

Περίληψη

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

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

Το πρώτο στέλεχος Νοροϊών το οποίο χαρακτηρίστηκε κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής απομονώθηκε από το κλινικό δείγμα Α6. Η ανίχνευση διεξήχθη αρχικά με την αντίδραση ELISA και ακολούθησε η ανίχνευση και ο μοριακός χαρακτηρισμός του εφαρμόζοντας RT-PCR και αλληλούχιση. Η μέθοδος RT-PCR που στόχευε στις συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος της GII γενετικής ομάδας, επέτρεψε τον χαρακτηρισμό του στελέχους Α6 σε μοριακό επίπεδο και την ταξινόμηση του σε γενετικό και γενοτυπικό επίπεδο.

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

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

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