دانشکده علوم پایه

گروه آموزشی زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد

ردیابی و شناسایی نورو‌ویروس در آب‌های سطحی مشهد

با استفاده از روش RT-PCR و Douplex PCR

استادان راهنما:

جناب آقای دکتر منصور مشرقی

جناب آقای دکتر سید علیرضا وکیلی

استاد مشاور:

سرکار خانم معصومه بحرینی

تحقیق و تالیف: فاطمه هاشمی

شهریور ۱۳۸۹

چکیده

هدف: آب های سطحی مشهد در معرض خطر آلودگی به نورویروس ها هستند. یکی از راه های شایع انتقال این ویروس ها انتقال از طریق آب می باشد که انتقال این ویروس ها به انسان سبب شیوع بیماری هایی مانند گاستروانتریتیس می شود.

روش کار: در این تحقیق در زمان های مختلف از آب سطحی سدهای طرق و کارده چندین بار نمونه گیری صورت گرفت. پس از فیلتراسیون و تغلیظ اولیه نمونه ها از سه کیت تجاری تجاری۱ - Trizol ۲-Tripure ۳- Bioneer برای بدست آوردن حداکثر RNA کل ویروسی استفاده شد. سپس کمیت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتراندازه گیری شد و در ادامه واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم M-MLV برای ساخت cDNA کل بر اساس روش استاندارد صورت گرفت. مقادیر cDNA تعیین و با همسان سازی غلظت آنها از واکنش زنجیره ای پلیمراز با تکثیر قطعات ۲۰۳و۵۱۴ جفت بازی از جایگاه های ژنی کپسید و RNA پلیمراز به منظور ردیابی و شناسایی نور ویروس استفاده گردید. سپس به منظور شناسایی و اثبات حضور نورووویروس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش آشیانه‌ای صورت گرفت و محصولات PCR حاصل بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد الکتروفورز گردید. آزمون حساسیت به منظور بررسی سنجش میزان حساسیت این روش با استفاده از شش سری متفاوت رقت cDNA نمونه کنترل مثبت ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰ برای کپسید و هچمین رقت های مشابه برای نمونه کنترل مثبت پلیمراز انجام شد.

نتایج و بحث: نتایج این تحقیق وجود سه نمونه آلودگی آب‌های سطحی به نورووویروس ۲ انسانی و دو نمونه آلودگی آب به نورووویروس ۱ انسانی را ثابت نمود، همچنین با نتایج آزمون حساسیت مشخص گردید که با روش های بکاربرده شده در این تحقیق تنها در رقت ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/ ۲۰ cDNA کل، برای

کپسید و۱/۵ برای پلیمراز می توان نورویروس‌ها را در آب های سطحی و سایر نمونه های آلوده ردیابی نمود.

نتیجه گیری: بطور کلی این تحقیق نشان داد که روش های مولکولی مانند RT-PCR و Douplex PCR که دراین تحقیق برای اولین بار در ایران جهت تشخیص نوروروس‌ها در آب‌های سطحی سدهای طرق و کارده بکاربرده شده است، روشی مناسب برای ردیابی این ویروس‌ها در آب های سطحی می‌باشد. از آب سدهای طرق و کارده برای تامین برخی از نیازهای آبی شهر مشهد استفاده می‌شود و از آنجا که احتمال وجود نور ویروس دراین آب ها زیاد می باشد لذا با توجه به احتمال شیوع گسترده بیماری های نورو ویروسی مسئولین ذیربط باید توجه بیشتری به حذف این نوع آلودگی ویروسی از آب های سطحی نمایند.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

مقدمه ۲

۱-۱ روش‌های انتقال ویروس بین افرادمختلف..... ۳

۱-۲ سد کارده..... ۴

۱-۳ سد طرق..... ۴

فصل دوم: کلیات

۲-۱ تعریف ویروس..... ۶

۲-۲ ماهیت ویروس..... ۶

۲-۳ اهمیت ویروس‌ها..... ۷

۲-۴ نورووویروس..... ۷

۲-۴-۱ تاریخچه نورووویروس..... ۸

۲-۴-۲ شناسایی نورووویروس‌ها..... ۹

۲-۵ ساختمان کلی ویروس‌ها..... ۱۱

۲-۵-۱اصول ساختمانی ویروس‌ها..... ۱۱

۲-۵-۲ ویروس‌های بیست وجهی یا با تقارن مکعبی..... ۱۱

۲-۵-۳ ساختمان شیمیایی کپسید ویروس ها..... ۱۲

۲-۶ ساختمان و خصوصیات نورووویروس ۱۳
۲-۶-۱ پروتئین‌های کپسیدی ۱۵
۲-۷ منشا تکاملی ویروس ها ۱۸
۲-۸ فیلوژنتیک ملکولی نورویروس ها ۱۹
۲-۹ تکثیر و همانند سازی ویروس ها ۲۱
۲-۹-۱مراحل همانندسازی ویروس ۲۱
۲-۹-۱-۱بیان ژن و همانند سازی ژنوم ۲۱
۲-۹-۱-۲ همانندسازی نورووویروس ها ۲۲
۲-۱۰ طبقه بندی ویروس ها ۲۲
۲-۱۱ نحوه انتقال ویروس ها ۲۳
۲-۱۱-۱ ویروس‌های منتقل شونده توسط آب و غذا ۲۳
۲-۱۱-۲ عوامل انتقال دهنده ۲۳
۲-۱۲ آلودگی ویروسی آب ۲۵
۲-۱۲-۱ سد کارده ۲۶
۲-۱۲-۲ سد طرق ۲۷
۲-۱۳ اپیدمیولوژی نورووویروس ۲۸
۲-۱-۱۳ ویروس های GII.4 چگونه در جمعیت های انسانی ازخود مقاومت نشان می‌دهند ۳۱
۲-۱۴ بیماری زایی نوروویریروس ۳۲
۲-۱۵ نورووویروس و میزبان ۳۳
۲-۱۵-۱ نورووویروس و گیرنده‌های آنتی ژنی خونی بافتی آن ۳۳

۱۵-۲-۲ عوامل موثر در اتصال نورو ویروس ها به سلول میزبان..... ۳۵

۱۵-۲-۳ نورووویروس و سن میزبان..... ۳۷

۲-۱۶ ایمنی به نورووویروس ۳۸

پیشگیری و کنترل ۳۸

۲-۱۷ واکسن ۳۹

۲-۱۸درمان..... ۴۰

۲-۱۹ مقاومت نورووویروس به شرایط محیطی..... ۴۰

۲-۲۰ روش های تعیین و شناسایی ویروس‌ها..... ۴۰

۲-۲۰-۱ روش های سرم شناختی..... ۴۱

۲-۲۰-۲ روش کشت سلول..... ۴۲

۲-۲۰-۳ روش های مولکولی ۴۲

۲-۲۱ تشخیص نورووویروس ۴۳

۲-۲۲ مزایا و معایب روشهای مولکولی در شناسایی نورو ویروس ها ۴۴

۲-۲۳ روش جداسازی نورووویروس ها از آب ۴۵

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱ سانتریفیوژو جداسازی اجزاء درشت موجود در فاضلاب:..... ۴۸

۳-۲ استخراج RNA از نمونه فاضلاب ۴۸

۳-۲-۱ مراحل استخراج RNA با کیت تجاری Trizol ۴۸

۳-۲-۲ مراحل استخراج RNA با کیت تجاری Tripure ۴۹

۳-۳-۳ مراحل استخراج RNA با کیت تجاری ioneer: ۴۹
۳-۴ کمیت سنجی RNA استخراج شده بادستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتری ۵۰
۳-۵ واکنش سنتز cDNA و تبدیل RNA به cDNA ۵۱
۵-۱ طراحی پرایمر ۵۱
۵-۲ مراحل انجام نسخه برداری معکوس ۵۱
۳-۶ واکنش PCR ۵۲
۳-۶-۱ واکنش PCR با پرایمر کپسید(SRI) ۵۲
۳-۶-۲ واکنش PCR به روش آشیانه‌ای (Semi-nested PCR) ۵۳
۳-۶-۳ واکنش PCR به روش آشیانه‌ای (semi-nested PCR) با پرایمر کپسید(SRI) ۵۳
۳-۶-۴ Douplex PCR ۵۳
۳-۶-۵ انجام Douplex PCR پرایمرهای کپسید(SRI): ۵۴
۳-۶-۶ مراحل انجام واکنش PCR با پرایمر RNA پلیمراز(SRII) ۵۴
۳-۶-۷ Douplex PCR از محصول Touch up PCR فوق با برنامه زیر ۵۵
۳-۷ بررسی محصول PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۵۶
۳-۸ تعیین توالی DNA برای نمونه‌های فاضلاب ۵۶
۳-۹ تست حساسیت ۵۷
۳-۱۰ آزمایش نمونه‌های آب سد طرق و سد کارده ۵۷
۳-۱۰-۱ آماده کردن وسایل نمونه برداری و استریل کردن ظرف ها ۵۷
۳-۱۰-۲ نمونه برداری از آب سد طرق و سد کارده ۵۷
۳-۱۰-۳ تغلیظ اولیه ۶۰

۳-۱۰-۴ تغلیظ ثانویه ۶۱

فصل چهارم: نتایج

۴-۱ نتایج کمیت سنجی RNA استخراج شده از نمونه فاضلاب ۶۵

۴-۲ واکنش سنتز cDNA وسنتز cDNA از RNA استخراج شده ۶۷

۴-۳ واکنش PCR نمونه فاضلاب ۶۷

۴-۳-۱ تکثیر ژن کپسید نورووویروس با استفاده از نمونه فاضلاب ۶۷

۴-۳-۲ واکنش PCR به روش آشیانه‌ای(semi-nested PCR) با استفاده از نمونه فاضلاب ۶۸

۴-۳-۳ واکنش Douplex PCR برای تکثیر ژن کپسید نورووویروس با استفاده از نمونه فاضلاب ۷۰

۴-۳-۴ تکثیر ژن پلیمراز نورووویروس با استفاده از نمونه فاضلاب..... ۷۱

۴-۳-۵ واکنش Douplex PCR برای تکثیر ژن پلیمراز نورووویروس با استفاده از نمونه فاضلاب ۷۰

۴-۴ آزمون حساسیت واکنش PCR برای ژن پلیمراز با استفاده از نمونه فاضلاب ۷۳

۴-۵ نتایج حاصل از بلاست کردن توالی محصولات PCR..... ۷۵

۴-۶ کمیت سنجی RNA استخراج شده از نمونه‌های آب سطحی..... ۸۲

۴-۷ واکنش PCR برای شناسایی نورووویروس GIو GII در نمونه‌های آب سطحی ۸۳

۴-۷-۱ الکتروفورز محصول واکنش Douplex PCR برای شناسایی نورووویروس GI در نمونه‌های آب سطحی..... ۸۳

۴-۷-۲ الکتروفورز محصول واکنش PCR برای شناسایی نورووویروس GII در نمونه‌های آب سطحی.. ۸۴

فصل پنجم: بحث

۵-۱ شناسایی نوروویروس ۸۵
۵-۲ نمونه برداری از فاضلاب برای تهیه کنترل مثبت ۸۸
۵-۳ استخراج RNA ۸۸
۵-۴ سنتز cDNA و واکنش PCR ۹۱
۵-۵ نمونه برداری از آب سد طرق و سد کارده ۹۵

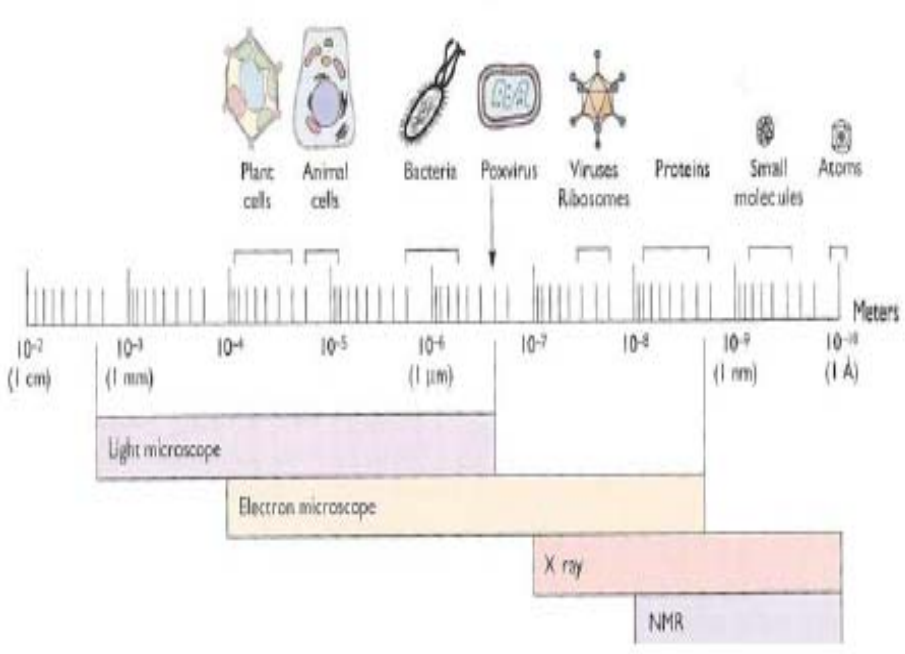
منابع وضمائم

فصل اول:

مقدمه

مقدمه

ویروس‌ها میکرو ارگانیسم های بسیار کوچکی هستند که برای تکثیر به موجود زنده دیگری نیاز مندند. بدلیل فقدان آنزیم های لازم برای متابولیسم (آنزیم‌های لازم برای سنتز پروتیین ها، اسیدهای نوکلئیک و تولیدانرژی) ویروس‌ها برای تکثیر از امکانات متابولیکی سلول میزبان استفاده می‌کنند. هر ذره ویروسی در خارج از بدن میزبان به حالت خنثی بوده اما هنگامی که وارد سلول میزبان می‌شود اسیدهای نوکلئیک آن فعال گشته و طی واکنش هایی منجر به تکثیر ویروس می‌شود. معمولا بسیاری از ویروس‌ها میزبان اختصاصی داشته که شامل انسان یا حیوان می‌باشد و در یک نوع طبقه بندی ویروس‌ها را بر اساس نوع میزبان به ویروس‌های حیوانی،انسانی و گیاهی تقسیم می‌کنند. ویروس‌ها می‌توانند میزبان‌های دیگری مثل باکتریها نیز داشته باشند که به آنها باکتریوفاژ گفته می‌شود (Morris., 1972).



شکل۱-۱:مقایسه اندازه ویروس‌ها با چند میکروارگانیسم (Flint et al., 2000)

ویروس ها از جنبه‌های مختلف اهمیت دارند. اهمیت آنها از نظر پزشکی این است که بسیاری از عفونت هایی که بشر را درگیر و تهدید می‌کند منشاء ویروسی دارند و درپاره‌ای از اوقات باعث مرگ می‌شوند. برخی ازویروس‌ها بعد از ورود به بدن میزبان می‌توانند در محل ورود تکثیر شوند و تولید بیماری کنند، مثل بیماری‌های دستگاه تنفسی(آنفولانزا) و گوارشی(روتا ویروس ها). غالب ویروس‌ها پس از ورود به محلی، به محل خاص دیگری که بافت یا عضو ویژه‌ای است، تمایل داشته و در آنجا تکثیر می‌یابند (Cann., 2005).

۱-۱ روش‌های انتقال ویروس بین افرادمختلف

انتقال ویروس بین افراد متفاوت ممکن است بر اثرذرات پراکنده شده در محیط که ناشی از سرفه یاعطسه فرد آلود هستند، محصولات و فرآورده‌های خونی آلوده، تماس جنسی با فردآلوده، تماس با حیوانات ناقل ویروس و یا انتقال از طریق ناقلینی مانند پشه، کنه صورت گیرد. امروزه مشخص شده است که علاوه بر راه های فوق آب و مواد غذایی نیز می‌توانند از اصلی ترین راه‌های انتقال بعضی از ویروس‌ها باشند و این امر دانشمندان را بر آن داشته تا تحقیقات وسیعی بر روی ویروس‌ها که آلوده کننده آب و مواد غذایی می باشند، انجام دهند(Koopmans and Duizer., 2004). در بین ویروس‌های آلوده کننده آب و مواد غذایی، ویروس هایی که سلول‌های روده را آلوده می کنند از اهمیت زیادی برخوردار هستند. این ویروس‌ها پس از آلوده کردن سلول‌های روده تکثیر می‌شوند و سپس از طریق مدفوع یا استفراغ فردآلوده به محیط اطراف پخش می‌شوند(Koopmans & Duizer., 2004; Blackwell et al., 1985).

ویروس هایی که از طریق خوراکی و یا آب و مواد غذایی انتقال می‌یابند بر اساس نوع بیماری که ایجاد می‌کنند به سه گروه اصلی که گروه اول و دوم مهم ترهستند تقسیم می‌شوند:

۱- ویروس هایی که عامل عفونت‌های روده‌ای هستند

۲- ویروس‌های هپاتیت که انتقال روده‌ای دارند

۳ - ویروس هایی که در روده تکثیر یافته و در صورت مهاجرت به بافت‌های دیگر باعث ایجاد بیماری می گردند.

در میان ویروس هایی که از طریق آب و غذا منتقل می شوند نورووویروس یکی از مهم ترین عوامل ایجاد کننده عفونت معده و روده می‌باشد(Koopmans et al., 2002).

نورووویروس‌ها از علل عمده اپیدمی‌های غیرباکتریایی معده و روده در سراسر جهان هستند و تقریباعلت نیمی ازشیوع عفونت‌های روده و معده شناسایی شده اند(Atmar et al., 2001).

از آنجا که یکی از مهم ترین راه‌های انتقال ویروس‌های مولد عفونت روده‌ای آب می‌باشد بررسی آلودگی میکروبی آب اهمیت ویژه‌ای می یابد.

یکی از مهم ترین منابع آبی مشهد آب های سطحی هستند بخشی از نیازهای آب شهر مشهد(حدود ۲۳ میلیون مترمکعب) از دو منبع آب سطحی که رودخانه های سد طرق و کارده هستند تامین می‌شود.

۱-۲ سد کارده

این سد بر روی رودخانه کارده و در ۷۰ کیلومتری شمال مشهد ساخته شده است . هدف از احداث این سد فراهم کردن آب برای کشت زمین های کشاورزی و و استفاده از آن در شرب می‌باشد.

۱-۳ سد طرق

این سد بر روی رودخانه طرق و در ۲۵ کیلومتری جنوب شرق شهر مشهد ساخته شده است . هدف از احداث این سد ، ذخیره آب برای اراضی کشاورزی موجود در پایین دست سد و استفاده از آن در شرب می‌باشد.

در این بررسی از روش‌های مولکولی برای شناسایی و ردیابی نورووویروس‌ها بعنوان یکی از عوامل آلوده کننده ویروسی در آب‌های سطحی سد طرق و کارده مشهد استفاده می‌شود.

فصل دوم:

کلیات

۲-۱ تعریف ویروس

تعریف بیان شده از ویروس و ماهیت آن طی گذشت سال‌ها تغییرات زیادی یافته است. در روم باستان، واژه ویروس به معنی زهر به کار می‌رفت. در قرن نوزدهم، ویروس به میکروپاتوژن ها(موجودات میکروسکوپی بیماری زا) گفته می‌شد،اما از آغاز قرن حاضر ویروس به گروهی از موجودات بیماری زا که انگل اجباری درون سلولی هستند اطلاق می شود.

Luira در سال ۱۹۵۳ ویروس را بدین گونه تعریف کرده است: «موجودات بسیار ریز، غیر قابل رؤیت با میکروسکوپ معمولی که وارد یاخته زنده می‌شوند و در آن تکثیر می‌یابند.» به طور کلی خصوصیت بارز ویروس‌ها این است که انگل اجباری درون یاخته‌ای اند و قادر به تکثیر در خارج از محیط یاخته نیستند (Fenner., 1968).

۲-۲ ماهیت ویروس:

پاسخ این سوال که آیا ویروس‌ها جاندارند یا بی جان؛ بستگی به معیارهایی دارد که در تعریف حیات به کار می‌بریم. یک ذره ویروسی را به تنهایی نمی توان یک جاندار به حساب آورد ولی اگر همین ویروس وارد سلول مناسبی شود قادر به همانندسازی، جهش و نوترکیبی خواهد بود که همگی این خصوصیات نشان دهنده حیات اند (Schaechter et al., 1989).

بنا به عقیده Luira و Darnell در سال ۱۹۶۷، ماده‌ای زنده است که پس از جدا شدن از سلول شکل و حالت خاص خود را حفظ کرده و با ورود مجدد به سلول دیگر قادر به ادامه چرخه ژنتیکی خود باشد. بنا بر این نظر ویروس‌ها را می‌توان از سلول جدا کرد و بدون اینکه تغییر حالت دهند به سلول دیگر وارد ساخت و تکثیر آنها رامورد بررسی قرار دادبنا براین ویروس ها را می‌توان زنده دانست.

۲-۳ اهمیت ویروس‌ها

ویروس‌ها از جنبه‌های مختلف اهمیت دارند. اهمیت آنها از نظر پزشکی این است که بسیاری از عفونت هایی که بشر را درگیر و تهدید می‌کند عامل ویروسی دارند، گروهی ازویروس‌ها باعث مرگ می‌شوند، مانند هاری، ایدز، آبله، ابولا، کریمه ـ کنگو، هپاتیت B، انسفالیت‌ها و ... گروهی عامل ایجاد ناراحتی‌های حاد ومسری بوده که در برخی موارد شیوع ناگهانی و سریع این بیماری‌ها زیان‌های اقتصادی و جانی زیادی به کشورها وارد می‌سازد، چون آنفلوانزا، سرماخوردگی، سرخک، سرخجه، اوریون، هرپس ها... دسته‌ای باعث اختلالات جنینی می‌شوند مانند سرخجه، سیتومگالو ویروس و تعدادی از ویروس ها در ایجاد سرطان نقش دارند مثل پاپوواویروس و هپاتیتB، و یا مولد بیماریهای ماندگار مانند آنسفالیت‌ها و فلج اطفال می‌باشند. همچنین ویروس ها از نظر تحقیقات بیولوژیک به عنوان حاملین مواد مختلف برای انتقال به بدن مورد توجه هستند(Cann., 2005).

۲-٤ نورووویروس

نورووویروس اولین ویروس ایجاد کننده عفونت معده و روده در انسان شناخته شد. اما شناخت اهمیت آن به عنوان یک عامل بیماری زا به علت فقدان روش‌های تشخیص مناسب، حساس و قابل دسترس برای همه محدود مانده است. پیشرفت‌های اخیر در فهم بیولوژی مولکولی نورووویروس‌ها و افزایش نیاز به دست یابی به روش‌های مناسب برای شناسایی این ویروس‌ها اهمیت تحقیقات در رابطه با این ویروس را افزایش داده است. امروزه نورووویروس‌ها یکی از عوامل مهم اپیدمی‌های عفونت روده‌ای در بزرگسالان و کودکان می‌باشند. اگرچه عفونت روده‌ای ایجاد شده بر اثر نورووویروس کشنده نبوده و کوتاه مدت به نظر می‌رسد، شواهد اخیر گویای آن است که بیماری می‌تواند شدید شده و گاهی اوقات در جمعیت‌های آسیب پذیر (افراد مسن و کودکان) کشنده باشد. آمارهای بدست آمده از موارد بستری در بیمارستان‌ها و مراکز بهداشت و درمان نشان می‌دهد که عفونت نورووویروسی از شایع ترین عفونت های روده‌ای ، می‌باشد. اما با این حال

هنوز روش‌های شناسایی مناسب برای نورویروس قابل دسترس برای همه کلینیک‌ها نمی باشد. مطالعات اپیدمیولوژی نشان می‌دهد که سروتیپ‌های متنوع نورویروس انتقال سریع منطقه‌ای داشته و پراکندگی آنها در سراسر جهان صورت می‌گیرد که این امر بی شباهت به الگوی انتشار آنفولانزا نمی باشد.کنترل شیوع این ویروس نیازمند بحث و گفتگو و تحقیقات بیشتری است، لذا محققین را بر آن داشته تا تحقیقات خود را به سمت کار بر جنبه‌های متفاوت نورویروس‌ها سوق دهند(Roger et al., 2009).

۲-٤-۱ تاریخچه نورویروس

نورویروس‌ها بیش از ۷۵ سال است که به عنوان یکی از علل شیوع عفونت روده ای غیرباکتریایی در نظر گرفته شده اند.در سال ۱۹۲۹ Zahorsky نام این بیماری را به دلیل افزایش شیوع این بیماری درطول ماه‌های زمستان بیماری استفراغ زمستان پیشنهاد کرد(Zahorsky et al., 1929).

در سال ۱۹۴۰ Gordon و همکاران نمونه مدفوع بیمارانی که که دچار عفونت روده‌ای غیر باکتریایی بودند را جمع آوری کرده و دریافتند که عامل آلودگی می‌تواند از طریق انسان منتقل شود (Gordon et al., 1947)

تلاش برای شناسایی عامل بیماری زای ویروسی پس از کشت در تخم مرغ و جنین مرغ با شکست مواجه شد. در سال ۱۹۶۸ یکی از مراکز کنترل و پیشگیری بیماری گزارش داد که در یکی از مدرسه‌های ابتدایی در نورواک بیماری استفراغ زمستانی شیوع پیدا کرده است و درحدود پنجاه درصد از دانش آموزان و معلمان به این بیماری مبتلا شده و تقریبا یک سوم آنها از طریق تماس باخانواده و یاافراد مریض دیگر آلوده شده بودند. تلاش‌های اولیه برای شناسایی عامل موثر در ایجاد بیماری با شکست مواجه شد، اما مدفوع افراد بیماری که جمع آوری شده بود در موسسه ملی سلامت برای مطالعات تجربی مورد استفاده قرار گرفت (Dolin et al., 1971).

در اواخر سال ۱۹۶۸، Kapikan و دیگر همکارانش، موفق به کشف علت اصلی این بیماری شدند. آنها در سال ۱۹۶۸ از طریق آزمایش ایمنوالکترون میکروسکوپی مایع تصفیه شده مدفوع گروهی از دانش آموزان یک مدرسه ابتدائی که همگی مبتلا به التهاب معده و روده بودند، دریافتند که نورو ویروس، عامل اصلی بیماری بوده است. تا سال ۱۹۹۰، اپیدمیولوژی، ساختار ژنومی وبیماری زایی آن ناشناخته باقی مانده بود تا اینکه Jiang توالی از ژنوم نورووویروسی راکلون کرد(Jiang., 1992).

۲-٤-۲ شناسایی نورووویروس ها:

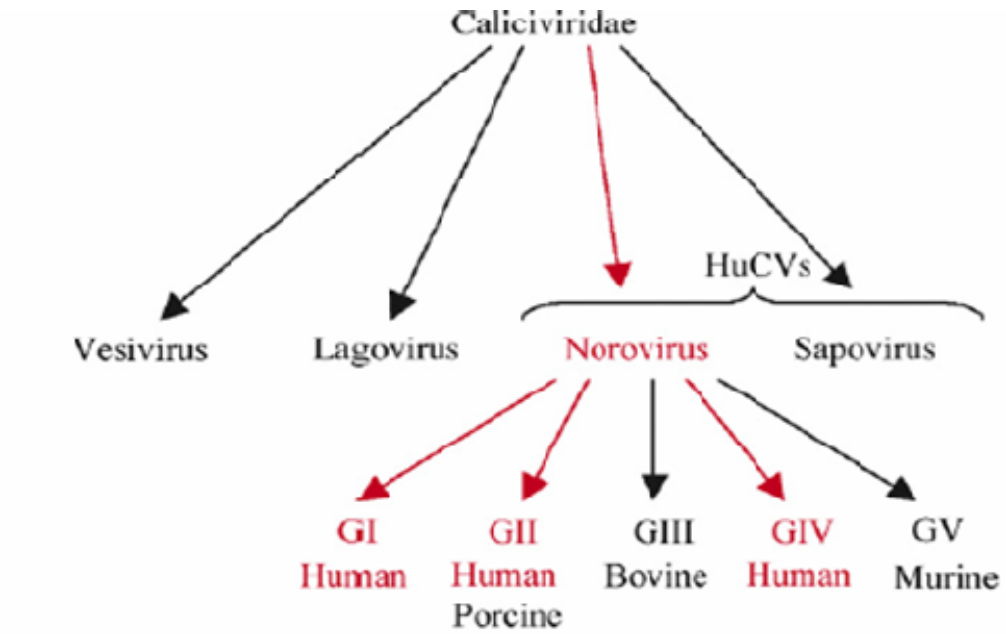
قبل از ۱۹۹۳ نورووویروس‌ها با کمک میکروسکوپ الکترونی در نمونه‌های مدفوع مشاهده شدند و به علت شباهت ظاهری با ویروس نورواک نام ویروس شبه نورواک به آنها داده شد و بر اساس منطقه‌ای که در آن مشاهده می‌گردیدند نامگذاری می‌شدند. برای مثال: نورووواک هاوایی. پس از تعیین توالی ژنوم نورووویروس، مشخص شد که ژنوم این ویروس یک RNA تک رشته‌ای مثبت با اندازه‌ای در حدود ۷/۷ کیلو باز داشته و در یک پوشش پروتئینی فنجان مانند محصور شده و فاقد پوشش لیپیدی میباشد. بدین ترتیب این ویروس به عنوان یک جنس جدید در خانواده کلیسی ویریده به نام نورووویروس شناخته شد. (نام کلیسی ویریده از کلمه کالیکی که به زبان یونانی به معنای فنجان می‌باشد مشتق شده است). کلیسی ویروس ها دارای ژنوم تک رشته مثبت از جنس RNA بوده و همانطور که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است شامل چهار زیرگروه هستند: Norovirus، Sapovirus، Lagovirus، Vesivirus . که از این میان Norovirus، Sapovirus قادر به آلوده کردن انسان می‌باشد. تنوع میان نورووویروس‌ها زیاد بوده و به طور کلی به پنج گروه ژنی تقسیم می‌شوند(Pendu et al., 2006) .

از میان نورووویروس ها، نورووویروس‌های انسانی بر اساس توالی ژنومی به ۳ Genogroup دسته بندی شدند:GI,GII,GIV وهر دسته خود شامل طبقه بندی ریز تر و درونی تر می شود مثلا در دستهGI حداقل

۲۵ ژنوتایپ و تعداد زیادی زیرگروه با پروتایپ‌های متفاوت قرار گرفته و به صورت GI.I نوشته می شوند که نشان می‌دهد ویروس مورد نظر در Genogroup 1 و Genotype 1 قرار دارد.

ژنوتایپ های دیگری که قبلا بر اساس محلی که اولین بار در آن یافت شده و نامگذاری شده بودند همه بر اساس توالی ژنتیکی طبقه بندی می شوند. این تنوع وسیع ژنوتایپ ها ی نورووویروس به دلیل جهش‌های نقطه‌ای فراوان وابسته به خطاهای همانند سازی و نیز نوترکیبی بین ویروس‌های خویشاوند می‌باشد (Nayak et al., 2009; Bullra et al., 2007).

علی رغم این تنوع وسیع در میان نورووویروس‌ها تحقیقات نشان می دهد، علت بسیاری از اپیدمی‌های گاستروانتریتیس شایع در سال‌های اخیر چندین سروتیپ محدود مرتبط با گروه ژنی ۲ و ژنوتایپ ۴ می باشد. با این حال بعضی از سروتیپ‌ها هستند که محدود به حیوانات بوده و تا بحال در انسان مشاهده نشدند.



شکل۲-۱: کلیسی ویروس‌ها به چهار جنس متفاوت تقسیم می شوند Norovirus، Sapovirus، Lagovirus، Vesivirus. (Pendu et al., 2006)

۲-۵ ساختمان کلی ویروس ها

ویروسی که دارای تمام اجزای ساختمانی طبیعی خود باشد ویریون نام دارد. بخش مرکزی و اصلی ویروس که در حکم هسته ویروس است از یک مولکول اسید نوکلئیک DNA یا RNA تشکیل شده که درون پوششی به نام کپسید قرار گرفته است.

در بیشتر ویروس‌ها نوکلئوکپسید درون غلافی از جنس لیپید یا لیپوپروتئین محصور شده است.در سطح این ویروس‌ها زوایدی وجود دارد که دارای ساختمان شیمیایی مشخص و خواص بیولوژیکی ویژه‌ای هستند (Morris., 1972).

۲-۵-۱اصول ساختمانی ویروس‌ها

ساختمان فیزیکی کپسید ویروس ها

آرایش ساختمانی ویروس‌ها را می‌توان در سه گروه زیر طبقه بندی کرد:

۱ـ ویروس‌های بیست وجهی[1] یا ویروس‌های با تقارن مکعبی[2] مانند ادنو ویروس‌ها و نورووویروس ها.

۲ـ ویروس‌های با تقارن مارپیچی[3] یا تقارن حلزونی مانند ویروس‌های آنفلونزا.

۳ـ ویروس‌های دارای ساختمان مرکب مثل ویروس‌های پاکس.

۲-۵-۲ ویروس‌های بیست وجهی یا با تقارن مکعبی

کپسید این ویروس‌ها از به هم پیوستن بیست مثلث متساوی الاضلاع به وجود آمده که دارای ۲۰ سطح، ۱۲ راس و ۳۰ فصل مشترک است. نحوه آرایش کپسومرها یکی از خصوصیات ویروس‌ها بوده که در طبقه‌بندی آنها در نظر گرفته می‌شود (Cann., 2005).

1 icosahedrique
2 Cubic symmetry
3 Helical symmetry