1016/S0168-1702(00)00139-8.
- [248] Parra GI, Bok K, Martínez M, Gomez JA. Evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. *J Gen Virol* 2004;85:1713–6. doi:10.1099/vir.0.79851-0.
- [249] Phan TG, Vo NP, Bonkougou IJO, Kapoor A, Barro N, O’Ryan M, et al. Acute diarrhea in West African children: diverse enteric viruses and a novel parvovirus genus. *J Virol* 2012;86:11024–30. doi:10.1128/JVI.01427-12.
- [250] Cao D, Barro M, Hoshino Y. Porcine rotavirus bearing an aberrant gene stemming from an intergenic recombination of the NSP2 and NSP5 genes is defective and interfering. *J Virol* 2008;82:6073–7. doi:10.1128/JVI.00121-08.
- [251] Donker NC, Boniface K, Kirkwood CD. Phylogenetic analysis of rotavirus A NSP2 gene sequences and evidence of intragenic recombination. *Infect Genet Evol* 2011;11:1602–7. doi:10.1016/j.meegid.2011.05.024.
- [252] Jere KC, Mlera L, Page NA, van Dijk AA, O’Neill HG. Whole genome analysis of multiple rotavirus strains from a single stool specimen using sequence-independent amplification and 454<sup>®</sup> pyrosequencing reveals evidence of intergenotype genome segment recombination. *Infect Genet Evol* 2011;11:2072–82. doi:10.1016/j.meegid.2011.09.023.
- [253] Steyer A, Sagadin M, Kolenc M, Poljšak-Prijatelj M. Whole genome sequence analysis of bovine G6P[11] rotavirus strain found in a child with gastroenteritis. *Infect Genet Evol* 2013;13:89–95. doi:10.1016/j.meegid.2012.09.004.
- [254] Offit PA, Shaw RD, Greenberg HB. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins vp3 and vp7. *J Virol* 1986;58:700–3.
- [255] Offit PA, Clark HF, Blavat G, Greenberg HB. Reassortant rotaviruses containing structural proteins vp3 and vp7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *J Virol* 1986;60:491–6.
- [256] Desselberger U, Huppertz H-I. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis* 2011;203:188–95. doi:10.1093/infdis/jiq031.

- [257] Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med* 1996;335:1022–8. doi:10.1056/NEJM199610033351404.
- [258] Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL, Bishop RF. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol* 1992;30:1678–84.
- [259] Coulson BS, Grimwood K, Masendycz PJ, Lund JS, Mermelstein N, Bishop RF, et al. Comparison of rotavirus immunoglobulin A coproconversion with other indices of rotavirus infection in a longitudinal study in childhood. *J Clin Microbiol* 1990;28:1367–74.
- [260] Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Perez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis* 1996;174:S65–72.
- [261] Senturia YD, Peckham CS, Cordery M, Chrystie IA, Banatvala JE, André FE. LIVE ATTENUATED ORAL ROTAVIRUS VACCINE. *The Lancet* 1987;330:1091–2. doi:10.1016/S0140-6736(87)91522-4.
- [262] Bernstein DI, Smith VE, Sander DS, Pax KA, Schiff GM, Ward RL. Evaluation of wc3 rotavirus vaccine and correlates of protection in healthy infants. *J Infect Dis* 1990;162:1055–62. doi:10.1093/infdis/162.5.1055.
- [263] Georges-Courbot MC, Monges J, Siopathis MR, Rongou JB, Gresenguet G, Bellec L, et al. Evaluation of the efficacy of a low-passage bovine rotavirus (strain WC3) vaccine in children in Central Africa. *Res Virol* 1991;142:405–11. doi:10.1016/0923-2516(91)90008-Q.
- [264] Santosham M, Moulton LH, Reid R, Croll J, Weatherholt R, Ward R, et al. Efficacy and safety of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccine in Native American populations. *J Pediatr* 1997;131:632–8. doi:10.1016/S0022-3476(97)70076-3.
- [265] Pérez-Schael I, Guntiñas MJ, Pérez M, Pagone V, Rojas AM, González R, et al. Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med* 1997;337:1181–7. doi:10.1056/NEJM199710233371701.
- [266] Joensuu J, Koskenniemi E, Pang X-L, Vesikari T. Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet* 1997;350:1205–9. doi:10.1016/S0140-6736(97)05118-0.
- [267] Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS, Nelson DB, Jumaan AO, Okoro CA, et al. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 2001;344:564–72. doi:10.1056/NEJM200102223440804.
- [268] Peter G, Myers MG. Intussusception, rotavirus, and oral vaccines: summary of a workshop. *Pediatrics* 2002;110.
- [269] Murphy BR, Morens DM, Simonsen L, Chanock RM, La Montagne JR, Kapikian AZ. Reappraisal of the association of intussusception with the licensed live rotavirus vaccine challenges initial conclusions. *J Infect Dis* 2003;187:1301–8. doi:10.1086/367895.
- [270] Murphy TV, Smith PJ, Gargiullo PM, Schwartz B. The first rotavirus vaccine and intussusception: Epidemiological studies and policy decisions. *J Infect Dis* 2003;187:1309–13. doi:10.1086/374420.
- [271] Haber P, Chen RT, Zanardi LR, Mootrey GT, English R, Braun MM. An analysis of rotavirus vaccine reports to the vaccine adverse event reporting system: more than intussusception alone? *Pediatrics* 2004;113:e353-359.
- [272] Glass RI. Perceived Threats and Real Killers. *Science* 2004;304:927. doi:10.1126/science.304.5673.927.
- [273] Bines JE. Rotavirus vaccines and intussusception risk. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:20–5.

- [274] Simonsen L, Viboud C, Elixhauser A, Taylor RJ, Kapikian AZ. More on RotaShield and intussusception: The role of age at the time of vaccination. *J Infect Dis* 2005;192:S36–43. doi:10.1086/431512.
- [275] Matson DO. RotaShield: The ill-fated Rhesus - Human reassortant rotavirus vaccine. A history of the first rotavirus vaccine and its withdrawal from the market. *Pediatr Ann* 2006;35:44–50.
- [276] Weijer C. The future of research into rotavirus vaccine: Benefits of vaccine may outweigh risks for children in developing countries. *Br Med J* 2000;321:525–6.
- [277] Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006;354:11–22. doi:10.1056/NEJMoa052434.
- [278] Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, Schuster V, Tejedor J, Cohen R, et al. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet* 2007;370:1757–63. doi:10.1016/S0140-6736(07)61744-9.
- [279] Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 2006;354:23–33. doi:10.1056/NEJMoa052664.
- [280] Buttery JP, Danchin MH, Lee KJ, Carlin JB, McIntyre PB, Elliott EJ, et al. Intussusception following rotavirus vaccine administration: Post-marketing surveillance in the National Immunization Program in Australia. *Vaccine* 2011;29:3061–6. doi:10.1016/j.vaccine.2011.01.088.
- [281] Patel MM, López-Collada VR, Bulhões MM, De Oliveira LH, Márquez AB, Flannery B, et al. Intussusception risk and health benefits of rotavirus vaccination in Mexico and Brazil. *N Engl J Med* 2011;364:2283–92. doi:10.1056/NEJMoa1012952.
- [282] Greenberg HB. Rotavirus vaccination and intussusception - Act two. *N Engl J Med* 2011;364:2354–5. doi:10.1056/NEJMe1105302.
- [283] Haber P, Patel M, Pan Y, Baggs J, Haber M, Museru O, et al. Intussusception after rotavirus vaccines reported to US VAERS, 2006-2012. *Pediatrics* 2013;131:1042–9. doi:10.1542/peds.2012-2554.
- [284] Carlin JB, Macartney KK, Lee KJ, Quinn HE, Buttery J, Lopert R, et al. Intussusception risk and disease prevention associated with rotavirus vaccines in Australia's national immunization program. *Clin Infect Dis* 2013;57:1427–34. doi:10.1093/cid/cit520.
- [285] Parashar UD, Orenstein WA. Intussusception and rotavirus vaccination-balancing risk against benefit. *Clin Infect Dis* 2013;57:1435–7. doi:10.1093/cid/cit532.
- [286] Glass RI, Parashar UD. Rotavirus vaccines - Balancing intussusception risks and health benefits. *N Engl J Med* 2014;370:568–70. doi:10.1056/NEJMe1315836.
- [287] Weintraub ES, Baggs J, Duffy J, Vellozzi C, Belongia EA, Irving S, et al. Risk of intussusception after monovalent rotavirus vaccination. *N Engl J Med* 2014;370:513–9. doi:10.1056/NEJMoa1311738.
- [288] Yih WK, Lieu TA, Kulldorff M, Martin D, McMahon-Walraven CN, Platt R, et al. Intussusception risk after rotavirus vaccination in U.S. infants. *N Engl J Med* 2014;370:503–12. doi:10.1056/NEJMoa1303164.
- [289] Armah GE, Sow SO, Breiman RF, Dallas MJ, Tapia MD, Feikin DR, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* 2010;376:606–14. doi:10.1016/S0140-6736(10)60889-6.
- [290] Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, Louw C, et al. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. *N Engl J Med* 2010;362:289–98. doi:10.1056/NEJMoa0904797.

- [291] Zaman K, Anh DD, Victor JC, Shin S, Yunus M, Dallas MJ, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* 2010;376:615–23. doi:10.1016/S0140-6736(10)60755-6.
- [292] Lopman BA, Pitzer VE, Sarkar R, Gladstone B, Patel M, Glasser J, et al. Understanding reduced rotavirus vaccine efficacy in low socio-economic settings. *PLoS ONE* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0041720.
- [293] Vlasova AN, Chattha KS, Kandasamy S, Siegismund CS, Saif LJ. Prenatally acquired vitamin A deficiency alters innate immune responses to human rotavirus in a gnotobiotic pig model. *J Immunol* 2013;190:4742–53. doi:10.4049/jimmunol.1203575.
- [294] Chattha KS, Kandasamy S, Vlasova AN, Saif LJ. Vitamin A deficiency impairs adaptive B and T cell responses to a prototype monovalent attenuated human rotavirus vaccine and virulent human rotavirus challenge in a gnotobiotic piglet model. *PLoS ONE* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0082966.
- [295] Kandasamy S, Chattha KS, Vlasova AN, Saif LJ. Prenatal vitamin A deficiency impairs adaptive immune responses to pentavalent rotavirus vaccine (RotaTeq®) in a neonatal gnotobiotic pig model. *Vaccine* 2014;32:816–24. doi:10.1016/j.vaccine.2013.12.039.
- [296] Victoria JG, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, et al. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: Detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol* 2010;84:6033–40. doi:10.1128/JVI.02690-09.
- [297] McClenahan SD, Krause PR, Uhlenhaut C. Molecular and infectivity studies of porcine circovirus in vaccines. *Vaccine* 2011;29:4745–53. doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.087.
- [298] Dubin G, Toussaint J-F, Cassart J-P, Howe B, Boyce D, Friedland L, et al. Investigation of a regulatory agency enquiry into potential porcine circovirus type 1 contamination of the human rotavirus vaccine, Rotarix™: Approach and outcome. *Hum Vaccines Immunother* 2013;9:2398–408. doi:10.4161/hv.25973.
- [299] Esona MD, Mijatovic-Rustempasic S, Yen C, Parashar UD, Gentsch JR, Bowen MD, et al. Detection of PCV-2 DNA in stool samples from infants vaccinated with RotaTeq®. *Hum Vaccines Immunother* 2014;10:2701–8. doi:10.4161/hv.26731.
- [300] Matthijnsens J, Zeller M, Heylen E, De Coster S, Vercauteren J, Braeckman T, et al. Higher proportion of G2P[4] rotaviruses in vaccinated hospitalized cases compared with unvaccinated hospitalized cases, despite high vaccine effectiveness against heterotypic G2P[4] rotaviruses. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O702–10. doi:10.1111/1469-0691.12612.
- [301] Dennehy PH. Treatment and prevention of rotavirus infection in children. *Curr Infect Dis Rep* 2013;15:242–50. doi:10.1007/s11908-013-0333-5.
- [302] Peláez-Carvajal D, Cotes-Cantillo K, Paternina-Caicedo A, Gentsch J, de la Hoz-Restrepo F, Patel M. Characterization of rotavirus genotypes before and after the introduction of a monovalent rotavirus vaccine in Colombia. *J Med Virol* 2014;86:1083–6. doi:10.1002/jmv.23899.
- [303] Donato CM, Zhang ZA, Donker NC, Kirkwood CD. Characterization of G2P[4] rotavirus strains associated with increased detection in Australian states using the RotaTeq® vaccine during the 2010-2011 surveillance period. *Infect Genet Evol* 2014;28:398–412. doi:10.1016/j.meegid.2014.05.020.
- [304] Bucardo F, Rippinger CM, Svensson L, Patton JT. Vaccine-derived NSP2 segment in rotaviruses from vaccinated children with gastroenteritis in Nicaragua. *Infect Genet Evol* 2012;12:1282–94. doi:10.1016/j.meegid.2012.03.007.
- [305] Boom JA, Sahni LC, Payne DC, Gautam R, Lyde F, Mijatovic-Rustempasic S, et al. Symptomatic infection and detection of vaccine and vaccine-reassortant rotavirus

- strains in 5 children: A case series. *J Infect Dis* 2012;206:1275–9. doi:10.1093/infdis/jis490.
- [306] Bhandari N, Rongsen-Chandola T, Bavdekar A, John J, Antony K, Taneja S. Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2014.
- [307] Koo HL, Neill FH, Estes MK, Munoz FM, Cameron A, DuPont HL, et al. Noroviruses: The most common pediatric viral enteric pathogen at a large university hospital after introduction of rotavirus vaccination. *J Pediatr Infect Dis Soc* 2013;2:57–60. doi:10.1093/jpids/pis070.
- [308] Payne DC, Boom JA, Staat MA, Edwards KM, Szilagyi PG, Klein EJ, et al. Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccines in concurrent use among US children <5 years of age, 2009–2011. *Clin Infect Dis* 2013;57:13–20. doi:10.1093/cid/cit164.
- [309] Hemming M, Räsänen S, Huhti L, Paloniemi M, Salminen M, Vesikari T. Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *Eur J Pediatr* 2013;172:739–46. doi:10.1007/s00431-013-1945-3.
- [310] Bucardo F, Reyes Y, Svensson L, Nordgren J. Predominance of norovirus and sapovirus in nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. *PLoS ONE* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0098201.
- [311] Jiang B, Wang Y, Glass RI. Does a monovalent inactivated human rotavirus vaccine induce heterotypic immunity? Evidence from animal studies. *Hum Vaccines Immunother* 2013;9:1634–7. doi:10.4161/hv.24958.
- [312] Wang J-Y, Gao C-H, Yang Y-T, Chen H-T, Zhu X-H, Lv S, et al. An outbreak of the desert sub-type of zoonotic visceral leishmaniasis in Jiashi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, People’s Republic of China. *Parasitol Int* 2010;59:331–7. doi:10.1016/j.parint.2010.04.002.
- [313] Crawford SE, Labbé M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou Y-J, Estes MK. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol* 1994;68:5945–52.
- [314] Conner ME, Zarley CD, Hu B, Parsons S, Drabinski D, Greiner S, et al. Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *J Infect Dis* 1996;174:S88–92.
- [315] O’Neal CM, Crawford SE, Estes MK, Conner ME. Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *J Virol* 1997;71:8707–17.
- [316] Ciarlet M, Crawford SE, Barone C, Bertolotti-Ciarlet A, Ramig RF, Estes MK, et al. Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity. *J Virol* 1998;72:9233–46.
- [317] Crawford SE, Estes MK, Ciarlet M, Barone C, O’Neal CM, Cohen J, et al. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *J Virol* 1999;73:4813–22.
- [318] Azevedo MP, Vlasova AN, Saif LJ. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev Vaccines* 2013;12:169–81. doi:10.1586/erv.13.3.
- [319] Herrmann JE, Chen SC, Fynan EF, Santoro JC, Greenberg HB, Wang S, et al. Protection against rotavirus infections by DNA vaccination. *J Infect Dis* 1996;174:S93–7.
- [320] Tamminen K, Lappalainen S, Huhti L, Vesikari T, Blazevic V. Trivalent Combination Vaccine Induces Broad Heterologous Immune Responses to Norovirus and Rotavirus in Mice. *PLoS ONE* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0070409.
- [321] Lappalainen S, Tamminen K, Vesikari T, Blazevic V. Comparative immunogenicity in mice of rotavirus VP6 tubular structures and virus-like particles. *Hum Vaccines Immunother* 2013;9:1991–2001. doi:10.4161/hv.25249.

- [322] Rodriguez M, Wood C, Sanchez-Lopez R, Castro-Acosta RM, Ramirez OT, Palomares LA. Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine. *Arch Virol* 2013.
- [323] Pastor AR, Rodríguez-Limas WA, Contreras MA, Esquivel E, Esquivel-Guadarrama F, Ramírez OT, et al. The assembly conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. *Vaccine* 2014;32:2874–7. doi:10.1016/j.vaccine.2014.02.018.
- [324] Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 1998;4:561–70.
- [325] Patel MM, Pitzer VE, Alonso WJ, Vera D, Lopman B, Tate J, et al. Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32:e134–47. doi:10.1097/INF.0b013e31827d3b68.
- [326] Bányai K, László B, Duque J, Steele AD, Nelson EAS, Gentsch JR, et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine* 2012;30:A122–30. doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.111.
- [327] Woods PA, Gentsch J, Gouvea V, Mata L, Santosham M, Bai ZS, et al. Distribution of serotypes of human rotavirus in different populations. *J Clin Microbiol* 1992;30:781–5.
- [328] Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: Implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1996;174:S30–6.
- [329] Dóro R, László B, Martella V, Leshem E, Gentsch J, Parashar U, et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect Genet Evol* 2014;28:446–61. doi:10.1016/j.meegid.2014.08.017.
- [330] Matthijssens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K, Rahman M, et al. Rotavirus disease and vaccination: Impact on genotype diversity. *Future Microbiol* 2009;4:1303–16. doi:10.2217/fmb.09.96.
- [331] Leite JPG, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: Characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol* 1996;141:2365–74. doi:10.1007/BF01718637.
- [332] Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Woods PA, Bresee JS, et al. Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1998: Predominance of novel P[6]G8 strains. *J Med Virol* 1999;57:308–12. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199903)57:3<308::AID-JMV15>3.0.CO;2-B.
- [333] Quaye O, McDonald S, Esona MD, Lyde FC, Mijatovic-Rustempasic S, Roy S, et al. Rotavirus G9P[4] in 3 countries in Latin America, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* 2013;19:1332. doi:10.3201/eid1908.130288.
- [334] Martinez M, Galeano ME, Akopov A, Palacios R, Russomando G, Kirkness EF, et al. Whole-genome analyses reveals the animal origin of a rotavirus G4P[6] detected in a child with severe diarrhea. *Infect Genet Evol* 2014;27:156–62. doi:10.1016/j.meegid.2014.07.020.
- [335] Degiuseppe JJ, Beltramino JC, Millán A, Stupka JA, Parra GI. Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E367–71. doi:10.1111/1469-0691.12216.
- [336] de Grazia S, Giammanco GM, Potgieter CA, Matthijssens J, Bányai K, Platia MA, et al. Unusual assortment of segments in 2 rare human rotavirus genomes. *Emerg Infect Dis* 2010;16:859–62. doi:10.3201/eid1605.091826.

- [337] Dóró R, Mihalov-Kovács E, Marton S, László B, Deák J, Jakab F, et al. Large-scale whole genome sequencing identifies country-wide spread of an emerging G9P[8] rotavirus strain in Hungary, 2012. *Infect Genet Evol* 2014;28:495–512. doi:10.1016/j.meegid.2014.09.016.
- [338] Theamboonlers A, Maiklang O, Thongmee T, Chieochansin T, Vuthitanachot V, Poovorawan Y. Complete genome analysis of a rare human G3P[9] rotavirus posing as an AU-1 like strain. *SpringerPlus* 2013;2:1–5. doi:10.1186/2193-1801-2-569.
- [339] Hwang K-P, Wu F-T, Bányai K, Wu H-S, Yang DC-F, Huang Y-C, et al. Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children. *J Med Microbiol* 2012;61:990–7. doi:10.1099/jmm.0.042499-0.
- [340] Hwang K-P, Huang Y-C, Bányai K, Wu H-S, Chang F-Y, Yang DC-F, et al. Severe gastroenteritis associated with G3P[9] rotavirus in Taiwan. *Infection* 2011;39:271–5. doi:10.1007/s15010-011-0098-4.
- [341] Mukherjee A, Ghosh S, Bagchi P, Dutta D, Chattopadhyay S, Kobayashi N, et al. Full genomic analyses of human rotavirus G4P[4], G4P[6], G9P[19] and G10P[6] strains from north-eastern India: Evidence for interspecies transmission and complex reassortment events. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1343–6. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03383.x.
- [342] Chen R, Neill JD, Noel JS, Hutson AM, Glass RI, Estes MK, et al. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol* 2004;78:6469–79. doi:10.1128/JVI.78.12.6469-6479.2004.
- [343] Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 1999;286:287–90. doi:10.1126/science.286.5438.287.
- [344] Dingle KE. Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission routes. *J Clin Microbiol* 2004;42:3950–7. doi:10.1128/JCM.42.9.3950-3957.2004.
- [345] Nilsson M, Hedlund K-O, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, Ekspong A, 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;77:13117–24. doi:10.1128/JVI.77.24.13117-13124.2003.
- [346] Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 Domain of Norovirus Capsid Affect Binding to Human Histo-Blood Group Antigens: Evidence for a Binding Pocket. *J Virol* 2003;77:12562–71. doi:10.1128/JVI.77.23.12562-12571.2003.
- [347] White LJ, Ball JM, Hardy ME, Tanaka TN, Kitamoto N, Estes MK. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *J Virol* 1996;70:6589–97.
- [348] Tan M, Huang P, Xia M, Fang P-A, Zhong W, McNeal M, et al. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *J Virol* 2011;85:753–64. doi:10.1128/JVI.01835-10.
- [349] Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, Prasad BVV, Estes MK. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J Virol* 2002;76:4044–55. doi:10.1128/JVI.76.8.4044-4055.2002.
- [350] Tan M, Hegde RS, Jiang X. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 2004;78:6233–42. doi:10.1128/JVI.78.12.6233-6242.2004.
- [351] Tan M, Fang P-A, Xia M, Chachiyo T, Jiang W, Jiang X. Terminal modifications of norovirus P domain resulted in a new type of subviral particles, the small P particles. *Virology* 2011;410:345–52. doi:10.1016/j.virol.2010.11.017.

- [352] McFadden N, Bailey D, Carrara G, Benson A, Chaudhry Y, Shortland A, et al. Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS Pathog* 2011;7. doi:10.1371/journal.ppat.1002413.
- [353] Prasad BVV, Matson DO, Smith AW. Three-dimensional structure of calicivirus. *J Mol Biol* 1994;240:256–64. doi:10.1006/jmbi.1994.1439.
- [354] Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparco-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 2000;74:6581–91. doi:10.1128/JVI.74.14.6581-6591.2000.
- [355] Sosnovtsev SV, Green KY. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* 2000;277:193–203. doi:10.1006/viro.2000.0579.
- [356] Herbert TP, Brierley I, Brown TDK. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* 1997;78:1033–40. doi:10.1099/0022-1317-78-5-1033.
- [357] 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;70:2605–10.
- [358] Liu BL, Viljoen GJ, Clarke IN, Lambden PR. Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in *E. coli*. *J Gen Virol* 1999;80:291–6. doi:10.1099/0022-1317-80-2-291.
- [359] Sosnovtseva SA, Sosnovtsev SV, Green KY. Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol* 1999;73:6626–33.
- [360] Boniotti MBE, Wirblich C, Sibia M, Meyers G, Thiel H-J, Rossi C. Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol* 1994;68:6487–95.
- [361] Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M, Green KY. In vitro proteolytic processing of the MD145 Norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol* 2003;77:10957–74. doi:10.1128/JVI.77.20.10957-10974.2003.
- [362] Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang K-O, Prikhodko VG, Thackray LB, Wobus CE, et al. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* 2006;80:7816–31. doi:10.1128/JVI.00532-06.
- [363] Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol* 2002;76:7060–72. doi:10.1128/JVI.76.14.7060-7072.2002.
- [364] Wirblich C, Thiel H-J, Meyers G. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J Virol* 1996;70:7974–83.
- [365] Oka T, Yamamoto M, Katayama K, Hansman GS, Ogawa S, Miyamura T, et al. Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *J Gen Virol* 2006;87:3329–38. doi:10.1099/vir.0.81799-0.
- [366] Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, Zhang Z, et al. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 2007;81:5949–57. doi:10.1128/JVI.00219-07.
- [367] Choi J-M, Hutson AM, Estes MK, Venkataram Prasad BV. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:9175–80. doi:10.1073/pnas.0803275105.



- [368] Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 2003;9:548–53. doi:10.1038/nm860.
- [369] Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, Atmar RL, et al. Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol* 2007;81:12238–48. doi:10.1128/JVI.01489-07.
- [370] Gerondopoulos A, Jackson T, Monaghan P, Doyle N, Roberts LO. Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- And cholesterol-dependent pathway. *J Gen Virol* 2010;91:1428–38. doi:10.1099/vir.0.016717-0.
- [371] Perry JW, Wobus CE. Endocytosis of murine norovirus 1 into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *J Virol* 2010;84:6163–76. doi:10.1128/JVI.00331-10.
- [372] Perry JW, Taube S, Wobus CE. Murine norovirus-1 entry into permissive macrophages and dendritic cells is pH-independent. *Virus Res* 2009;143:125–9. doi:10.1016/j.virusres.2009.03.002.
- [373] Shoemaker GK, Van Duijn E, Crawford SE, Uetrecht C, Baclayon M, Roos WH, et al. Norwalk virus assembly and stability monitored by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:1742–51. doi:10.1074/mcp.M900620-MCP200.
- [374] Burroughs JN, Brown F. Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J Gen Virol* 1978;41:443–6. doi:10.1099/0022-1317-41-2-443.
- [375] Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JWB, Hardy ME. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* 2003;22:2852–9. doi:10.1093/emboj/cdg251.
- [376] Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, et al. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Rep* 2005;6:968–72. doi:10.1038/sj.embor.7400510.
- [377] Gutierrez-Escolano AL, Brito ZU, Del Angel RM, Jiang X. Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol* 2000;74:8558–62. doi:10.1128/JVI.74.18.8558-8562.2000.
- [378] Kuyumcu-Martinez M, Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang K-O, Green KY, Lloyd RE. Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J Virol* 2004;78:8172–82. doi:10.1128/JVI.78.15.8172-8182.2004.
- [379] Bailey D, Kaiser WJ, Hollinshead M, Moffat K, Chaudhry Y, Wileman T, et al. Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *J Gen Virol* 2010;91:739–49. doi:10.1099/vir.0.016279-0.
- [380] Hyde JL, Sosnovtsev SV, Green KY, Wobus C, Virgin HW, Mackenzie JM. Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *J Virol* 2009;83:9709–19. doi:10.1128/JVI.00600-09.
- [381] Herbert TP, Brierley I, Brown TDK. Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J Gen Virol* 1996;77:123–7. doi:10.1099/0022-1317-77-1-123.
- [382] Neill JD, Mengeling WL. Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res* 1988;11:59–72. doi:10.1016/0168-1702(88)90067-6.
- [383] Green KY, Mory A, Fogg MH, Weisberg A, Belliot G, Wagner M, et al. Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *J Virol* 2002;76:8582–95. doi:10.1128/JVI.76.17.8582-8595.2002.

- [384] Gutiérrez-Escolano AL, Vázquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J, Hernández-Acosta J, La PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:759–66. doi:10.1016/j.bbrc.2003.10.066.
- [385] Komolafe OO, Jarrett O. A possible maturation pathway of calicivirus particles. *Microbios* 1986;46:103–11.
- [386] Kaiser WJ, Chaudhry Y, Sosnovtsev SV, Goodfellow IG. Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *J Gen Virol* 2006;87:363–8. doi:10.1099/vir.0.81456-0.
- [387] Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang K-O, Onwudiwe O, Green KY. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol* 2005;79:4012–24. doi:10.1128/JVI.79.7.4012-4024.2005.
- [388] Meyers G, Wirblich C, Thiel H-J. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* 1991;184:677–86. doi:10.1016/0042-6822(91)90437-G.
- [389] Neill JD. The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res* 2002;87:89–93. doi:10.1016/S0168-1702(02)00086-2.
- [390] Al-Molawi N, Beardmore VA, Carter MJ, Kass GEN, Roberts LO. Caspase-mediated cleavage of the feline calicivirus capsid protein. *J Gen Virol* 2003;84:1237–44. doi:10.1099/vir.0.18840-0.
- [391] Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol* 2006;80:10372–81. doi:10.1128/JVI.00809-06.
- [392] Kaufman SS, Chatterjee NK, Fuschino ME, Morse DL, Morotti RA, Magid MS, et al. Characteristics of human calicivirus enteritis in intestinal transplant recipients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:328–33. doi:10.1097/01.MPG.0000155182.54001.48.
- [393] Morotti RA, Kaufman SS, Fishbein TM, Chatterjee NK, Fuschino ME, Morse DL, et al. Calicivirus infection in pediatric small intestine transplant recipients: Pathological considerations. *Hum Pathol* 2004;35:1236–40. doi:10.1016/j.humpath.2004.06.013.
- [394] Troeger H, Loddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple H-J, Zeitz M, et al. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut* 2009;58:1070–7. doi:10.1136/gut.2008.160150.
- [395] Atmar RL, Neill FH, Le Guyader FS. Detection of human caliciviruses in fecal samples by rt-PCR. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2011;665:39–50.
- [396] Souza M, Azevedo MSP, Jung K, Cheetham S, Saif LJ. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J Virol* 2008;82:1777–86. doi:10.1128/JVI.01347-07.
- [397] Rockx BHG, Bogers WMJM, Heeney JL, Van Amerongen G, Koopmans MPG. Experimental norovirus infections in non-human primates. *J Med Virol* 2005;75:313–20. doi:10.1002/jmv.20273.
- [398] Bok K, Parra GI, Mitra T, Abente E, Shaver CK, Boon D, et al. Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:325–30. doi:10.1073/pnas.1014577107.
- [399] Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin IV HW. STAT1-dependent innate immunity to a norwalk-like virus. *Science* 2003;299:1575–8. doi:10.1126/science.1077905.
- [400] Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. Brief report. *Arch Virol* 1998;143:1215–21. doi:10.1007/s007050050369.

- [401] Otto PH, Clarke IN, Lambden PR, Salim O, Reetz J, Liebler-Tenorio EM. Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: An experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection. *J Virol* 2011;85:12013–21. doi:10.1128/JVI.05342-11.
- [402] Caul EO. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *The Lancet* 1994;343:1240–2. doi:10.1016/S0140-6736(94)92146-6.
- [403] Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1553–7. doi:10.3201/eid1410.080117.
- [404] Dolin R, Blacklow NR, Dupont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, et al. Biological Properties of Norwalk Agent of Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972;140:578–83. doi:10.3181/00379727-140-36508.
- [405] Dolin R, Blacklow NR, Dupont H, Formal S, Buscho RF, Kasel JA, et al. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis* 1971;123:307–12. doi:10.1093/infdis/123.3.307.
- [406] Steinhoff MC, Douglas Jr. RG, Greenberg HB, Callahan DR. Bismuth subalicylate therapy of viral gastroenteritis. *Gastroenterology* 1980;78:1495–9.
- [407] Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, et al. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross challenge in volunteers. *J Infect Dis* 1974;129:709–14. doi:10.1093/infdis/129.6.709.
- [408] Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberger LB, Feldman R, et al. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med* 1982;96:756–61.
- [409] Levy AG, Widerlite L, Schwartz CJ, Dolin R, Blacklow NR, Gardner JD, et al. Jejunal Adenylate Cyclase Activity in Human Subjects During Viral Gastroenteritis. *Gastroenterology* 1976;70:321–5. doi:10.1016/S0016-5085(76)80140-0.
- [410] Greenberg H, Wyatt R, Kapikian A. NORWALK VIRUS IN VOMITUS. *The Lancet* 1979;313:55. doi:10.1016/S0140-6736(79)90508-7.
- [411] Kirby A, Dove W, Ashton L, Hopkins M, Cunliffe NA. Detection of norovirus in mouthwash samples from patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol* 2010;48:285–7. doi:10.1016/j.jcv.2010.05.009.
- [412] Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. The Mucosal Lesion of the Proximal Small Intestine in Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *N Engl J Med* 1973;288:1318–23. doi:10.1056/NEJM197306212882503.
- [413] Ito S, Takeshita S, Nezu A, Aihara Y, Usuku S, Noguchi Y, et al. Norovirus-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:651–2. doi:10.1097/01.inf.0000225789.92512.6d.
- [414] Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, Yoshida A, Shiota T, Tung PG, et al. Detection, genetic characterization, and quantification of norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. *J Clin Virol* 2009;44:161–3. doi:10.1016/j.jcv.2008.11.011.
- [415] Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical Immunity in Acute Gastroenteritis Caused by Norwalk Agent. *N Engl J Med* 1977;297:86–9. doi:10.1056/NEJM197707142970204.
- [416] Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: New insights based on improved assays. *J Infect Dis* 1994;170:34–43. doi:10.1093/infdis/170.1.34.
- [417] Lindesmith LC, Beltramello M, Donaldson EF, Corti D, Swanstrom J, Debbink K, et al. Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. *PLoS Pathog* 2012;8. doi:10.1371/journal.ppat.1002705.
- [418] LoBue AD, Lindesmith L, Yount B, Harrington PR, Thompson JM, Johnston RE, et al. Multivalent norovirus vaccines induce strong mucosal and systemic blocking

- antibodies against multiple strains. *Vaccine* 2006;24:5220–34. doi:10.1016/j.vaccine.2006.03.080.
- [419] Reeck A, Kavanagh O, Estes MK, Opekun AR, Gilger MA, Graham DY, et al. Serological correlate of protection against norovirus-induced gastroenteritis. *J Infect Dis* 2010;202:1212–8. doi:10.1086/656364.
- [420] Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, et al. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk virus illness. *N Engl J Med* 2011;365:2178–87. doi:10.1056/NEJMoa1101245.
- [421] Czakó R, Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Graham DY, Estes MK. Serum hemagglutination inhibition activity correlates with protection from gastroenteritis in persons infected with norwalk virus. *Clin Vaccine Immunol* 2012;19:284–7. doi:10.1128/CVI.05592-11.
- [422] Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Estes MK. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol* 2003;108:241–7. doi:10.1016/S1521-6616(03)00120-7.
- [423] Lindesmith L, Moe C, LePendou J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. Cellular and humoral immunity following snow mountain virus challenge. *J Virol* 2005;79:2900–9. doi:10.1128/JVI.79.5.2900-2909.2005.
- [424] McCartney SA, Thackray LB, Gitlin L, Gilfillan S, Virgin IV HW, Colonna M. MDA-5 recognition of a murine norovirus. *PLoS Pathog* 2008;4. doi:10.1371/journal.ppat.1000108.
- [425] Chang K-O, Sosnovtsev SV, Belliot G, King AD, Green KY. Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology* 2006;353:463–73. doi:10.1016/j.virol.2006.06.006.
- [426] Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, Matsuzaki Y. Prolonged norovirus shedding in infants ≤6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:46–9. doi:10.1097/01.inf.0000247102.04997.e0.
- [427] *MMWR Recomm Rep* 2011;60:1–20.
- [428] Dolin R, Reichman RC, Roessner KD, Tralka TS, Schooley RT, Gary W, et al. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 1982;146:184–9. doi:10.1093/infdis/146.2.184.
- [429] Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2009;361:1776-1785+1726. doi:10.1056/NEJMra0804575.
- [430] Teunis PFM, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, et al. Norwalk virus: How infectious is it? *J Med Virol* 2008;80:1468–76. doi:10.1002/jmv.21237.
- [431] Chan MCW, Sung JY, Lam RKY, Chan PKS, Lee NLS, Lai RWM, et al. Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1278–80. doi:10.3201/eid1208.060081.
- [432] Seitz SR, Leon JS, Schwab KJ, Lyon GM, Dowd M, McDaniels M, et al. Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:6884–8. doi:10.1128/AEM.05806-11.
- [433] Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, DuPont HL, Secor SL, Bitsura JA, et al. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:261–4.
- [434] Schorn R, Höhne M, Meerbach A, Bossart W, Wüthrich RP, Schreier E, et al. Chronic norovirus infection after kidney transplantation: Molecular evidence for immune-driven viral evolution. *Clin Infect Dis* 2010;51:307–14. doi:10.1086/653939.
- [435] Wingfield T, Gallimore CI, Xerry J, Gray JJ, Klapper P, Guiver M, et al. Chronic norovirus infection in an HIV-positive patient with persistent diarrhoea: A novel cause. *J Clin Virol* 2010;49:219–22. doi:10.1016/j.jcv.2010.07.025.

- [436] Capizzi T, Makari-Judson G, Steingart R, Mertens WC. Chronic diarrhea associated with persistent norovirus excretion in patients with chronic lymphocytic leukemia: Report of two cases. *BMC Infect Dis* 2011;11. doi:10.1186/1471-2334-11-131.
- [437] Kim MJ, Kim Y-J, Lee JH, Lee JS, Kim JH, Cheon DS, et al. Norovirus: A possible cause of pneumatosis intestinalis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;52:314–8. doi:10.1097/MPG.0b013e3181ebfa01.
- [438] Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, 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. doi:10.1086/341085.
- [439] Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, Greene SA, Ferguson J, Henao OL, et al. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004-2005. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1381–8. doi:10.3201/eid1708.101533.
- [440] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011;17:7–15. doi:10.3201/eid1701.P11101.
- [441] Lopman BA, Hall AJ, Curns AT, Parashar UD. Increasing rates of gastroenteritis hospital discharges in US adults and the contribution of norovirus, 1996-2007. *Clin Infect Dis* 2011;52:466–74. doi:10.1093/cid/ciq163.
- [442] Patel MM, Widdowson M-A, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1224–31. doi:10.3201/eid1408.071114.
- [443] Stuart RL, Tan K, Mahar JE, Kirkwood CD, Ramsden CA, Andrianopoulos N, et al. An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII.3. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:644–7. doi:10.1097/INF.0b013e3181d824e1.
- [444] Van Asten L, Siebenga J, Van Den Wijngaard C, Verheij R, Van Vliet H, Kretzschmar M, et al. Unspecified gastroenteritis illness and deaths in the elderly associated with norovirus epidemics. *Epidemiology* 2011;22:336–43. doi:10.1097/EDE.0b013e31821179af.
- [445] Gustavsson L, Andersson L-M, Lindh M, Westin J. Excess mortality following community-onset norovirus enteritis in the elderly. *J Hosp Infect* 2011;79:27–31. doi:10.1016/j.jhin.2011.05.018.
- [446] Calderon-Margalit R, Sheffer R, Halperin T, Orr N, Cohen D, Shohat T. A large-scale gastroenteritis outbreak associated with Norovirus in nursing homes. *Epidemiol Infect* 2005;133:35–40. doi:10.1017/S0950268804003115.
- [447] Ruzante JM, Majowicz SE, Fazil A, Davidson VJ. Hospitalization and deaths for select enteric illnesses and associated sequelae in Canada, 2001-2004. *Epidemiol Infect* 2011;139:937–45. doi:10.1017/S0950268810001883.
- [448] Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, Hanon F-X, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9:90–6.
- [449] Widdowson M-A, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R, et al. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg Infect Dis* 2005;11:95–102.
- [450] Maunula L, Miettinen IT, Von Bonsdorff C-H. Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1716–21. doi:10.3201/eid1111.050487.
- [451] McCarthy M, Estes MK, Hyams KC. Norwalk-like virus infection in military forces: Epidemic potential, sporadic disease, and the future direction of prevention and control efforts. *J Infect Dis* 2000;181:S387–91. doi:10.1086/315582.
- [452] Bourgeois AL, Gardiner CH, Thornton SA, Batchelor RA, Burr DH, Escamilla J, et al. Etiology of acute diarrhea among United States military personnel deployed to South

- America and West Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:243–8. doi:10.4269/ajtmh.1993.48.243.
- [453] Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barrett E, et al. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis* 2000;181:S349–59. doi:10.1086/315577.
- [454] Nurminen K, Blazevic V, Huhti L, RaSaNen S, Koho T, HytoNen VP, et al. Prevalence of norovirus GII-4 antibodies in Finnish children. *J Med Virol* 2011;83:525–31. doi:10.1002/jmv.21990.
- [455] Koopmans M, Vinjé J, De Wit M, Leenen I, Van Der Poel W, Van Duynhoven Y. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *J Infect Dis* 2000;181:S262–9. doi:10.1086/315573.
- [456] De Wit MAS, Koopmans MPG, Kortbeek LM, Wannet WJB, Vinjé J, Van Leusden F, et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: Incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001;154:666–74. doi:10.1093/aje/154.7.666.
- [457] Karsten C, Baumgarte S, Friedrich AW, Von Eiff C, Becker K, Wosniok W, et al. Incidence and risk factors for community-acquired acute gastroenteritis in north-west Germany in 2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:935–43. doi:10.1007/s10096-009-0729-1.
- [458] Phillips G, Tam CC, Conti S, Rodrigues LC, Brown D, Iturriza-Gomara M, et al. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: Improved estimates using viral load for norovirus diagnosis. *Am J Epidemiol* 2010;171:1014–22. doi:10.1093/aje/kwq021.
- [459] Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort H, Peñaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol* 2011;51:121–5. doi:10.1016/j.jcv.2011.03.006.
- [460] Kroneman A, Harris J, Vennema H, Duizer E, Van Duynhoven Y, Gray J, et al. Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *J Public Health* 2008;30:82–90. doi:10.1093/pubmed/fdm080.
- [461] Zheng D-P, Widdowson M-A, Glass RI, Vinjé J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol* 2010;48:168–77. doi:10.1128/JCM.01622-09.
- [462] Bull RA, Tu ETV, Mclver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2006;44:327–33. doi:10.1128/JCM.44.2.327-333.2006.
- [463] Reuter G, Krisztalovics K, Vennema H, Koopmans M, Szucs G. Evidence of the etiological predominance of norovirus in gastroenteritis outbreaks - Emerging new-variant and recombinant noroviruses in Hungary. *J Med Virol* 2005;76:598–607. doi:10.1002/jmv.20403.
- [464] Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1079–85.
- [465] Zintz C, Bok K, Parada E, Barnes-Eley M, Berke T, Staat MA, et al. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. *Infect Genet Evol* 2005;5:281–90. doi:10.1016/j.meegid.2004.06.010.
- [466] Le Guyader FS, Bon F, DeMedici D, Parnaudeau S, Bertone A, Crudeli S, et al. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol* 2006;44:3878–82. doi:10.1128/JCM.01327-06.
- [467] Boillat Blanco N, Kuonen R, Bellini C, Manuel O, Estrade C, Mazza-Stalder J, et al. Chronic norovirus gastroenteritis in a double hematopoietic stem cell and lung

- transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 2011;13:213–5. doi:10.1111/j.1399-3062.2010.00565.x.
- [468] Florescu DF, Hermsen ED, Kwon JY, Gumeel D, Grant WJ, Mercer DF, et al. Is there a role for oral human immunoglobulin in the treatment for norovirus enteritis in immunocompromised patients? *Pediatr Transplant* 2011;15:718–21. doi:10.1111/j.1399-3046.2011.01556.x.
- [469] Roos-Weil D, Ambert-Balay K, Lanternier F, Mamzer-Bruneel M-F, Nochy D, Pothier P, et al. Impact of norovirus/sapovirus-related diarrhea in renal transplant recipients hospitalized for diarrhea. *Transplantation* 2011;92:61–9. doi:10.1097/TP.0b013e31821c9392.
- [470] O’Ryan ML, Peña A, Vergara R, Díaz J, Mamani N, Cortés H, et al. Prospective characterization of norovirus compared with rotavirus acute diarrhea episodes in Chilean children. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:855–9. doi:10.1097/INF.0b013e3181e8b346.
- [471] Armbrust S, Kramer A, Olbertz D, Zimmermann K, Fusch C. Norovirus infections in preterm infants: Wide variety of clinical courses. *BMC Res Notes* 2009;2. doi:10.1186/1756-0500-2-96.
- [472] Medici MC, Abelli LA, Dodi I, Dettori G, Chezzi C. Norovirus RNA in the blood of a child with gastroenteritis and convulsions-A case report. *J Clin Virol* 2010;48:147–9. doi:10.1016/j.jcv.2010.03.001.
- [473] Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:1548–57. doi:10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003.
- [474] Vinjé J, Vennema H, Maunula L, Von Bonsdorff C-H, Hoehne M, Schreier E, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol* 2003;41:1423–33. doi:10.1128/JCM.41.4.1423-1433.2003.
- [475] Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992;66:6527–32.
- [476] Belliot G, Noel JS, Li J-F, Seto Y, Humphrey CD, Ando T, et al. Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of “Norwalk-like viruses.” *J Clin Microbiol* 2001;39:4288–95. doi:10.1128/JCM.39.12.4288-4295.2001.
- [477] Hussey RJ, Coates L, Gill RS, Erskine PT, Coker S-F, Mitchell E, et al. A structural study of norovirus 3C protease specificity: Binding of a designed active site-directed peptide inhibitor. *Biochemistry (Mosc)* 2011;50:240–9. doi:10.1021/bi1008497.
- [478] Mata LJ, Urrutia JJ, Gordon JE. Diseases and disabilities. *Child St Maria Cauque Prospect Field Study Health Growth* 1978:254–92.
- [479] Maalouf H, Schaeffer J, Parnaudeau S, Le Pendu J, Atmar RL, Crawford SE, et al. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:3189–96. doi:10.1128/AEM.03010-10.
- [480] Jiang B, Monroe SS, Koonin EV, Stine SE, Glass RI. RNA sequence of astrovirus: Distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10539–43. doi:10.1073/pnas.90.22.10539.
- [481] Kapoor A, Li L, Victoria J, Oderinde B, Mason C, Pandey P, et al. Multiple novel astrovirus species in human stool. *J Gen Virol* 2009;90:2965–72. doi:10.1099/vir.0.014449-0.

- [482] Luo Z, Roi S, Dastor M, Gallice E, Laurin M-A, L'Homme Y. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. *Vet Microbiol* 2011;149:316–23. doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.026.
- [483] Zhu HC, Chu DKW, Liu W, Dong BQ, Zhang SY, Zhang JX, et al. Detection of diverse astroviruses from bats in China. *J Gen Virol* 2009;90:883–7. doi:10.1099/vir.0.007732-0.
- [484] Bosch A, Guix S, Krishna NK, Brown M, Davison AJ. Astroviruses. *Virus Taxon Classif Nomencl Viruses Ninth Rep Int Comm Taxon Viruses* 2012.
- [485] Strain E, Kelley LA, Schultz-Cherry S, Muse SV, Koci MD. Genomic analysis of closely related astroviruses. *J Virol* 2008;82:5099–103. doi:10.1128/JVI.01993-07.
- [486] Tang Y, Saif YM. Antigenicity of two turkey astrovirus isolates. *Avian Dis* 2004;48:896–901. doi:10.1637/7169-021904R.
- [487] Risco C, Carrascosa JL, Pedregosa AM, Humphrey CD, Sanchez-Fauquier A. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J Gen Virol* 1995;76:2075–80. doi:10.1099/0022-1317-76-8-2075.
- [488] Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Capsid protein composition of reference strains and wild isolates of human astroviruses. *Virus Res* 1997;49:49–57. doi:10.1016/S0168-1702(97)01457-3.
- [489] Sanchez-Fauquier A, Carrascosa AL, Carrascosa JL, Otero A, Glass RI, Lopez JA, et al. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology* 1994;201:312–20. doi:10.1006/viro.1994.1296.
- [490] Méndez E, Fernández-Luna T, López S, Méndez-Toss M, Arias CF. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J Virol* 2002;76:7996–8002. doi:10.1128/JVI.76.16.7996-8002.2002.
- [491] Méndez E, Salas-Ocampo E, Arias CF. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol* 2004;78:8601–8. doi:10.1128/JVI.78.16.8601-8608.2004.
- [492] Shimizu M, Shirai J, Narita M, Yamane T. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *J Clin Microbiol* 1990;28:201–6.
- [493] Kurtz JB, Lee TW. Astroviruses: human and animal. *Ciba Found Symp* 1987;128:92–107.
- [494] Matsui SM, Kim JP, Greenberg HB, Young LVM, Smith LS, Lewis TL, et al. Cloning and characterization of human astrovirus immunoreactive epitopes. *J Virol* 1993;67:1712–5.
- [495] Fu Y, Pan M, Wang X, Xu Y, Xie X, Knowles NJ, et al. Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings. *J Gen Virol* 2009;90:1104–8. doi:10.1099/vir.0.008599-0.
- [496] Geigenmuller U, Ginzton NH, Matsui SM. Construction of a genome-length cDNA clone for human astrovirus serotype 1 and synthesis of infectious RNA transcripts. *J Virol* 1997;71:1713–7.
- [497] Guix S, Caballero S, Bosch A, Pintó RM. Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. *Virology* 2005;333:124–31. doi:10.1016/j.virol.2004.12.023.
- [498] Willcocks MM, Ashton N, Kurtz JB, Cubitt WD, Carter MJ. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J Virol* 1994;68:6057–8.
- [499] Monroe SS, Stine SE, Gorelkin L, Herrmann JE, Blacklow NR, Glass RI. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *J Virol* 1991;65:641–8.



- [500] Monroe SS, Jiang B, Stine SE, Koopmans M, Glass RI. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J Virol* 1993;67:3611–4.
- [501] Willcocks MM, Carter MJ. Identification and sequence determination of the capsid protein gene of human astrovirus serotype 1. *FEMS Microbiol Lett* 1993;114:1–7. doi:10.1111/j.1574-6968.1993.tb06542.x.
- [502] Jonassen CM, Jonassen TØ, Sveen TM, Grinde B. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: Comparison with related viruses. *Virus Res* 2003;91:195–201. doi:10.1016/S0168-1702(02)00269-1.
- [503] Walter JE, Briggs J, Guerrero ML, Matson DO, Pickering LK, Ruiz-Palacios G, et al. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch Virol* 2001;146:2357–67. doi:10.1007/s007050170008.
- [504] Wolfaardt M, Kiulia NM, Mwenda JM, Taylor MB. Evidence of a recombinant wild-type human astrovirus strain from a Kenyan child with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2011;49:728–31. doi:10.1128/JCM.01093-10.
- [505] Monceyron C, Grinde B, Jonassen TØ. Molecular characterisation of the 3'-end of the astrovirus genome. *Arch Virol* 1997;142:699–706. doi:10.1007/s007050050112.
- [506] Al-Mutairy B, Walter JE, Pothen A, Mitchell DK. Genome prediction of putative genome-linked viral protein (VPg) of astroviruses. *Virus Genes* 2005;31:21–30. doi:10.1007/s11262-004-2196-1.
- [507] Tanner NK, Linder P. DExD/H box RNA helicases: From generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell* 2001;8:251–62. doi:10.1016/S1097-2765(01)00329-X.
- [508] Jonassen CM, Jonassen TØ, Saif YM, Snodgrass DR, Ushijima H, Shimizu M, et al. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J Gen Virol* 2001;82:1061–7. doi:10.1099/0022-1317-82-5-1061.
- [509] Wang Q-H, Kakizawa J, Wen L-Y, Shimizu M, Nishio O, Fang Z-Y, et al. Genetic analysis of the Capsid region of astroviruses. *J Med Virol* 2001;64:245–55. doi:10.1002/jmv.1043.
- [510] Geigenmüller U, Ginzton NH, Matsui SM. Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. *J Gen Virol* 2002;83:1691–5. doi:10.1099/0022-1317-83-7-1691.
- [511] Krishna NK. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *Viral Immunol* 2005;18:17–26. doi:10.1089/vim.2005.18.17.
- [512] Firth AE, Atkins JF. Candidates in astroviruses, seadornaviruses, cytorhabdoviruses and coronaviruses for +1 frame overlapping genes accessed by leaky scanning. *Virol J* 2010;7. doi:10.1186/1743-422X-7-17.
- [513] Brinker JP, Blacklow NR, Herrmann JE. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. *Arch Virol* 2000;145:1847–56. doi:10.1007/s007050070060.
- [514] Bass DM, Qiu S. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J Virol* 2000;74:1810–4. doi:10.1128/JVI.74.4.1810-1814.2000.
- [515] Donelli G, Superti F, Tinari A, Marziano ML. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. *J Med Virol* 1992;38:271–7. doi:10.1002/jmv.1890380408.
- [516] Baxendale W, Mebatsion T. The isolation and characterisation of astroviruses from chickens. *Avian Pathol* 2004;33:364–70. doi:10.1080/0307945042000220426.
- [517] Chaudhry Y, Nayak A, Bordeleau M-E, Tanaka J, Pelletier J, Belsham GJ, et al. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J Biol Chem* 2006;281:25315–25. doi:10.1074/jbc.M602230200.
- [518] Daughenbaugh KF, Wobus CE, Hardy ME. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virol J* 2006;3. doi:10.1186/1743-422X-3-33.

- [519] Geigenmüller U, Chew T, Ginzton N, Matsui SM. Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus. *J Virol* 2002;76:2003–8. doi:10.1128/JVI.76.4.2003-2008.2002.
- [520] Gibson CA, Chen J, Monroe SA, Denison MR. Expression and processing of nonstructural proteins of the human astroviruses. vol. 440. 1998.
- [521] Méndez E, Salas-Ocampo MPE, Munguía ME, Arias CF. Protein Products of the Open Reading Frames Encoding Nonstructural Proteins of Human Astrovirus Serotype 8. *J Virol* 2003;77:11378–84. doi:10.1128/JVI.77.21.11378-11384.2003.
- [522] Willcocks MM, Boxall AS, Carter MJ. Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. *J Gen Virol* 1999;80:2607–11. doi:10.1099/0022-1317-80-10-2607.
- [523] Brierley I, Vidakovic M. V, 2. Ribosomal frameshifting in astroviruses. vol. 9. 2003.
- [524] Banos-Lara MDR, Méndez E. Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *Virology* 2010;401:322–32. doi:10.1016/j.virol.2010.02.028.
- [525] Guix S, Bosch A, Ribes E, Martínez LD, Pintó RM. Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells. *Virology* 2004;319:249–61. doi:10.1016/j.virol.2003.10.036.
- [526] Méndez E, Aguirre-Crespo G, Zavala G, Arias CF. Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *J Virol* 2007;81:10649–58. doi:10.1128/JVI.00785-07.
- [527] Bass DM, Upadhyayula U. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *J Virol* 1997;71:8666–71.
- [528] Herrmann JE, Cubitt WD, Hudson RW, Perron-Henry DM, Oshiro LS, Blacklow NR. Immunological characterization of the Marin County strain of astrovirus. *Arch Virol* 1990;110:213–20. doi:10.1007/BF01311289.
- [529] Geigenmüller U, Méndez E, Matsui SM. V, 1. Studies on the molecular biology of human astrovirus. vol. 9. 2003.
- [530] Jang SY, Jeong WH, Kim MS, Lee YM, Lee JI, Lee GC, et al. Detection of replicating negative-sense RNAs in CaCo-2 cells infected with human astrovirus. *Arch Virol* 2010;155:1383–9. doi:10.1007/s00705-010-0718-9.
- [531] Fuentes C, Guix S, Bosch A, Pintó RM. The C-terminal nsP1a protein of human astrovirus is a phosphoprotein that interacts with the viral polymerase. *J Virol* 2011;85:4470–9. doi:10.1128/JVI.01515-10.
- [532] Guix S, Caballero S, Bosch A, Pintó RM. C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. *J Virol* 2004;78:13627–36. doi:10.1128/JVI.78.24.13627-13636.2004.
- [533] Dalton RM, Pastrana EP, Sánchez-Fauquier A. Vaccinia virus recombinant expressing an 87-kilodalton polyprotein that is sufficient to form astrovirus-like particles. *J Virol* 2003;77:9094–8. doi:10.1128/JVI.77.16.9094-9098.2003.
- [534] Caballero S, Guix S, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. Structural requirements of astrovirus virus-like particles assembled in insect cells. *J Virol* 2004;78:13285–92. doi:10.1128/JVI.78.23.13285-13292.2004.
- [535] Moser LA, Carter M, Schultz-Cherry S. Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. *J Virol* 2007;81:11937–45. doi:10.1128/JVI.00942-07.
- [536] Matsui SM, Kiang D, Ginzton N, Chew T, Geigenmüller-Gnirke U. Molecular biology of astroviruses: Selected highlights. vol. 238. 2001.
- [537] Gray EW, Angus KW, Snodgrass DR. Ultrastructure of the small intestine in astrovirus-infected lambs. *J Gen Virol* 1980;49:71–82. doi:10.1099/0022-1317-49-1-71.

- [538] Midthun K, Greenberg HB, Kurtz JB, Gary GW, Lin F-YC, Kapikian AZ. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J Clin Microbiol* 1993;31:955–62.
- [539] Abad FX, Villena C, Guix S, Caballero S, Pintó RM, Bosch A. Potential Role of Fomites in the Vehicular Transmission of Human Astroviruses. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:3904–7. doi:10.1128/AEM.67.9.3904-3907.2001.
- [540] Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J Med Virol* 1997;51:101–6. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199702)51:2<101::AID-JMV3>3.0.CO;2-B.
- [541] Sebire NJ, Malone M, Shah N, Anderson G, Gaspar HB, Cubitt WD. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *J Clin Pathol* 2004;57:1001–3. doi:10.1136/jcp.2004.017178.
- [542] Snodgrass DR, Angus KW, Gray EW, Menzies JD, Paul G. Pathogenesis of diarrhoea caused by astrovirus infections in lambs. *Arch Virol* 1979;60:217–26. doi:10.1007/BF01317493.
- [543] Woode GN, Pohlenz JF, Kelso Gourley NE, Fagerland JA. Astrovirus and breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. *J Clin Microbiol* 1984;19:623–30.
- [544] Quan P-L, Wagner TA, Briese T, Torgerson TR, Hornig M, Tashmukhamedova A, et al. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg Infect Dis* 2010;16:918–25. doi:10.3201/eid1606.091536.
- [545] Finkbeiner SR, Li Y, Ruone S, Conrardy C, Gregoricus N, Toney D, et al. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J Virol* 2009;83:10836–9. doi:10.1128/JVI.00998-09.
- [546] Smits SL, Van Leeuwen M, Van Der Eijk AA, Fraaij PLA, Escher JC, Simon JH, et al. Human astrovirus infection in a patient with new-onset celiac disease. *J Clin Microbiol* 2010;48:3416–8. doi:10.1128/JCM.01164-10.
- [547] Blomström A-L, Widén F, Hammer A-S, Belák S, Berg M. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol* 2010;48:4392–6. doi:10.1128/JCM.01040-10.
- [548] Koci MD, Moser LA, Kelley LA, Larsen D, Brown CC, Schultz-Cherry S. Astrovirus Induces Diarrhea in the Absence of Inflammation and Cell Death. *J Virol* 2003;77:11798–808. doi:10.1128/JVI.77.21.11798-11808.2003.
- [549] Bağcı S, Eis-Hübinger AM, Yassin AF, Simon A, Bartmann P, Franz AR, et al. Clinical characteristics of viral intestinal infection in preterm and term neonates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:1079–84. doi:10.1007/s10096-010-0965-4.
- [550] Bağcı S, Eis-Hübinger AM, Franz AR, Bierbaum G, Heep A, Schildgen O, et al. Detection of astrovirus in premature infants with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:347–50. doi:10.1097/INF.0b013e318162a17a.
- [551] Koci MD. Immunity and resistance to astrovirus infection. *Viral Immunol* 2005;18:11–6. doi:10.1089/vim.2005.18.11.
- [552] Bjorkholm M, Celsing F, Runarsson G, Waldenstrom J. Successful intravenous immunoglobulin therapy for severe and persistent astrovirus gastroenteritis after fludarabine treatment in a patient with Waldenstrom’s macroglobulinemia. *Int J Hematol* 1995;62:117–20.
- [553] Cubitt WD, Mitchell DK, Carter MJ, Willcocks MM, Holzel H. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *J Med Virol* 1999;57:313–21. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199903)57:3<313::AID-JMV16>3.0.CO;2-A.

- [554] Molberg O, Nilsen EM, Sollid LM, Scott H, Brandtzaeg P, Thorsby E, et al. CD4+T cells with specific reactivity against astrovirus isolated from normal human small intestine. *Gastroenterology* 1998;114:115–22. doi:10.1016/S0016-5085(98)70639-0.
- [555] Gronemus JQ, Hair PS, Crawford KB, Nyalwidhe JO, Cunnion KM, Krishna NK. Potent inhibition of the classical pathway of complement by a novel C1q-binding peptide derived from the human astrovirus coat protein. *Mol Immunol* 2010;48:305–13. doi:10.1016/j.molimm.2010.07.012.
- [556] Hair PS, Gronemus JQ, Crawford KB, Salvi VP, Cunnion KM, Thielens NM, et al. Human astrovirus coat protein binds C1q and MBL and inhibits the classical and lectin pathways of complement activation. *Mol Immunol* 2010;47:792–8. doi:10.1016/j.molimm.2009.10.006.
- [557] Cox GJ, Matsui SM, Lo RS, Hinds M, Bowden RA, Hackman RC, et al. Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: A prospective study. *Gastroenterology* 1994;107:1398–407. doi:10.1016/0016-5085(94)90542-8.
- [558] Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Lewis D, et al. Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol* 2005;43:3890–4. doi:10.1128/JCM.43.8.3890-3894.2005.
- [559] Grohmann GS, Glass RI, Pereira HG, Monroe SS, Hightower AW, Weber R, et al. Enteric Viruses and Diarrhea in HIV-Infected Patients. *N Engl J Med* 1993;329:14–20. doi:10.1056/NEJM199307013290103.
- [560] Wood DJ, David TJ, Chrystie IL, Totterdell B. Chronic enteric virus infection in two T-cell immunodeficient children. *J Med Virol* 1988;24:435–44. doi:10.1002/jmv.1890240410.
- [561] Lewis DC, Lightfoot NF, Cubitt WD, Wilson SA. Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric in-patient population. *J Hosp Infect* 1989;14:9–14. doi:10.1016/0195-6701(89)90128-X.
- [562] Oishi I, Yamazaki K, Kimoto T, Minekawa Y, Utagawa E, Yamazaki S, et al. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J Infect Dis* 1994;170:439–43. doi:10.1093/infdis/170.2.439.
- [563] Palombo EA, Bishop RF. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol* 1996;34:1750–3.
- [564] Cruz JR, Bartlett AV, Herrmann JE, Caceres P, Blacklow NR, Cano F. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J Clin Microbiol* 1992;30:1140–4.
- [565] Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, et al. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* 2002;40:133–9. doi:10.1128/JCM.40.1.133-139.2002.
- [566] Naficy AB, Rao MR, Holmes JL, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Wierzbza TF, et al. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *J Infect Dis* 2000;182:685–90. doi:10.1086/315763.
- [567] Walter JE, Mitchell DK. Astrovirus infection in children. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:247–53. doi:10.1097/00001432-200306000-00011.
- [568] Monroe SS. V, 3. Molecular epidemiology of human astroviruses. vol. 9. 2003.
- [569] Schnagl RD, Belfrage K, Farrington R, Hutchinson K, Lewis V, Erlich J, et al. Incidence of human astrovirus in Central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. *J Clin Microbiol* 2002;40:4114–20. doi:10.1128/JCM.40.11.4114-4120.2002.

- [570] Guerrero ML, Noel JS, Mitchell DK, Calva JJ, Morrow AL, Martínez J, et al. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:723–7. doi:10.1097/00006454-199808000-00012.
- [571] Méndez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, et al. Prevalence and Genetic Diversity of Human Astroviruses in Mexican Children with Symptomatic and Asymptomatic Infections. *J Clin Microbiol* 2004;42:151–7. doi:10.1128/JCM.42.1.151-157.2004.
- [572] Verma H, Chitambar SD, Gopalkrishna V. Astrovirus associated acute gastroenteritis in western India: Predominance of dual serotype strains. *Infect Genet Evol* 2010;10:575–9. doi:10.1016/j.meegid.2010.01.008.
- [573] Finkbeiner SR, Le B-M, Holtz LR, Storch GA, Wang D. Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children. *Emerg Infect Dis* 2009;15:441–4. doi:10.3201/eid1503.081213.
- [574] Finkbeiner SR, Holtz LR, Jiang Y, Rajendran P, Franz CJ, Zhao G, et al. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virology* 2009;6. doi:10.1186/1743-422X-6-161.
- [575] Aminu M, Ameh EA, Geyer A, Esona MD, Taylor MB, Steele AD. Role of astrovirus in intussusception in Nigerian infants. *J Trop Pediatr* 2009;55:192–4. doi:10.1093/tropej/fmn101.
- [576] Jakab F, Péterfai J, Verebély T, Meleg E, Bányai K, Mitchell DK, et al. Human astrovirus infection associated with childhood intussusception. *Pediatr Int* 2007;49:103–5. doi:10.1111/j.1442-200X.2007.02293.x.
- [577] Maldonado Y, Cantwell M, Old M, Hill D, De La Sanchez ML, Logan L, et al. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural mayan infants. *J Infect Dis* 1998;178:334–49.
- [578] Mitchell DK, Matson DO, Jiang X, Berke T, Monroe SS, Carter MJ, et al. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J Infect Dis* 1999;180:514–7. doi:10.1086/314863.
- [579] Mitchell DK, Van R, Morrow AL, Monroe SS, Glass RI, Pickering LK. Outbreaks of astrovirus gastroenteritis in day care centers. *J Pediatr* 1993;123:725–32. doi:10.1016/S0022-3476(05)80846-7.
- [580] Vilariño ML, Le Guyader FS, Polo D, Schaeffer J, Kröl J, Romalde JL. Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. *Int Microbiol* 2009;12:145–51. doi:10.2436/20.1501.01.92.
- [581] Le Cann P, Ranarijaona S, Monpoeho S, Le Guyader F, Ferré V. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res Microbiol* 2004;155:11–5. doi:10.1016/j.resmic.2003.09.013.
- [582] Maunula L, Kalso S, Von Bonsdorff C-H, Pönkä A. Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiol Infect* 2004;132:737–43. doi:10.1017/S0950268804002249.
- [583] Nadan S, Walter JE, Grabow WOK, Mitchell DK, Taylor MB. Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: Comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:747–53. doi:10.1128/AEM.69.2.747-753.2003.
- [584] Pusch D, Oh D-Y, Wolf S, Dumke R, Schröter-Bobsin U, Höhne M, et al. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch Virology* 2005;150:929–47. doi:10.1007/s00705-004-0467-8.
- [585] Espinosa AC, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Méndez E, Arias CF. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Res* 2008;42:2618–28. doi:10.1016/j.watres.2008.01.018.

- [586] Chu DKW, Chin AWH, Smith GJ, Chan K-H, Guan Y, Peiris JSM, et al. Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. *J Gen Virol* 2010;91:2457–62. doi:10.1099/vir.0.022764-0.
- [587] Rivera R, Nollens HH, Venn-Watson S, Gulland FMD, Wellehan JFX. Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *J Gen Virol* 2010;91:166–73. doi:10.1099/vir.0.015222-0.
- [588] Kurtz J, Lee T. Astrovirus gastroenteritis age distribution of antibody. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1978;166:227–30. doi:10.1007/BF02121154.
- [589] Noel J, Cubitt D. Identification of astrovirus serotypes from children treated at the Hospitals for Sick Children, London 1981-93. *Epidemiol Infect* 1994;113:153–9. doi:10.1017/S0950268800051578.
- [590] Koopmans MPG, Bijen MHL, Monroe SS, Vlnjé J. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in the Netherlands. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:33–7.
- [591] Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, Paez Rearte M, Nates SV. Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a public hospital in Cordoba City, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004;46:93–6. doi:10.1590/S0036-46652004000200007.
- [592] Konno T, Suzuki H, Ishida N, Chiba R, Mochizuki K, Tsunoda A. Astrovirus-Associated epidemic gastroenteritis in Japan. *J Med Virol* 1982;9:11–7. doi:10.1002/jmv.1890090103.
- [593] Caballero S, Guix S, El-Senousy WM, Calicó I, Pintó RM, Bosch A. Persistent gastroenteritis in children infected with astrovirus: Association with serotype-3 strains. *J Med Virol* 2003;71:245–50. doi:10.1002/jmv.10476.
- [594] Bright Singh P, Sreenivasan MA, Pavri KM. Viruses in acute gastroenteritis in children in Pune, India. *Epidemiol Infect* 1989;102:345–53. doi:10.1017/S0950268800030028.
- [595] Herrmann JE, Nowak NA, Perron-Henry DM, Hudson RW, Cubitt WD, Blacklow NR. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1990;161:226–9. doi:10.1093/infdis/161.2.226.
- [596] Beuret C. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 2004;115:1–8. doi:10.1016/j.jviromet.2003.09.005.
- [597] Rohayem J, Berger S, Juretzek T, Herchenröder O, Mogel M, Poppe M, et al. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods* 2004;118:49–59. doi:10.1016/j.jviromet.2004.01.016.
- [598] Sellers HS, Koci MD, Linnemann E, Kelley LA, Schultz-Cherry S. Development of a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction diagnostic test specific for turkey astrovirus and coronavirus. *Avian Dis* 2004;48:531–9.
- [599] Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods* 2003;114:37–44. doi:10.1016/j.jviromet.2003.08.009.
- [600] Brown DW, Gunning KB, Henry DM, Awdeh ZL, Brinker JP, Tzipori S, et al. A DNA oligonucleotide microarray for detecting human astrovirus serotypes. *J Virol Methods* 2008;147:86–92. doi:10.1016/j.jviromet.2007.07.028.
- [601] Schultz-Cherry S, King DJ, Koci MD. Inactivation of an astrovirus associated with poultry enteritis mortality syndrome. *Avian Dis* 2001;45:76–82.
- [602] Kurtz JB, Lee TW, Parsons AJ. The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. *J Hosp Infect* 1980;1:321–5. doi:10.1016/0195-6701(80)90008-0.
- [603] Abad FX, Pintó RM, Villena C, Gajardo R, Bosch A. Astrovirus survival in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3119–22.

- [604] Sellers H, Linneman E, Icard AH, Mundt E. A purified recombinant baculovirus expressed capsid protein of a new astrovirus provides partial protection to runting-stunting syndrome in chickens. *Vaccine* 2010;28:1253–63. doi:10.1016/j.vaccine.2009.11.016.
- [605] Bradshaw AC, Parker AL, Duffy MR, Coughlan L, van Rooijen N, Kähäri V-M, et al. Requirements for receptor engagement during infection by adenovirus complexed with blood coagulation factor X. *PLoS Pathog* 2010;6. doi:10.1371/journal.ppat.1001142.
- [606] Lion T. Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:441–62. doi:10.1128/CMR.00116-13.
- [607] Dent P, Yacoub A, Hamed HA, Park MA, Dash R, Bhutia SK, et al. The development of MDA-7/IL-24 as a cancer therapeutic. *Pharmacol Ther* 2010;128:375–84. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.08.001.
- [608] Alsaad KO, Tobar A, Belanger E, Ahmad M, Cattran DC, Herzenberg AM. Late-onset acute haemorrhagic necrotizing granulomatous adenovirus tubulointerstitial nephritis in a renal allograft. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1257–60. doi:10.1093/ndt/gfl843.
- [609] Walsh MP, Chintakuntlawar A, Robinson CM, Madisch I, Harrach B, Hudson NR, et al. Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. *PLoS ONE* 2009;4. doi:10.1371/journal.pone.0005635.
- [610] Doronin K, Shashkova EV, May SM, Hofherr SE, Barry MA. Chemical modification with high molecular weight polyethylene glycol reduces transduction of hepatocytes and increases efficacy of intravenously delivered oncolytic adenovirus. *Hum Gene Ther* 2009;20:975–88. doi:10.1089/hum.2009.028.
- [611] Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 2003;84:2895–908. doi:10.1099/vir.0.19497-0.
- [612] Hilleman MR. EPIDEMIOLOGY OF ADENOVIRUS RESPIRATORY INFECTIONS IN MILITARY RECRUIT POPULATIONS. vol. 67. 1957. doi:10.1111/j.1749-6632.1957.tb46049.x.
- [613] Khanna N, Stuehler C, Conrad B, Lurati S, Krappmann S, Einsele H, et al. Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154. *Blood* 2011;118:1121–31. doi:10.1182/blood-2010-12-322610.
- [614] Jiang H, Wang Z, Serra D, Frank MM, Amalfitano A. Recombinant adenovirus vectors activate the alternative complement pathway, leading to the binding of human complement protein C3 independent of anti-ad antibodies. *Mol Ther* 2004;10:1140–2. doi:10.1016/j.ymthe.2004.08.015.
- [615] Chang J, Zhao X, Wu X, Guo Y, Guo H, Cao J, et al. A Phase I study of KH901, a conditionally replicating granulocyte- macrophage colony-stimulating factor: Armed oncolytic adenovirus for the treatment of head and neck cancers. *Cancer Biol Ther* 2009;8:676–82. doi:10.4161/cbt.8.8.7913.
- [616] Hartline CB, Gustin KM, Wan WB, Ciesla SL, Beadle JR, Hostetler KY, et al. Ether lipid-ester prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates: Activity against adenovirus replication in vitro. *J Infect Dis* 2005;191:396–9. doi:10.1086/426831.
- [617] Chen EC, Yagi S, Kelly KR, Mendoza SP, Maninger N, Rosenthal A, et al. Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a new world monkey colony. *PLoS Pathog* 2011;7. doi:10.1371/journal.ppat.1002155.

- [618] Gooding LR, Elmore LW, Tollefson AE, Brady HA, Wold WSM. A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* 1988;53:341–6. doi:10.1016/0092-8674(88)90154-7.
- [619] Cheng C, Gall JGD, Nason M, King CR, Koup RA, Roederer M, et al. Differential specificity and immunogenicity of adenovirus type 5 neutralizing antibodies elicited by natural infection or immunization. *J Virol* 2010;84:630–8. doi:10.1128/JVI.00866-09.
- [620] Joshi A, Tang J, Kuzma M, Wagner J, Mookerjee B, Filicko J, et al. Adenovirus DNA polymerase is recognized by human CD8+T cells. *J Gen Virol* 2009;90:84–94. doi:10.1099/vir.0.002493-0.
- [621] Horwitz MS, Efrat S, Christen U, Von Herrath MG, Oldstone MBA. Adenovirus E3 MHC inhibitory genes but not TNF/Fas apoptotic inhibitory genes expressed in  $\beta$  cells prevent autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:19450–4. doi:10.1073/pnas.0910648106.
- [622] Di Paolo NC, Miao EA, Iwakura Y, Murali-Krishna K, Aderem A, Flavell RA, et al. Virus Binding to a Plasma Membrane Receptor Triggers Interleukin-1 $\alpha$ -Mediated Proinflammatory Macrophage Response In Vivo. *Immunity* 2009;31:110–21. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.015.
- [623] Garnett CT, Erdman D, Xu W, Gooding LR. Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol* 2002;76:10608–16. doi:10.1128/JVI.76.21.10608-10616.2002.
- [624] Garnett CT, Talekar G, Mahr JA, Huang W, Zhang Y, Ornelles DA, et al. Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J Virol* 2009;83:2417–28. doi:10.1128/JVI.02392-08.
- [625] Green M, Wold WSM, Mackey JK, Rigden P. Analysis of human tonsil and cancer DNAs and RNAs for DNA sequences of group C (serotypes 1, 2, 5, and 6) human adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:6606–10. doi:10.1073/pnas.76.12.6606.
- [626] Hofherr SE, Shashkova EV, Weaver EA, Khare R, Barry MA. Modification of adenoviral vectors with polyethylene glycol modulates in vivo tissue tropism and gene expression. *Mol Ther* 2008;16:1276–82. doi:10.1038/mt.2008.86.
- [627] Ginsberg HS, Lundholm-Beauchamp U, Horswood RL, Pernis B, Wold WSM, Chanock RM, et al. Role of early region 3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3823–7. doi:10.1073/pnas.86.10.3823.
- [628] Callahan SM, Wonganan P, Obenauer-Kutner LJ, Sutjipto S, Dekker JD, Croyle MA. Controlled inactivation of recombinant viruses with vitamin B2. *J Virol Methods* 2008;148:132–45. doi:10.1016/j.jviromet.2007.10.027.
- [629] Ginsberg HS, Moldawer LL, Sehgal PB, Redington M, Kilian PL, Chanock RM, et al. A mouse model for investigating the molecular pathogenesis of adenovirus pneumonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1651–5. doi:10.1073/pnas.88.5.1651.
- [630] Kajon AE, Lu X, Erdman DD, Louie J, Schnurr D, St. George K, et al. Molecular epidemiology and brief history of emerging adenovirus 14-associated respiratory disease in the United States. *J Infect Dis* 2010;202:93–103. doi:10.1086/653083.
- [631] Hutnick NA, Carnathan DG, Dubey SA, Cox KS, Kierstead L, Ratcliffe SJ, et al. Baseline Ad5 serostatus does not predict Ad5 HIV vaccine-induced expansion of adenovirus-specific CD4+ T cells. *Nat Med* 2009;15:876–8. doi:10.1038/nm.1989.
- [632] Gustafsson DJ, Segerman A, Lindman K, Mei Y-F, Wadell G. The Arg279Glu substitution in the adenovirus type 11p (Ad11p) fiber knob abolishes EDTA-resistant binding to A549 and CHO-CD46 Cells, converting the phenotype to that of Ad7p. *J Virol* 2006;80:1897–905. doi:10.1128/JVI.80.4.1897-1905.2006.



- [633] Krunic N, Merante F, Yaghoubian S, Himsworth D, Janeczko R. Advances in the diagnosis of respiratory tract infections: Role of the Luminex xTAG respiratory viral panel. vol. 1222. 2011. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.05964.x.
- [634] Brunetti-Pierri N, Ng P. Helper-dependent adenoviral vectors for liver-directed gene therapy. *Hum Mol Genet* 2011;20:R7–13. doi:10.1093/hmg/ddr143.
- [635] Churchyard GJ, Morgan C, Adams E, Hural J, Graham BS, Moodie Z, et al. A phase iia randomized clinical trial of a multiclade HIV-1 DNA prime followed by a multiclade RAD5 HIV-1 vaccine boost in healthy adults (HVTN204). *PLoS ONE* 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0021225.
- [636] Freytag SO, Stricker H, Movsas B, Kim JH. Prostate cancer gene therapy clinical trials. *Mol Ther* 2007;15:1042–52. doi:10.1038/sj.mt.6300162.
- [637] Khare R, May SM, Vetrini F, Weaver EA, Palmer D, Rosewell A, et al. Generation of a kupffer cell-evading adenovirus for systemic and liver-directed gene transfer. *Mol Ther* 2011;19:1254–62. doi:10.1038/mt.2011.71.
- [638] Jeulin H, Salmon A, Bordigoni P, Venard V. Diagnostic value of quantitative PCR for adenovirus detection in stool samples as compared with antigen detection and cell culture in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1674–80. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03488.x.
- [639] Echavarría M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:704–15. doi:10.1128/CMR.00052-07.
- [640] Wang H, Li Z-Y, Liu Y, Persson J, Beyer I, Möller T, et al. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat Med* 2011;17:96–104. doi:10.1038/nm.2270.
- [641] Marttila M, Persson D, Gustafsson D, Liszewski MK, Atkinson JP, Wadell G, et al. CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol* 2005;79:14429–36. doi:10.1128/JVI.79.22.14429-14436.2005.
- [642] Waddington SN, McVey JH, Bhella D, Parker AL, Barker K, Atoda H, et al. Adenovirus Serotype 5 Hexon Mediates Liver Gene Transfer. *Cell* 2008;132:397–409. doi:10.1016/j.cell.2008.01.016.
- [643] Lukashok S, Horwitz MS. Adenovirus persistence. *Persistent Viral Infect* 1997:147–64.
- [644] Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, Ganske I, Zabner J, Welsh MJ. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 2002;110:789–99. doi:10.1016/S0092-8674(02)00912-1.
- [645] Nilsson EC, Storm RJ, Bauer J, Johansson SMC, Lookene A, Ångström J, et al. The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis. *Nat Med* 2011;17:105–9. doi:10.1038/nm.2267.
- [646] Smith JG, Nemerow GR. Mechanism of Adenovirus Neutralization by Human  $\alpha$ -Defensins. *Cell Host Microbe* 2008;3:11–9. doi:10.1016/j.chom.2007.12.001.
- [647] Smith JG, Silvestry M, Lindert S, Lu W, Nemerow GR, Stewart PL. Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization. *PLoS Pathog* 2010;6. doi:10.1371/journal.ppat.1000959.
- [648] Feuchtinger T, Richard C, Joachim S, Scheible MH, Schumm M, Hamprecht K, et al. Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunother* 2008;31:199–206. doi:10.1097/CJI.0b013e31815ef862.
- [649] Zandvliet ML, Falkenburg JHF, van Liempt EV, Veltrop-Duits LA, Lankester AC, Kalpoe JS, et al. Combined cd8+ and cd4+ adenovirus hexon-specific T cells associated with viral clearance after stem cell transplantation as treatment for adenovirus infection. *Haematologica* 2010;95:1943–51. doi:10.3324/haematol.2010.022947.

- [650] Leen AM, Christin A, Khalil M, Weiss H, Gee AP, Brenner MK, et al. Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy. *J Virol* 2008;82:546–54. doi:10.1128/JVI.01689-07.
- [651] Aïssi-Rothe L, Decot V, Venard V, Jeulin H, Salmon A, Clement L, et al. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic t cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2010;33:414–24. doi:10.1097/CJI.0b013e3181cc263b.
- [652] Micklethwaite KP, Savoldo B, Hanley PJ, Leen AM, Demmler-Harrison GJ, Cooper LNJ, et al. Derivation of human T lymphocytes from cord blood and peripheral blood with antiviral and antileukemic specificity from a single culture as protection against infection and relapse after stem cell transplantation. *Blood* 2010;115:2695–703. doi:10.1182/blood-2009-09-242263.
- [653] Lyons A, Longfield J, Kuschner R, Straight T, Binn L, Seriwatana J, et al. A double-blind, placebo-controlled study of the safety and immunogenicity of live, oral type 4 and type 7 adenovirus vaccines in adults. *Vaccine* 2008;26:2890–8. doi:10.1016/j.vaccine.2008.03.037.
- [654] Roy S, Vandenberghe LH, Kryazhimskiy S, Grant R, Calcedo R, Yuan X, et al. Isolation and characterization of adenoviruses persistently shed from the gastrointestinal tract of non-human primates. *PLoS Pathog* 2009;5. doi:10.1371/journal.ppat.1000503.
- [655] Barouch DH, Kik SV, Weverling GJ, Dilan R, King SL, Maxfield LF, et al. International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. *Vaccine* 2011;29:5203–9. doi:10.1016/j.vaccine.2011.05.025.
- [656] Mast TC, Kierstead L, Gupta SB, Nikas AA, Kallas EG, Novitsky V, et al. International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: Correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine* 2010;28:950–7. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.145.
- [657] Sumida SM, Truitt DM, Lemckert AAC, Vogels R, Custers JHHV, Addo MM, et al. Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *J Immunol* 2005;174:7179–85. doi:10.4049/jimmunol.174.11.7179.
- [658] Pilankatta R, Chawla T, Khanna N, Swaminathan S. The prevalence of antibodies to adenovirus serotype 5 in an adult indian population and implications for adenovirus vector vaccines. *J Med Virol* 2010;82:407–14. doi:10.1002/jmv.21721.
- [659] Calcedo R, Vandenberghe LH, Roy S, Somanathan S, Wang L, Wilson JM. Host immune responses to chronic adenovirus infections in human and nonhuman primates. *J Virol* 2009;83:2623–31. doi:10.1128/JVI.02160-08.
- [660] Hutnick NA, Carnathan D, Demers K, Makedonas G, Ertl HCJ, Betts MR. Adenovirus-specific human T cells are pervasive, polyfunctional, and cross-reactive. *Vaccine* 2010;28:1932–41. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.091.
- [661] Purkayastha A, Su J, McGraw J, Ditty SE, Hadfield TL, Seto J, et al. Genomic and bioinformatics analyses of HAdV-4vac and HAdV-7vac, two human adenovirus (HAdV) strains that constituted original prophylaxis against HAdV-related acute respiratory disease, a reemerging epidemic disease. *J Clin Microbiol* 2005;43:3083–94. doi:10.1128/JCM.43.7.3083-3094.2005.
- [662] Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: Old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis* 2011;52:S284–9. doi:10.1093/cid/cir043.
- [663] Esposito DH, Gardner TJ, Schneider E, Stockman LJ, Tate JE, Panozzo CA, et al. Outbreak of pneumonia associated with emergent human adenovirus serotype 14–Southeast Alaska, 2008. *J Infect Dis* 2010;202:214–22. doi:10.1086/653498.

- [664] Tate JE, Bunning ML, Lott L, Lu X, Su J, Metzgar D, et al. Outbreak of severe respiratory disease associated with emergent human adenovirus serotype 14 at a US air force training facility in 2007. *J Infect Dis* 2009;199:1419–26. doi:10.1086/598520.
- [665] Gray GC, McCarthy T, Lebeck MG, Schnurr DP, Russell KL, Kajon AE, et al. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004-2006. *Clin Infect Dis* 2007;45:1120–31. doi:10.1086/522188.
- [666] Hensley JL, Sifri CD, Cathro HP, Lobo P, Sawyer RG, Brayman KL, et al. Adenoviral graft-nephritis: Case report and review of the literature. *Transpl Int* 2009;22:672–7. doi:10.1111/j.1432-2277.2009.00838.x.
- [667] Wold WSM, Horwitz MS. Adenoviruses. *Fields Virol* 2007:2395–436.
- [668] Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:247–62. doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00560.x.
- [669] Ison MG. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2006;43:331–9. doi:10.1086/505498.
- [670] Lindemans CA, Leen AM, Boelens JJ. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* 2010;116:5476–85. doi:10.1182/blood-2010-04-259291.
- [671] Feuchtinger T, Lang P, Handgretinger R. Adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2007;48:244–55. doi:10.1080/10428190600881157.
- [672] Gomez-Manzano C, Fueyo J. Oncolytic adenoviruses for the treatment of brain tumors. *Curr Opin Mol Ther* 2010;12:530–7.
- [673] Mahr JA, Boss JM, Gooding LR. The adenovirus E3 promoter is sensitive to activation signals in human T cells. *J Virol* 2003;77:1112–9. doi:10.1128/JVI.77.2.1112-1119.2003.
- [674] Honkaniemi E, Talekar G, Huang W, Bogdanovic G, Forestier E, Von Dohlen U, et al. Adenovirus DNA in Guthrie cards from children who develop acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Br J Cancer* 2010;102:796–8. doi:10.1038/sj.bjc.6605581.
- [675] Nevels M, Täuber B, Spruss T, Wolf H, Dobner T. “Hit-and-run” transformation by adenovirus oncogenes. *J Virol* 2001;75:3089–94. doi:10.1128/JVI.75.7.3089-3094.2001.
- [676] Nakagomi O, Cunliffe NA. Viral Gastroenteritis. *Hunt. Trop. Med. Emerg. Infect. Dis., Elsevier*; 2013, p. 275–6. doi:10.1016/B978-1-4160-4390-4.00030-8.
- [677] Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001;39:498–505. doi:10.1128/JCM.39.2.498-505.2001.
- [678] Claas ECJ, Schilham MW, De Brouwer CS, Hubacek P, Echavarria M, Lankester AC, et al. Internally controlled real-time PCR monitoring of adenovirus DNA load in serum or plasma of transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2005;43:1738–44. doi:10.1128/JCM.43.4.1738-1744.2005.
- [679] Erard V, Huang M-L, Ferrenberg J, Nguy L, Stevens-Ayers TL, Hackman RC, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of adenovirus after T cell-replete hematopoietic cell transplantation: Viral load as a marker for invasive disease. *Clin Infect Dis* 2007;45:958–65. doi:10.1086/521851.
- [680] Ganzenmueller T, Buchholz S, Harste G, Dammann E, Trenscher R, Heim A. High lethality of human adenovirus disease in adult allogeneic stem cell transplant recipients with high adenoviral blood load. *J Clin Virol* 2011;52:55–9. doi:10.1016/j.jcv.2011.06.005.
- [681] Leruez-Ville M, Minard V, Lacaille F, Buzyn A, Abachin E, Blanche S, et al. Real-Time Blood Plasma Polymerase Chain Reaction for Management of Disseminated Adenovirus Infection. *Clin Infect Dis* 2004;38:45–52. doi:10.1086/380450.

- [682] Biere B, Schweiger B. Human adenoviruses in respiratory infections: Sequencing of the hexon hypervariable region reveals high sequence variability. *J Clin Virol* 2010;47:366–71. doi:10.1016/j.jcv.2010.01.005.
- [683] Lu X, Erdman DD. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Arch Virol* 2006;151:1587–602. doi:10.1007/s00705-005-0722-7.
- [684] Madisch I, Wölfel R, Harste G, Pommer H, Heim A. Molecular identification of adenovirus sequences: A rapid scheme for early typing of human adenoviruses in diagnostic samples of immunocompetent and immunodeficient patients. *J Med Virol* 2006;78:1210–7. doi:10.1002/jmv.20683.
- [685] Balada-Llasat J-M, LaRue H, Kelly C, Rigali L, Pancholi P. Evaluation of commercial ResPlex II v2.0, MultiCode®-PLx, and xTAG® respiratory viral panels for the diagnosis of respiratory viral infections in adults. *J Clin Virol* 2011;50:42–5. doi:10.1016/j.jcv.2010.09.022.
- [686] Lenaerts L, De Clercq E, Naesens L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev Med Virol* 2008;18:357–74. doi:10.1002/rmv.589.
- [687] Hoffman JA. Adenovirus infections in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14:625–33. doi:10.1097/MOT.0b013e3283324e1b.
- [688] De Clercq E. The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates. the magic of the phosphonate bond. *Biochem Pharmacol* 2011;82:99–109. doi:10.1016/j.bcp.2011.03.027.
- [689] Hostetler KY. Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: Current state of the art. *Antiviral Res* 2009;82:A84–98. doi:10.1016/j.antiviral.2009.01.005.
- [690] Romanowski EG, Gordon YJ. Update on Antiviral Treatment of Adenoviral Ocular Infections. *Am J Ophthalmol* 2008;146:635–7. doi:10.1016/j.ajo.2008.07.030.
- [691] Toth K, Spencer JF, Dhar D, Sagartz JE, Buller RML, Painter GR, et al. Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7293–7. doi:10.1073/pnas.0800200105.
- [692] Paolino K, Sande J, Perez E, Loechelt B, Jantusch B, Painter W, et al. Eradication of disseminated adenovirus infection in a pediatric hematopoietic stem cell transplantation recipient using the novel antiviral agent CMX001. *J Clin Virol* 2011;50:167–70. doi:10.1016/j.jcv.2010.10.016.
- [693] Lankester AC, Heemskerk B, Claas ECJ, Schilham MW, Beersma MFC, Bredius RGM, et al. Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004;38:1521–5. doi:10.1086/420817.
- [694] Avivi I, Chakrabarti S, Milligan DW, Waldmann H, Hale G, Osman H, et al. Incidence and outcome of adenovirus disease in transplant recipients after reduced-intensity conditioning with alemtuzumab. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10:186–94. doi:10.1016/j.bbmt.2003.11.001.
- [695] Bruno B, Gooley T, Hackman RC, Davis C, Corey L, Boeckh M. Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: Effect of ganciclovir and impact on survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:341–52. doi:10.1016/S1083-8791(03)00102-2.
- [696] Schümann M, Dobbstein M. Adenovirus-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylation during the late phase of infection enhances viral protein levels and virus progeny. *Cancer Res* 2006;66:1282–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1484.
- [697] Jewkes J, Larson HE, Price AB, Sanderson PJ, Davies HA. Aetiology of acute diarrhoea in adults. *Gut* 1981;22:388–92. doi:10.1136/gut.22.5.388.

- [698] Loosli J, Gyr K, Stalder H, Stalder GA, Vischer W, Voegtlin J, et al. Etiology of Acute Infectious Diarrhea in a Highly Industrialized Area of Switzerland. *Gastroenterology* 1985;88:75–9. doi:10.1016/S0016-5085(85)80135-9.
- [699] Svenungsson B, Lagergren A, Ekwall E, Evengard B, Hedlund KO, Karnell A, et al. Enteropathogens in Adult Patients with Diarrhea and Healthy Control Subjects: A 1-Year Prospective Study in a Swedish Clinic for Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 2000;30:770–8. doi:10.1086/313770.
- [700] Echeverria P, Blacklow NR, Cukor GG, Vibulbandhitkit S, Changchawalit S, Boonthai P. Rotavirus as a cause of severe gastroenteritis in adults. *J Clin Microbiol* 1983;18:663–7.
- [701] Koopman JS, Monto AS. The Tecumseh Study. XV: Rotavirus infection and pathogenicity. *Am J Epidemiol* 1989;130:750–9.
- [702] Nakajima H, Nakagomi T, Kamisawa T, Sakaki N, Muramoto K, Mikami T, et al. Winter seasonality and rotavirus diarrhoea in adults. *Lancet Lond Engl* 2001;357:1950. doi:10.1016/S0140-6736(00)05086-8.
- [703] Pryor WM, Bye WA, Curran DH, Grohmann GS. Acute diarrhoea in adults: a prospective study. *Med J Aust* 1987;147:490–3.
- [704] Oyoyo BA, Subekti D, Tjaniadi P, Machpud N, Komalarini S, Setiawan B, et al. Enteropathogens associated with acute diarrhea in community and hospital patients in Jakarta, Indonesia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;34:139–46.
- [705] del Refugio González-Losa M, Polanco-Marín GG, Manzano-Cabrera L, Puerto-Solís M. Acute gastroenteritis associated with rotavirus in adults. *Arch Med Res* 2001;32:164–7.
- [706] James VLA, Lambden PR, Caul EO, Cooke SJ, Clarke IN. Seroepidemiology of human group C rotavirus in the UK. *J Med Virol* 1997;52:86–91. doi:10.1002/(SICI)1096-9071(199705)52:1<86::AID-JMV14>3.0.CO;2-Z.
- [707] Kottaridi C, Spathis AT, Ntova CK, Papaevangelou V, Karakitsos P. Evaluation of a multiplex real time reverse transcription PCR assay for the detection and quantitation of the most common human rotavirus genotypes. *J Virol Methods* 2012;180:49–53. doi:10.1016/j.jviromet.2011.12.009.
- [708] Liu J, Kabir F, Manneh J, Lertsethtakarn P, Begum S, Gratz J, et al. Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogens causing childhood diarrhoea: a multicentre study. *Lancet Infect Dis* 2014;14:716–24. doi:10.1016/S1473-3099(14)70808-4.
- [709] Ye S, Lambert SB, Grimwood K, Roczo-Farkas S, Nimmo GR, Sloots TP, et al. Comparison of Test Specificities of Commercial Antigen-Based Assays and In-House PCR Methods for Detection of Rotavirus in Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 2015;53:295–7. doi:10.1128/JCM.02251-14.
- [710] Levidiotou S, Gartzonika C, Papaentsis D, Christaki C, Priavali E, Zotos N, et al. Viral agents of acute gastroenteritis in hospitalized children in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:596–8. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02855.x.
- [711] Vantarakis A, Mellou K, Spala G, Kokkinos P, Alamanos Y. A gastroenteritis outbreak caused by noroviruses in Greece. *Int J Environ Res Public Health* 2011;8:3468–78. doi:10.3390/ijerph8083468.
- [712] Siafakas N, Zerva L, Hatzaki D, Lebessi E, Chronopoulou G, Paraskakis I, et al. Molecular epidemiology of noroviruses in children in South Greece, 2013-2015: SIAFAKAS ET AL. *J Med Virol* 2018. doi:10.1002/jmv.25251.
- [713] Dey SK, Hoq I, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H. Prevalence, seasonality, and peak age of infection of enteric adenoviruses in Japan, 1995–2009. *Epidemiol Infect* 2013;141:958–60. doi:10.1017/S0950268812001586.

- [714] Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992;37:149–57. doi:10.1002/jmv.1890370214.