

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΝ

ΑΝΕΚΔΟΤΟΝ ΚΑΘΗΜΕΡΟΝ ΤΑΥΤΟΚΟΙΝΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΝ ΚΑΙ ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΟΝ ΜΑΙ ΗΡΑΚΛΕΙΑΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΝ ΚΑΙ ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΟΝ ΜΑΙ ΗΡΑΚΛΕΙΑΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΟΝ ΚΑΙ ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΟΝ ΜΑΙ ΗΡΑΚΛΕΙΑΝ

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200244



A

467



MAANNTALIN KUNNAN
KANTTIN

TOMAS ARTO
EIN...

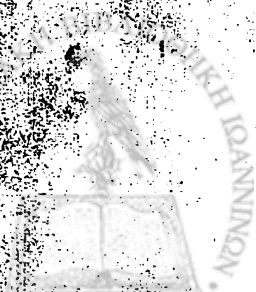
...

... KAI ...
... ME ...
... YLEA

...

...

...





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ:
Καθηγητής Α. Μαυρίδης**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ HIV ΛΟΙΜΩΞΗ ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.
ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Χ. ΠΑΠΑΒΕΝΤΣΗΣ
Ιατρός Βιοπαθολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»
N.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού τμήματος)



Ημερομηνία αιτήσεως: 23 / 3 / 2002

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 481α/25/6/2002

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα:

Σταματίνα Λεβειδίωτου – Στεφάνου, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Παναγιώτης Μαρκουλάτος, Ερευνητής Α΄ Ινστιτούτου Παστέρ

Λεωνίδας Χρήστου, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11 / 9 / 2002

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής: 2 / 12 / 2005

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 563^α/4.10.2005.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Α. Μαυρίδης, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Α. Ευαγγέλου, Καθηγητής Φυσιολογίας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Κ. Μπουραντάς, Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Παν/μίου Ιωαννίνων

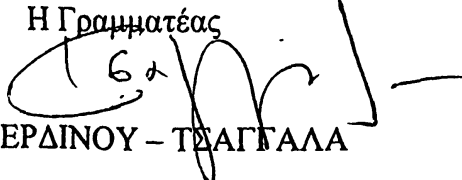
Π. Μαρκουλάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Παν/μίου Θεσσαλίας

Σ. Λεβειδίωτου-Στεφάνου, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Λ. Χρήστου, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Γ. Βρυώνη, Λέκτορας Μικροβιολογίας, Παν/μίου Ιωαννίνων

Η διδακτορική διατριβή έγινε αποδεκτή με βαθμό “**άριστα**”

Η Γραμματέας

Ε. ΖΑΒΕΡΔΙΝΟΥ – ΤΣΑΓΓΑΛΑ

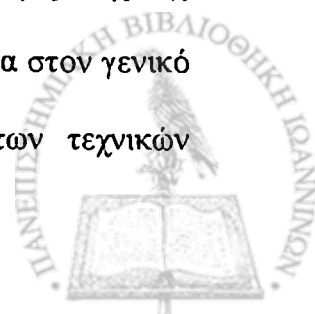


ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το γένος των εντεροϊών αποτελείται από περισσότερους από 60 αντιγονικά διακριτούς οροτύπους και είναι το πιο σημαντικό της οικογένειας των Picorna ιών ως προς την ανθρώπινη παθογένεια. Οι εντεροϊοί, οι οποίοι είναι ιοί μονής αλυσίδας RNA, προκαλούν λοιμώξεις που διαδράμουν υποκλινικά, ωστόσο οι σοβαρότερες εκδηλώσεις είναι αρκετά συχνές, όπως πχ. η άσηπτη μηνιγγίτιδα και η οξεία μυοκαρδίτιδα. Ο ιός της πολιομυελίτιδας, ο πρώτος ιός του γένους που μελετήθηκε, αναγνωρίστηκε ως εντεροϊός μισό αιώνα μετά την ανακάλυψή του. Τα τελευταία χρόνια με την εκτεταμένη χρήση των εμβολίων κατά της πολιομυελίτιδας έχει καταβληθεί επίμονη προσπάθεια για να επιτευχθεί η εκρίζωση της νόσου παγκοσμίως. Τα υπόλοιπα μέλη του γένους των εντεροϊών (non-polio enteroviruses, NPEVs), δηλαδή οι ιοί Coxsackie ομάδας A και B, οι ιοί Echo και οι νεότεροι εντεροϊοί, έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τους πολιοϊούς.

Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ) στις αρχές του 2000 συνέταξε ένα νέο Στρατηγικό Σχέδιο με στόχο την εξάλειψη της πολιομυελίτιδας μέχρι το 2005. Στόχος των παρεμβάσεων που προβλέπονταν από το σχέδιο ήταν η διακοπή της μετάδοσης 'αγρίων' στελεχών και εν συνεχεία η παύση των προγραμμάτων εμβολιασμού. Προς αυτήν την κατεύθυνση μεταξύ άλλων προτάθηκαν πλαίσια και κατευθυντήριες οδηγίες, που αφορούσαν στην ανάπτυξη δικτύων επιδημιολογικής και εργαστηριακής επιτήρησης της κυκλοφορίας των εντεροϊών, στη βελτίωση των τεχνικών διαπίστωσης και επιβεβαίωσης της εκρίζωσης και στον εντοπισμό πιθανών 'δεξαμενών' των ιών στο γενικό πληθυσμό και το περιβάλλον.

Στα παραπάνω πλαίσια κινήθηκε η παρούσα ερευνητική μελέτη, ειδικότερα δε στις κατευθύνσεις της εφαρμογής επιδημιολογικής και εργαστηριακής επιτήρησης, της ανάπτυξης στρατηγικών για την διακοπή του εμβολιασμού μετά την επιβεβαίωση της εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας, και του εντοπισμού πιθανών 'δεξαμενών' των εντεροϊών μέσα στον γενικό πληθυσμό. Σκοπός της υπήρξε η ανάπτυξη, εφαρμογή και βελτίωση των τεχνικών



πιστοποίηση της εκρίζωσης των 'αγρίων' στελεχών της πολιομυελίτιδας, με σημαντικές επιπτώσεις για την προστασία της Δημόσιας Υγείας.

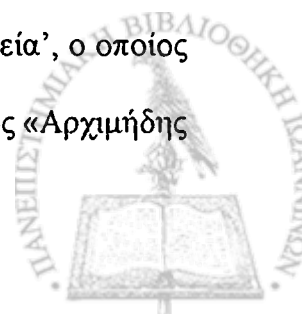
Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη της Επικουρου Καθηγήτριας Μικροβιολογίας κας Σταματίνας Λεβειδιώτου, την οποία και ευχαριστώ θερμά για την αμέριστη συμπαράσταση, την εποικοδομητική κριτική, το συνεχές επιστημονικό ενδιαφέρον και την ακούραστη επίβλεψή της.

Σημαντικό τμήμα της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε επίσης στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Εντεροϊών στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ και εν συνεχεία στο Τμήμα Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας – Ιολογίας της Σχολής Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτου. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την ακούραστη επίβλεψη, καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά την εκτέλεση της εργασίας.

Ευχαριστώ ακόμη ιδιαίτερα, τον Διευθυντή της Γ' Παθολογικής Κλινικής και της Μονάδας Ειδικών Λοιμώξεων (Μ.Ε.Λ) του Νοσοκομείου Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού κ.Μάριο Λαζανά, για την δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ στη Μονάδα.

Εκφράζω επίσης τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Δρ. Γεώργιο Παπαγεωργίου, Υπεύθυνο του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Ιολογίας του Γενικού Χημείου του Κράτους της Κύπρου, τόσο για την ζεστή φιλοξενία του κατά την διάρκεια της εργασίας στη Λευκωσία, όσο και για την επιστημονική και πρακτική του βοήθεια στην αρχική φάση επεξεργασίας των περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα τον καθηγητή του Τ.Ε.Ι. Αθήνας κ. Κλεομένη Οικονόμου, επιστημονικό υπεύθυνο του υποέργου 'Ανάπτυξη και εφαρμογή μεθοδολογίας για την ανίχνευση εντεροϊών σε αστικά απόβλητα-Επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία', ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω ερευνητικά στα πλαίσια του προγράμματος «Αρχιμήδης



– Ενίσχυση ερευνητικών ομάδων στα ΤΕΙ - Ενίσχυση Ερευνητικών Ομάδων σε θέματα Περιβάλλοντος και Οικολογίας».

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στο μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής Επίκουρο Καθηγητή κ. Λεωνίδα Χρήστου για τις χρήσιμες υποδείξεις του.

Ευχαριστώ θερμότατα τον Λέκτορα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Νικόλαο Σιαφάκα. Το ξεχωριστό του ενδιαφέρον και η συνεισφορά του σε θέματα τεχνογνωσίας, συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, Καθηγητή κ.Α. Μαυρίδη, Καθηγητή Α. Ευαγγέλου, Καθηγητή Κ. Μπουραντά, και Λέκτορα Γ. Βρυώνη για τις ουσιαστικές υποδείξεις τους.

Επίσης, θα ήθελα να απευθύνω ιδιαίτερες ευχαριστίες σε όλους όσους δούλεψαν μαζί μου τα τρία τελευταία χρόνια στο εργαστήριο ή στην κλινική για την συμπαράσταση και βοήθειά τους στη συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία των δειγμάτων. Τέλος, εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την υπομονή, την αγάπη και την συμπαράστασή της.

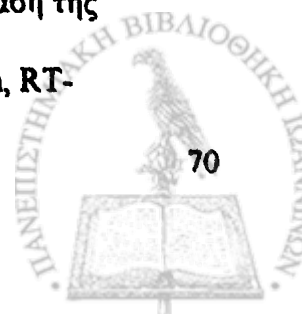


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ	1
1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	3
2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	4
3. ΙΟΛΟΓΙΑ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	5
3.1 Μορφολογία – Δομή	5
3.2 Είσοδος στον ξενιστή- Πολλαπλασιασμός	14
3.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες	20
3.4 Καλλιέργειες σε κυτταρικές σειρές	21
4. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	22
4.1 Κατανομή λοιμώξεων από εντεροϊούς: γεωγραφική, εποχιακή, κοινωνικοοικονομική, ανάλογα με το φύλο και την ηλικία – ενδημική και επιδημική συμπεριφορά	22
4.2 Τρόποι μετάδοσης	25
4.3 Περίοδος επώασης	26
4.4 Μοριακή επιδημιολογία	27
4.5 Εντεροϊοί και περιβάλλον	28
5. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ - ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	29
6. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	34
6.1 Λοίμωξη από τον ιό της πολιομυελίτιδας	34
6.2 Λοιμώξεις από τους ιούς Coxsackie, Echo και τους λοιπούς εντεροϊούς	37
6.2.1. Οξεία άσηπτη μηνιγγίτιδα	38
6.2.2. Εγκεφαλίτιδα	40
6.2.3. Παράλυση και άλλες νευρολογικές επιπλοκές	41
6.2.4. Δερματικές εκδηλώσεις	42



6.2.5. Λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος	44
6.2.6. Λοιμώξεις της καρδιάς	46
6.2.7. Οφθαλμικές λοιμώξεις	48
6.2.8. Νεογνικές λοιμώξεις	49
6.2.9. Εντεροϊοί και χρόνιες παθήσεις	51
6.3 Εντεροϊοί και Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS)	52
7. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	55
7.1 Συλλογή δειγμάτων	55
7.2 Ανίχνευση και απομόνωση των εντεροϊών σε κυτταροκαλλιέργεια	56
7.3 Ταυτοποίηση των εντεροϊών με μικροροεξουδετέρωση	58
7.4 Ορολογική διάγνωση	58
7.5 Μοριακές τεχνικές και φυλογενετική ανάλυση	59
8. ΘΕΡΑΠΕΙΑ	60
9. ΠΡΟΛΗΨΗ	61
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	65
ΣΚΟΠΟΣ	67
A. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ AIDS	68
1. ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΙ	68
1.1. Υλικό - δείγματα	68
1.2 Μέθοδοι	69
1.2.1 Κυτταροκαλλιέργεια	69
1.2.2 Μοριακές τεχνικές: Αντίστροφη Μεταγραφή – Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	70



2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	74
Β. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	79
1. ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΙ	79
1.1 Υλικό – περιβαλλοντικά δείγματα	79
1.2 Μέθοδοι	79
1.2.1 Μέθοδος VIRADEN	79
1.2.2 Μοριακές τεχνικές	84
1.2.2.1 Εκχύλιση RNA	84
1.2.2.2 Αντίστροφη Μεταγραφή –Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης	84
1.2.2.3 Αρχική ταυτοποίηση, με μελέτη του πολυμορφισμού των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια UC ₅₃ /UG ₅₂	88
1.2.2.4 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (Sequencing) και Φυλογενετική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια 292/222	90
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	92
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	97
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	120
SUMMARY	122
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	124



6. Παθογένεια λοίμωξης από πολιοϊό	30
7. Πορεία της λοίμωξης με πολιοϊό	35
8. Κυτταροπαθογόνος δράση πολιοϊού	57
9. Α. Σχηματική αναπαράσταση τεχνικής VIRADEN: αρχικά το δείγμα περνά μέσω φίλτρου 20 μm που δεν κατακρατεί τους ιούς Β. Εφαρμογή της μεθόδου VIRADEN στο μονόστιβο BGM επιθήλιο	82
10. Παρατήρηση πλακών επί του μονόστιβου BGM επιθηλίου μετά από χρώση με 0.1% κρυσταλλικό ιώδες	83
11. Α. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα προϊόντων ενίσχυσης με τα εκκινητικά μόρια UG ₅₂ /UC ₅₃ (435-bp) και 292/222 (350bp) Β. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της RFLP ανάλυσης των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια UC ₅₃ /UG ₅₂ για στελέχη εντεροϊών που απομονώθηκαν.	93
12.α. Συχνότητα των προσδιορισθέντων με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία οροτύπων για τα απομονωθέντα στελέχη εντεροϊών	110
β. Χρονική κατανομή οροτύπων απομονωθέντων στελεχών ανά πόλη	111
13. Φυλογενετική ανάλυση συνόλου (104) απομονωθέντων στελεχών	112
14. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: CBV4	113
15. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: CBV5	114
16. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: CBV2	115
17. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: CBV1	116
18. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: CAV9	117
19. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: PV2	118
20. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: ECV7	119



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

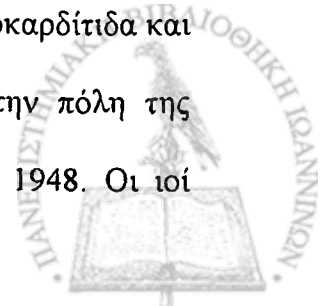
ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ



1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Οι εντεροϊοί αποτελούνται από 65 αντιγονικά διακριτούς οροτύπους και είναι το πιο σημαντικό γένος της οικογένειας των Picorna ιών ως προς την ανθρώπινη παθογένεια. Η είσοδός τους στον ανθρώπινο οργανισμό γίνεται διά της κοπρανοστοματικής οδού και ο πολλαπλασιασμός τους λαμβάνει χώρα στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και του εντέρου (Melnick, 1996). Οι Picorna ιοί όπως δηλώνει και η ονομασία τους (Pico: μικρός + RNA), αποτελούν μία ευρεία οικογένεια μικρών, μη ελυτροφόρων ssRNA -ιών θετικής πολικότητας, η οποία περιλαμβάνει αρκετά παθογόνα για τον άνθρωπο και άλλα είδη θηλαστικών στελέχη (Φραντζίδου – Αδαμοπούλου, 1999). Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί, με βάση την προέλευσή τους, την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται σε κυτταρικές σειρές, την παθογένεια, τη μολυσματικότητα έναντι των ξενιστών και την αντιγονική τους δομή, υποδιαιρέθηκαν αρχικά στους πολιοϊούς (3 πρότυπα στελέχη), στους ιούς Coxsackie A (23 πρότυπα στελέχη) και B (6 πρότυπα στελέχη), τους ιούς Echo (28 πρότυπα στελέχη) και τους νεότερους εντεροϊούς 68-71 και 73. Ο Ιός της Ηπατίτιδας A, που παλαιότερα είχε ταξινομηθεί ως εντεροϊός 72 (Rueckert, 1996), σήμερα συγκαταλέγεται στο γένος Hepatovirus.

Ο ιός της πολιομυελίτιδας (PV, poliovirus), ο πρώτος ιός του γένους που μελετήθηκε, αναγνωρίστηκε ως εντεροϊός μισό αιώνα μετά την ανακάλυψή του (Melnick, 1996). Περιλαμβάνει τους οροτύπους 1, 2 και 3 και προκαλεί ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων που εκτείνεται από τη συχνότερη ασυμπτωματική λοίμωξη, έως τη σπανιότερη αλλά απειλητική για τη ζωή παραλυτική νόσο. Η αναγνώριση και ταυτοποίηση των υπολοίπων εντεροϊών είναι αποτέλεσμα της έρευνας για την πολιομυελίτιδα. Οι περισσότερες λοιμώξεις που προκαλούν οι εντεροϊοί διαδράμουν υποκλινικά, ωστόσο είναι συχνές και οι σοβαρές ή ακόμη και θανατηφόρες επιπλοκές, όπως η οξεία μυοκαρδίτιδα και η άσηπτη μηνιγγίτιδα. Οι ιοί Coxsackie πήραν την ονομασία τους από την πόλη της πολιτείας της Νέας Υόρκης, όπου και απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1948. Οι ιοί



Coxsackie A (CAV) περιλαμβάνουν τους οροτύπους 1-22 και 24, ενώ οι ιοί Coxsackie B (CBV) τους οροτύπους 1-6. Οι ιοί Echo (ECV, από τα αρχικά των λέξεων enteric cytopathogenic human orphan) απομονώθηκαν τυχαία το 1950 σε καλλιέργειες κυττάρων από κόπρανα υγιών ατόμων χωρίς κλινικά συμπτώματα. Περιλαμβάνουν τους οροτύπους 1-7, 9, 11-27 και 29-33. Τέλος, οι νεότεροι εντεροϊοί (ENV) 68-71 και 73 απομονώθηκαν μετά τη δεκαετία του 1970 και αριθμήθηκαν με βάση τη χρονολογική σειρά αναγνώρισης χωρίς να ταξινομηθούν στις παραπάνω κατηγορίες (Muir et al., 1998).

Την τελευταία πενήνταετία με τη μαζική χρήση των εμβολίων Salk και Sabin έχει επιτευχθεί η εκρίζωση της ασθένειας της πολιομυελίτιδας από τις προηγμένες χώρες. Ωστόσο η νόσος ενδημεί σήμερα σε αρκετές χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας και της Αφρικής, και σημαντική προσπάθεια θα πρέπει να καταβληθεί για να επιτευχθεί η εκρίζωση παγκοσμίως.

2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη ταξινόμηση, τα μέλη του γένους των ανθρώπινων εντεροϊών που συνιστούν 65 οροτύπους, διαχωρίστηκαν με βάση την γονοτυπική τους συγγένεια, στις παρακάτω ομάδες (King et al., 2000):

1. *Poliovirus* (3 ορότυποι), που περιλαμβάνει τους οροτύπους PV 1-3
2. *Human enterovirus A* (10 ορότυποι), που περιλαμβάνει τους ιούς CAV 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 και τον ENV 71
3. *Human enterovirus B* (37 ορότυποι), που περιλαμβάνει τους ιούς CAV 9, CBV 1-6, ECV 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33 και τους ENV 69 και 73
4. *Human enterovirus C* (11 ορότυποι), που περιλαμβάνει τους ιούς CAV 1, 11, 13, 15, 17-22, 24
5. *Human enterovirus D* (2 ορότυποι), στην οποία ανήκουν οι ENV 68 και 70

και



6. *Αταξινόμητοι ορότυποι* (2 ορότυποι), στους οποίους ανήκουν οι CAV 4 και 6

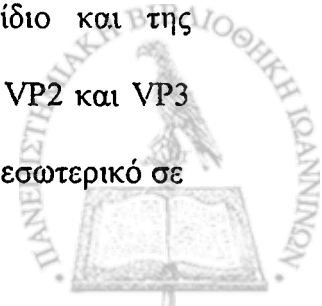
Εκτός των ανθρώπινων εντεροϊών, έχουν απομονωθεί τουλάχιστον 34 ορότυποι εντεροϊών που προσβάλλουν βοοειδή (εντεροϊός βοοειδών, Bovine Enterovirus), χοίρους (ιός της φυμαλιώδους ασθένειας των χοίρων, Swine Vesicular Disease Virus), πιθήκους και έντομα (Melnick, 1996).

3. ΙΟΛΟΓΙΑ

3.1 Μορφολογία – δομή

Οι ιοί είναι οι μικρότερου μεγέθους λοιμώδεις παράγοντες (Εικόνα 1Α). Οι ρικογνα ιοί, όπως προαναφέρθηκε, είναι πολύ μικρού μεγέθους (Εικόνα 1Β). Σε μελέτες κρυσταλλογραφίας με ακτίνες Χ, κατέστη δυνατή η αποκάλυψη της τρισδιάστατης δομής των εντεροϊών, η οποία μάλιστα θεωρείται αντιπροσωπευτική και για το σύνολο των υπολοίπων Ρικογνα ιών (Εικόνα 2Α) (Acharya et al., 1989). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι οι εντεροϊοί δεν περιβάλλονται από λιπιδικό έλυτρο. Το πρωτεϊνικό τους καψίδιο είναι σφαιρικό, εικοσαεδρικής συμμετρίας, πάχους 5nm και διαμέτρου περίπου 24-30nm και σχηματίζεται από 60 αντίγραφα 4 πρωτεϊνών, των VP1, VP2, VP3 και VP4 (Rueckert, 1996).

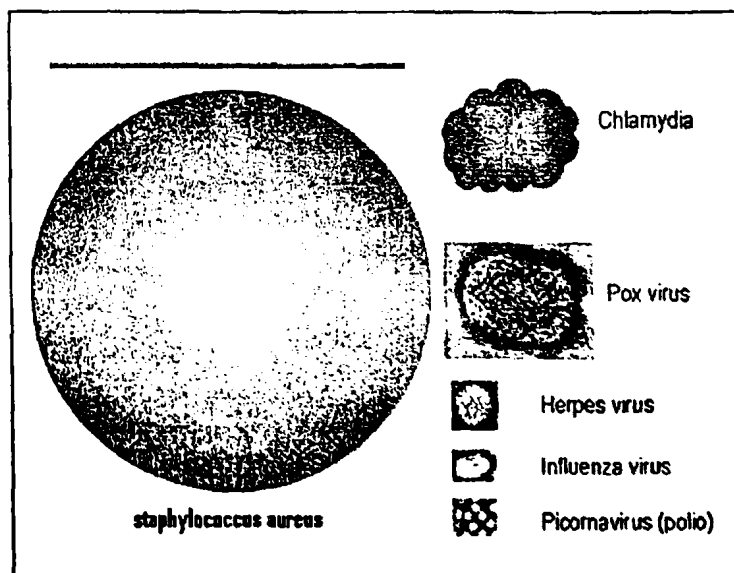
Η συγκρότηση του ώριμου καψιδίου γίνεται μέσω των ονομαζόμενων **πρωτομερών**, τα οποία απαρτίζονται από αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας προδρόμου πρωτεΐνης, της VP0, στην οποία οι VP2 και VP4 είναι ομοιοπολικώς συνδεδεμένες και αποτελούν τη βασική δομική μονάδα του καψιδίου (Rossman & Johnson, 1989). Πέντε πρωτομερή σχηματίζουν ένα πενταμερές, ενώ η τελική συγκρότηση του καψιδίου γίνεται από ένα σύμπλεγμα 12 πενταμερών (Rueckert, 1996) (Εικόνα 2Β). Η διάσπαση της VP0 στις VP4 και VP2 αποτελεί το τελευταίο στάδιο του εγκλεισμού του γενετικού υλικού στο καψίδιο και της σταθεροποίησης του ώριμου πλέον ιού (Stanway, 1990). Οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 σχηματίζουν την εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό σε



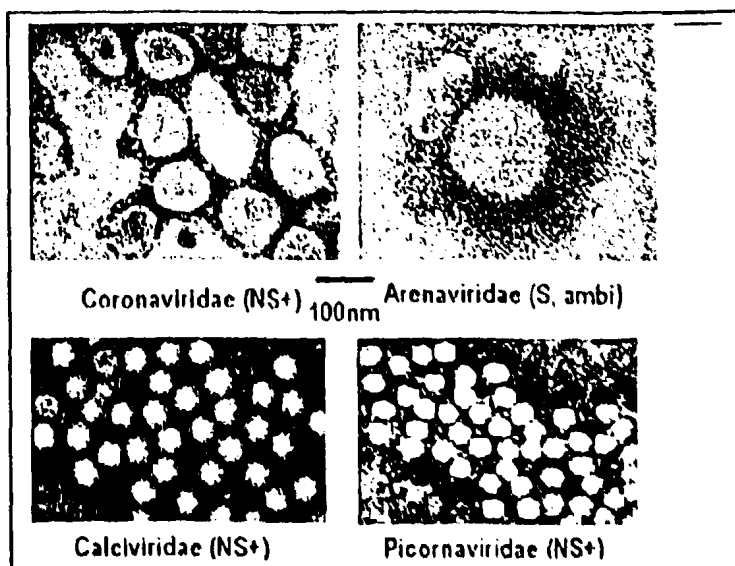
Εικόνα 1: **A.** Σχηματική παράσταση, όπου απεικονίζεται συγκριτικά το μέγεθος του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* με το μέγεθος των χλαμυδίων, του ροξνίους και των ιών του έρπητα, της γρίπης και της πολιομυελίτιδας. Η διάμετρος του *Staphylococcus aureus* είναι 1μm. **B.** Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου αντιπροσωπευτικών RNA ιών θετικής πολικότητας.

(Προσαρμογή από Cann A (1999) Course BS335: Virology. Διαδικτυακός τόπος <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Picornaviruses.html> [πρόσβαση 3-2005])

A.



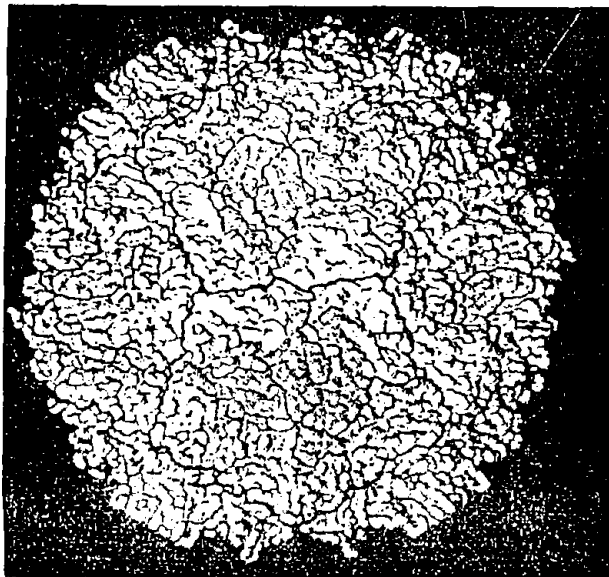
B.



Εικόνα 2: Α. Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής πολιοϊού με κρυσταλλογραφία
 Β. Σχηματική παράσταση οργάνωσης εικοσαεδρικής συμμετρίας ιϊκού καψιδίου. Απεικόνιση
 πενταμερών.

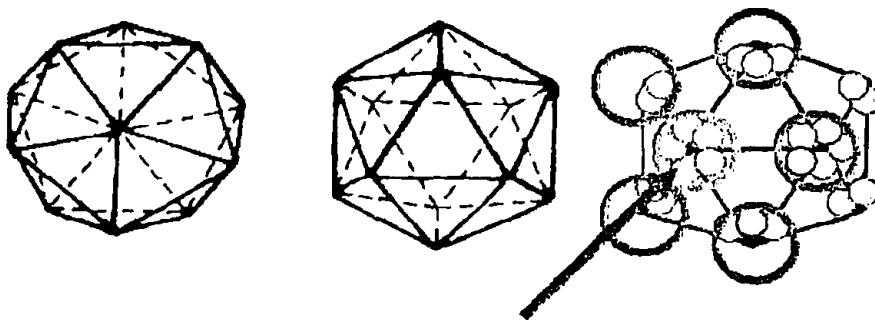
(Προσαρμογή από Cann A (1999) Course BS335: Virology. Διαδικτυακός τόπος
<http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Picornaviruses.html> [πρόσβαση 3-2005])

Α.



Β.

Εικοσαεδρική συμμετρία



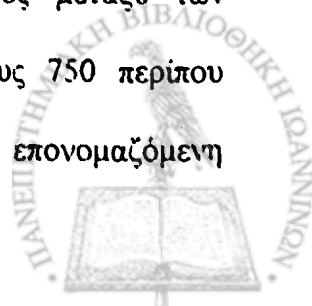
πενταμερές



στενή σχέση με το πυρηνικό RNA (Chow et al., 1987). Οι εξωτερικές πρωτεΐνες έχουν παρόμοιο μέγεθος και αριθμό αμινοξέων στους διάφορους ιούς της οικογένειας Picornaviridae και είναι δομικά όμοιες παρουσιάζοντας διάταξη β-βαρελιού (*b-barrel*) με διαφορές στο μέγεθος των θηλιών (*loops*). Η εσωτερική VP4 πρωτεΐνη είναι σημαντικά μικρότερη (Stanway, 1990).

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά στη δομή των εντεροϊών είναι η ύπαρξη μιας βαθειάς σχισμής «αυλάκωσης» (*canyon*), που βρίσκεται σε σταθερή ακτίνα γύρω από τον άξονα πενταπλούς συμμετρίας και στα πλάγιά της βρίσκονται τμήματα των VP1 και VP3. Αυτή η σχισμή είναι πιθανό να εμπλέκεται στην προσκόλληση των ιών στους ειδικούς υποδοχείς των κυττάρων-ξενιστών (Rossman et al., 1985). Τα σημεία 'προσκόλλησης' επιτελούν μια πολύ σημαντική λειτουργία και όπως αναμένεται διατηρούνται φυλογενετικά ως προς την αλληλουχία των δομικών μονάδων που τα απαρτίζουν. Μελέτες πάνω στη δομή των εντεροϊών έχουν προσφέρει σημαντικές σχετικές πληροφορίες.

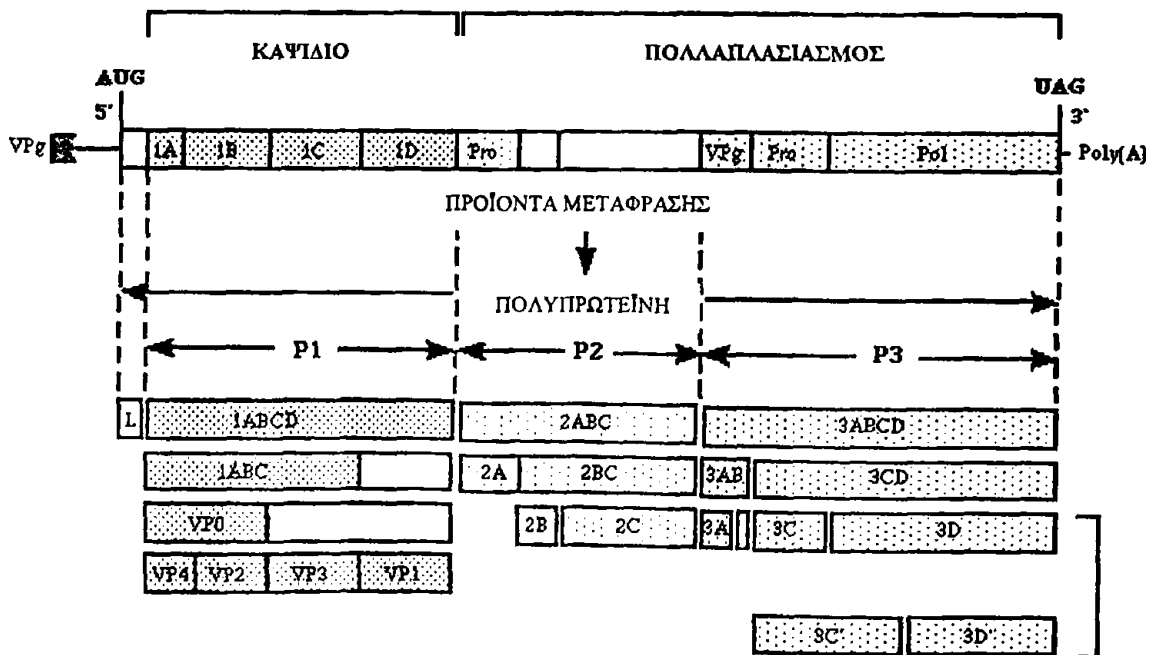
Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι οι αντιγονικές περιοχές είναι συγκεντρωμένες σε μη συγκεκριμένης δομής πολυποικιλόμορφα τμήματα, στις «θηλιές» (*loops*), που συνδέουν τα β-φύλλα και προεξέχουν στην επιφάνεια. Αντίθετα, στο εσωτερικό «κρύβονται» πιθανότατα τμήματα μεγάλης σημασίας, τα οποία δεν έχουν δυνατότητα εξελικτικής ποικιλομορφίας. Έτσι αποφεύγεται πιθανή ανοσολογική απάντηση του ξενιστή έναντι των διατηρημένων τμημάτων στο βαθύτερο εσωτερικό του καψιδίου. Το νουκλεοκαψίδιο των picorna ιών εσωκλείει το γενετικό υλικό των εντεροϊών, ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας και μήκους περίπου 7500 νουκλεοτιδίων (Melnick, 1996). Το γένωμα των αγρίων και των στελεχών εμβολίου των πολιοϊών, καθώς και πολλών από τους λοιπούς εντεροϊούς έχει πλήρως αλληλουχηθεί (Rueckert, 1996). Η οργάνωση του γενώματος μεταξύ των διαφορετικών ειδών παραμένει η ίδια (Εικόνα 3). Το τμήμα μήκους 750 περίπου νουκλεοτιδίων προς το 5' άκρο του γενώματος χαρακτηρίζεται από την επονομαζόμενη



Εικόνα 3: Σχηματική παράσταση γένωματος και προϊόντων μετάφρασης εντεροϊών

Το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA. Με κατεύθυνση από το 5' άκρο προς το 3' άκρο, το γένωμα αποτελείται διαδοχικά από την 5'-μη-Μεταφραζόμενη περιοχή (5'-untranslated region, 5'-UTR), το "ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης" (open reading frame, ORF) και την 3'-μη-Μεταφραζόμενη περιοχή (3'-untranslated region, 3'-UTR). Το 5' άκρο συνδέεται με την μικρή πρωτεΐνη VPg. Το 3' άκρο καταλήγει σε μια πολυαδενυλιωμένη ουρά. Το γονιδίωμα αρχικά μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία διασπάται σε τρία πολυπεπίδια: P1, P2 και P3. Οι διαδοχικές διασπάσεις της P1, οδηγούν στο σχηματισμό των καψιδικών πρωτεϊνών: VP1, VP2, VP3 και VP4. Από την διάσπαση των P2 και P3 προκύπτουν οι λειτουργικές πρωτεΐνες (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D).

(Προσαρμογή από Camp A (1999) Course BS335: Virology. Διαδικτυακός τόπος <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Picornaviruses.html>) [πρόσβαση 3-2005])



5'-μη-Μεταφραζόμενη περιοχή (5'-untranslated region, 5'-UTR). Η περιοχή αυτή ακολουθείται από το κυρίως τμήμα μήκους 2100 κωδικονίων περίπου, το οποίο και χαρακτηρίζεται ως “ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης” (open reading frame, ORF). Το κυρίως τμήμα περιέχει τις πληροφορίες για τις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Μετά το ORF και σε αντιστοιχία με το 5'-UTR, υπάρχει μία περιοχή 3'-UTR, δηλαδή μία 3'-μη-Μεταφραζόμενη περιοχή μήκους περίπου 70-100 νουκλεοτιδίων (Muir et al., 1998). Το 5' άκρο του γενώματος συνδέεται με φωσφοδιεστερικό δεσμό με μια μικρή, κωδικοποιούμενη από τον ιό πρωτεΐνη, την επονομαζόμενη VPg ή 3B, η οποία φαίνεται ότι εμπλέκεται στην έναρξη της σύνθεσης του RNA (Rueckert et al., 1996). Το 3' άκρο καταλήγει σε μια πολυαδενυλιωμένη περιοχή (Poly-A-tract) (Muir et al., 1998).

Οι περισσότερο διατηρημένες φυλογενετικά περιοχές του γενετικού υλικού μεταξύ των διαφόρων οροτύπων των εντεροϊών είναι η 5'-UTR και οι περιοχές που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη VPg (πρωτεΐνη 3B) και την RNA πολυμεράση (πρωτεΐνη 3D) (Modlin, 2000a).

Ειδικότερα, τα επιμέρους χαρακτηριστικά του κάθε τμήματος του γενώματος των εντεροϊών είναι:

5'-UTR: περιοχή περίπου 750 νουκλεοτιδίων, η οποία περιέχει μεγάλα τμήματα νουκλεοτιδίων διατηρούμενα φυλογενετικά πλήρως ή σχεδόν πλήρως από είδος σε είδος (Stanway et al., 1984). Αποτελεί το 8-12% του γενώματος των picorna ιών και είναι ασυνήθιστα μεγάλη σε μήκος. Είναι πιθανό ότι το μήκος και η γενικότερη φύση της περιοχής είναι σημαντικά για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών του ιού, όταν αυτός βρίσκεται εντός του ξενιστή. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι, μεταλλαγμένα στελέχη στην 5'-UTR παρουσιάζουν μικρότερη λοιμογόνο δύναμη (Duke et al., 1990; Minor, 1992) ή είναι

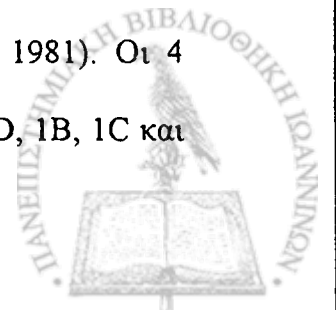


περισσότερο ευαίσθητα στη θερμότητα (Ramsingh et al., 1995). Επίσης, φαίνεται ότι τμήματα της 5'-UTR παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης (Haller et al., 1992) και στον πολλαπλασιασμό (Andino et al., 1993) του ιού της πολιομυελίτιδας.

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό των εντεροϊών και όλων των *ricorna* ιών είναι ότι η σύνθεση της 5'-UTR αποτελείται από ένα σημαντικά υψηλότερο ποσοστό νουκλεοτιδίων με αζωτούχες βάσεις τη γουανίνη και την κυτοσίνη σε σχέση με το υπόλοιπο γένωμα (Palmenberg, 1987). Η ύπαρξη τριών δεσμών υδρογόνου μεταξύ αυτών των βάσεων (G+C), σε αντιδιαστολή με τους δύο δεσμούς υδρογόνου των βάσεων αδενίνη-ουρακίλη (A+U), αντικατοπτρίζει την πιθανή ύπαρξη δευτεροταγούς δομής με σημαντική λειτουργία. Φαίνεται σε αυτήν την περίπτωση ότι η 5'-UTR περιέχει αλληλουχίες που εμπλέκονται στον εγκλεισμό του RNA στο καψίδιο και στον πολλαπλασιασμό του ιού και ότι η σταθερότερη θερμοδυναμικά δευτεροταγής δομή είναι υψίστης σημασίας για τη διατήρηση του είδους.

Σύγκριση των αλληλουχιών της 5'-UTR περιοχής του γενώματος των εντεροϊών επιτρέπει την ταξινόμησή τους σε ομάδες με βάση την ομοιότητα στις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων. Έτσι, οι εντεροϊοί έχουν διαχωριστεί σε 2 ομάδες, που η κάθε μία αποτελείται από 2 επιπλέον υποομάδες (Pöyry et al., 1996; Muir et al., 1998). Νεότερη μελέτη με τη χρήση του ενζύμου περιορισμού *HpaII* έχει αποδείξει ότι είναι δυνατή η ταξινόμηση του συνόλου των εντεροϊών (αγρίων και στελεχών αναφοράς) σε 5 διακριτές γενετικές υποομάδες (Siafakas et al., 2003).

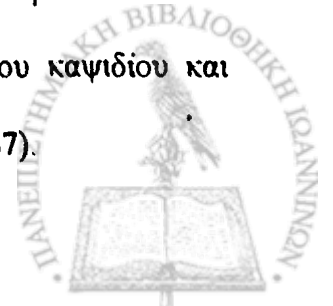
ORF: Η περιοχή αυτή, η οποία είναι και γνωστή ως "ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης", είναι η κύρια περιοχή του γενώματος των εντεροϊών. Κωδικοποιεί τη σύνθεση μιας μεγάλης πολυπρωτεΐνης, που κατά τη διάρκεια της μετάφρασης διασπάται σε 4 δομικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν το ιικό καψίδιο (VP1, VP2, VP3, VP4) και σε 7 λειτουργικές (μη-δομικές) πρωτεΐνες απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού (Kitamura et al., 1981). Οι 4 καψιδικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες αναφέρονται και ως 1D, 1B, 1C και



1A αντίστοιχα (Rueckert & Wimmer, 1984), κωδικοποιούνται προς το 5' άκρο του ORF. Οι πληροφορίες για τη σύνθεση των 7 λειτουργικών πρωτεϊνών, δηλαδή των 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D, και των προδρόμων μορίων αυτών, βρίσκονται στο 3' άκρο του ORF. Λειτουργίες των μη-δομικών πρωτεϊνών είναι η σύνθεση του RNA, η πρωτεολυτική διάσπαση των προϊόντων της μετάφρασης (πρωτεάσες) και η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου-ξενιστή (Modlin, 2000a).

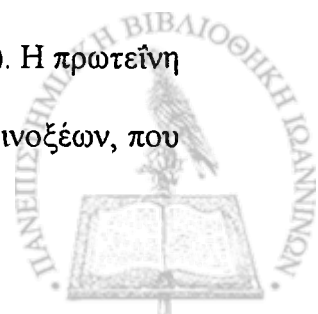
Η αρχική πολυπρωτεΐνη διασπάται σε τρία πολυπεπίδια, τα P1, P2, P3. Από τη διάσπαση του P1 προκύπτουν οι καψιδικές πρωτεΐνες. Από τη διάσπαση των P2 και P3 σχηματίζονται οι λειτουργικές πρωτεΐνες. Αναλυτικότερα, συνολικά τρεις πρωτεάσες, που κωδικοποιούνται από το γένωμα του ιού, διασπούν την πολυπρωτεΐνη σε 11 τελικά πρωτεϊνικά προϊόντα. Οι πρωτεάσες αυτές είναι:

- Η πρωτεΐνη 2A, η οποία πραγματοποιεί το πρωταρχικό πρωτεολυτικό ρήγμα στην πολυπρωτεΐνη (δηλαδή στο δικό της αμινικό άκρο - σύνδεσμο P1 - P2), διαχωρίζοντας τις πρόδρομες πρωτεΐνες των καψομερών από αυτές των μη-δομικών πρωτεϊνών (Toyoda et al., 1986). Επιπλέον, η πρωτεάση αυτή πιθανότατα εμπλέκεται στην αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου-ξενιστή (Krausslich et al., 1987; Rueckert, 1996).
- Η πρωτεΐνη 3C, η οποία πιστεύεται ότι διεξάγει την πλειοψηφία των πρωτεολυτικών διασπάσεων. Η πρωτεΐνη αυτή πιθανότατα επιτελεί επιπρόσθετες λειτουργίες στην επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης, ερχόμενη σε άμεση σχέση με το RNA του ιού (Stanway, 1990).
- Η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0, η οποία προκαλεί το τελευταίο πρωτεολυτικό ρήγμα που συντελείται με αποτέλεσμα τη δημιουργία των πρωτεϊνών VP2 και VP4. Αυτή η φάση πιθανότατα συντελείται εντός του καψιδίου και αποτελεί το τελικό στάδιο ωρίμανσής του (Arnold et al., 1987).



Όσον αφορά στις καψιδικές πρωτεΐνες, τρεις από αυτές, οι VP1, VP2 και VP3, έχουν παρόμοιο μέγεθος σε διαφορετικούς ρικογονα ιούς (VP1: 209-302 αμινοξέα, VP2: 218-273 αμινοξέα, VP3: 221-246 αμινοξέα), ενώ η VP4 είναι σημαντικά μικρότερη σε μήκος (VP4: 68-85 αμινοξέα) (Palmenberg, 1987). Οι πρωτεΐνες αυτές όπως είναι αναμενόμενο από την θέση την οποία κατέχουν στο καψίδιο, παίζουν πρωταρχικό ρόλο στον προσδιορισμό των αντιγονικών και άλλων χαρακτηριστικών των ιών αυτών, όπως για παράδειγμα την προσκόλληση στους κυτταρικούς υποδοχείς του ξενιστή. Στους πολιοϊούς, η VP1 αποτελεί την κυρίως εκτεθειμένη πρωτεΐνη με τουλάχιστον 2 επιτόπους, που προκαλούν την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Οι VP2 και VP3 είναι εν μέρει εκτεθειμένες και αντιγονικές (Yousef et al., 1988). Οι καψιδικές πρωτεΐνες είναι ποικιλόμορφες και οι διαφορές μεταξύ των διαφόρων οροτύπων είναι ως επί το πλείστον συγκεντρωμένες σε συγκεκριμένες περιοχές, συχνά σε υδρόφιλες περιοχές. Η σταθερότητα στη χωροδιάταξη των περιοχών αυτών θα σήμαινε ευπάθεια έναντι της χυμικής ανοσίας, ωστόσο η εντόπισή τους σε μια απρόσιτη για τα αντισώματα περιοχή είναι μάλλον μία στρατηγική αποφυγής ανοσολογικής αντίδρασης έναντι των ιών. Επιπρόσθετα, ο μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων στα τμήματα του γενετικού υλικού που κωδικοποιούν τα εξωτερικά τμήματα του καψιδίου εξηγεί και πάλι την ικανότητα του ιού να αποφεύγει την ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή (Stanway, 1990).

Οι μη-δομικές πρωτεΐνες των ρικογονα ιών διατηρούνται φυλογενετικά περισσότερο από ότι οι καψιδικές. Η μη-δομική πρωτεΐνη με την περισσότερο διατηρημένη φυλογενετικά αλληλουχία είναι η 3D, η RNA πολυμεράση, η οποία μεταξύ των διαφόρων οροτύπων εντεροϊών είναι κατά 95% και πλέον παρόμοια (Stanway, 1990). Μια άλλη μη-δομική πρωτεΐνη, η 2C, εμπλέκεται στη σύνθεση του RNA. Έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις σε αυτή την πρωτεΐνη οδηγούν σε απώλεια μέρους της λειτουργίας του RNA (Li et al., 1988). Η πρωτεΐνη 3B, έχει προαναφερθεί και ως VPg, και είναι μία μικρή πρωτεΐνη περίπου 22 αμινοξέων, που



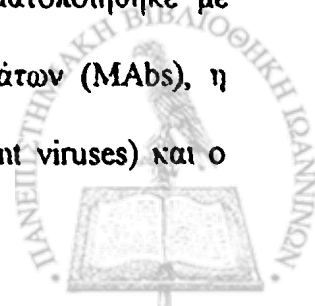
είναι συνδεδεμένη με το 5' άκρο του RNA (Hellen et al., 1995). Τέλος, οι υπόλοιπες δύο μη-δομικές πρωτεΐνες, η 2B και η 3A, πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό των ξενιστών (Lomax & Yin, 1989).

3'-UTR: Η μη-Μεταφραζόμενη περιοχή που βρίσκεται στο 3' άκρο του γενώματος των ρικογοναίων παρουσιάζει ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών εκπροσώπων της οικογένειας. Είναι σχετικά μικρή περιοχή, μήκους 70-100 νουκλεοτιδίων και διαφέρει σημαντικά σε μήκος στους διάφορους οροτύπους των εντεροϊών (Pöyry et al., 1996). Η δομή αυτή είναι συντηρημένη φυλογενετικά, κάτι που υποδεικνύει την πιθανή λειτουργική της αξία (Auninen et al., 1989). Πράγματι, φαίνεται ότι η 3'-UTR είναι σημαντική για την έναρξη της σύνθεσης των αρνητικών αλυσίδων RNA (minus-strand RNA) (Muir et al., 1998). Οι εντεροϊοί μπορούν να διαχωριστούν σε δύο ομάδες με βάση την αλληλουχία και τον αριθμό των νουκλεοτιδίων της 3'-UTR. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους πολιοϊούς και τον ιό CAV21, ενώ η δεύτερη τους ιούς CBV και τους CAV9, ECV6 και ECV11 (Stanway, 1990).

Τέλος, όσον αφορά στο πολυαδενυλιωμένο τμήμα που είναι συνδεδεμένο στο 3' άκρο του RNA, αυτό είναι ποικιλόμορφο και η λειτουργία του δεν είναι πλήρως γνωστή. Ωστόσο, ιοί με μικρότερο μήκος του poly(A) τμήματος έχει παρατηρηθεί ότι έχουν μειωμένη λομογόνο δύναμη (Rueckert, 1996).

3.2 Είσοδος στον ξενιστή - Πολλαπλασιασμός

Η είσοδος των εντεροϊών στα κύτταρα του ξενιστή επιτυγχάνεται μέσω ειδικών κυτταρικών υποδοχέων, οι οποίοι συμμετέχουν στις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου του ξενιστή (Melnick, 1996). Ο προσδιορισμός των υποδοχέων πραγματοποιήθηκε με διάφορες τεχνικές όπως η χρήση δεσμευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων (MAbs), η ανταγωνιστική σύνδεση μεταξύ ιών (Binding competition between different viruses) και ο



ανοσοφθορισμός (Fluorescently labelled virus, ιοί Echo). Παραδείγματα κυτταρικών υποδοχέων, που έχουν προσδιορισθεί για διάφορες ομάδες ρικογονίων, φαίνονται στον Πίνακα 1.

Οι υποδοχείς των εντεροϊών είναι πρωτεϊνικά μόρια που κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο χρωμόσωμα 19 (Rueckert, 1996). Όσον αφορά στους πολιοϊούς, ο υποδοχέας PVR (Poliovirus Receptor) φαίνεται ότι χρησιμοποιείται και από τους τρεις οροτύπους. Είναι υποδοχέας που προσδιορίζει καθοριστικά το είδος του ξενιστή και την παθογένεια των πολιοϊών (Ren et al., 1990). Όσον αφορά στους ιούς Coxsackie, ο σημαντικότερος υποδοχέας έχει βρεθεί ότι είναι ο ICAM-1 (διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης, intracellular adhesion molecule-1), ένα μέλος της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Modlin, 2000a). Άλλα σημαντικά μόρια είναι ο DAF (Decay-accelerating factor), ρυθμιστικός παράγοντας του συμπληρώματος που συμβάλλει στη διάσπαση του κυττάρου (Shafren et al., 1997; Modlin, 2000a), η ιντεγκρίνη $\alpha_3\beta_3$ (Roivainen et al., 1994) και ο κοινός υποδοχέας για αδενοϊούς και ιούς Coxsackie (CAR, Coxsackievirus-adenovirus receptor) (Bergelson et al., 1997). Για τους ιούς Echo φαίνεται ότι ο παράγων DAF αποτελεί σημαντικό υποδοχέα για αρκετούς οροτύπους (ECV 6,7,11,12,13,20,21,29,33) (Modlin, 2000a). Επίσης, ένα τμήμα της ιντεγκρίνης $\alpha_2\beta_1$, το VLA-2 (very late antigen-2), αποτελεί τον υποδοχέα των ιών Echo 1 και 8 (Bergelson et al., 1992).

Οι υποδοχείς δε διευκολύνουν απλώς την είσοδο των εντεροϊών στο κύτταρο, αλλά από ότι φαίνεται κινητοποιούν μια αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στην αποδιάταξη (uncoating) και αποσυναρμολόγησή τους (Racaniello, 1995). Η αποδιάταξη και αποσυναρμολόγηση των ρικογονίων, η οποία οδηγεί στην είσοδό τους στο κυτταρόπλασμα και στη λοίμωξη του κυττάρου ξενιστή, επιτελείται σε 4 στάδια (Εικόνα 4):

- **1^ο στάδιο:** χαλαρή-αντιστρεπτή σύνδεση του ιϊκού καψιδίου με τους βυθισμένους στην κυτταρική επιφάνεια υποδοχείς



Πίνακας 1. Παραδείγματα κυτταρικών υποδοχέων picorna ιών

Ιοί:	# οροτύπων:	Υποδοχέας:	Περιγραφή:
Human Rhinovirus	91	ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1)	Υπερ-οικογένεια ανοσοσφαιρινών 5 περιοχές
Human Rhinovirus	10	LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor)	Λιποπρωτεϊνικός Υποδοχέας
Poliovirus	3	CD155 (Poliovirus receptor, PVR)	Υπερ-οικογένεια ανοσοσφαιρινών 3 περιοχές (Ren et al., 1990)
CAV (13, 18, 21)	3	α) ICAM-1 β) DAF (Decay-accelerating factor)	Υπερ-οικογένεια ανοσοσφαιρινών 5 περιοχές (Modlin, 2000a) Ρυθμιστικός παράγοντας του συμπληρώματος (Shafren et al., 1997)
CAV 9	1	$\alpha\beta_3$	Ιντεγκρίνη (Roivainen et al., 1994)
CBV	6	a) CAR (Coxsackievirus-adenovirus receptor) b) DAF (Decay-accelerating factor)	Υπερ-οικογένεια ανοσοσφαιρινών (Bergelson et al., 1997) Παράγοντας συμπληρώματος (Modlin, 2000a)
Echo (1,8)	2	VLA-2 (very late antigen-2)	Τμήμα της ιντεγκρίνης $\alpha_2\beta_1$ (Bergelson et al., 1992)
Echo (6,7,11,12,13, 20,21,29,33)	9	DAF (Decay Accelerating Factor)	Ρυθμιστικός παράγοντας του συμπληρώματος (Modlin, 2000a)



- **2^ο στάδιο:** ισχυροποίηση αρχικής σύνδεσης –συνδιεγερτικά μόρια, εγκόλπωση κυτταρικής μεμβράνης και ενδοκυττάρωση του ιού
- **3^ο στάδιο:** διόγκωση ιϊκού καψιδίου, απώλεια της καψιδικής πρωτεΐνης VP4 με τη δράση πρωτεασών και σχηματισμός σωματιδίων A. Τα σωματίδια A έχουν συντελεστή καθίζησης (135 S) μικρότερο από το ώριμο καψίδιο (160 S), είναι μη-λοιμογόνα παρά την παρουσία RNA στο μόριό τους και έχουν εκτεθειμένα στην επιφάνειά τους τα αμινοτελικά άκρα της καψιδικής πρωτεΐνης VP1, που φυσιολογικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου.
- **4^ο στάδιο:** απελευθέρωση του ιϊκού RNA διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα και έναρξη της μετάφρασης (Rueckert, 1996)

Η κινητική του πολλαπλασιασμού των ρικογναίων είναι ταχύτατη, καθώς ο κύκλος ολοκληρώνεται σε διάστημα 5-10 (συνήθως 8) ωρών. Το μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA των ρικογναίων, ίδιας μοριακής συμμετρίας με το mRNA, μετά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα, αναγνωρίζεται και μεταφράζεται άμεσα στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο από τα κυτταρικά ριβοσώματα, χωρίς να προηγείται στάδιο μεταγραφής (Εικόνα 5).

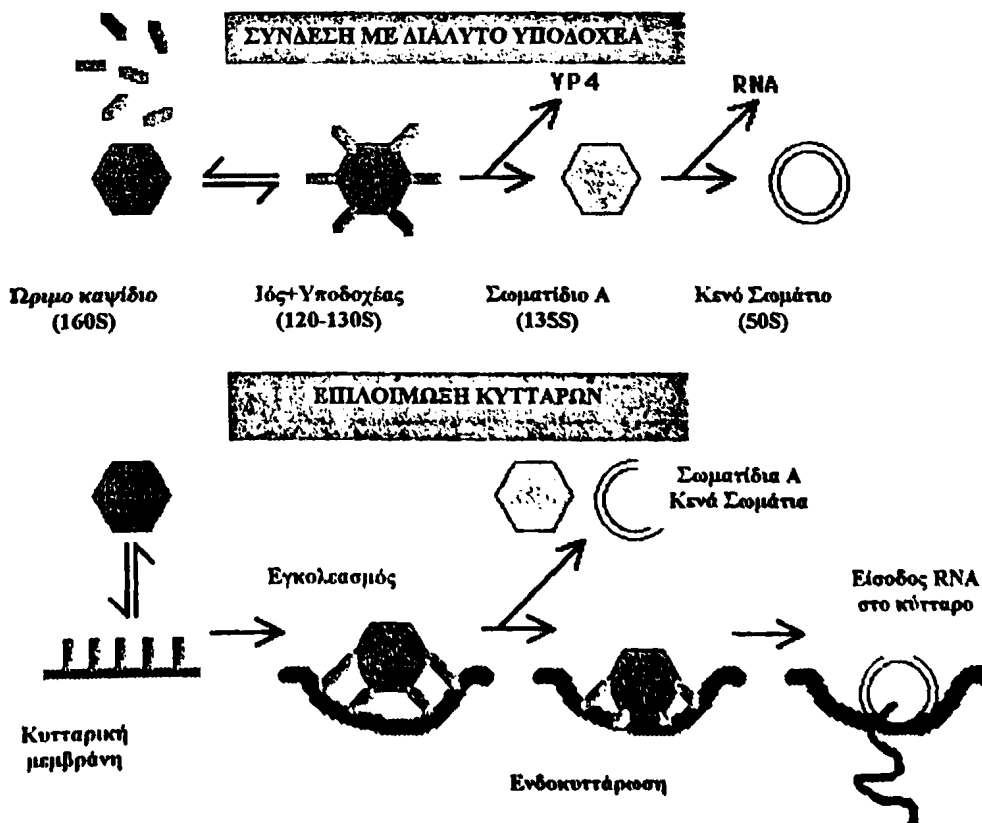
Η μετάφραση της κυρίας περιοχής του γενώματος των εντεροϊών (open reading frame, ORF), οδηγεί στη σύνθεση μιας πολυπρωτεΐνης, από την οποία, όπως προαναφέρθηκε, προέρχεται το σύνολο των δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών (Modlin, 2000a). Η σύνθεση της πολυπρωτεΐνης γίνεται με την προσκόλληση ριβοσωμάτων σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο εσωτερικό της 5'-UTR (IRES / Internal Ribosome Entry site ή RLP / Ribosome Landing Pad), αντίθετα από ότι εφαρμόζεται στην πλειονότητα των κυτταρικών mRNA με την αλληλεπίδραση μεταξύ ριβοσωμάτων και 5' άκρου του mRNA (Kozak, 1989).



Εικόνα 4. Σύνδεση καψιδίου picorna ιών με κυτταρικό υποδοχέα, αποδιάταξη και είσοδος ιϊκού RNA στο κύτταρο του ξενιστή

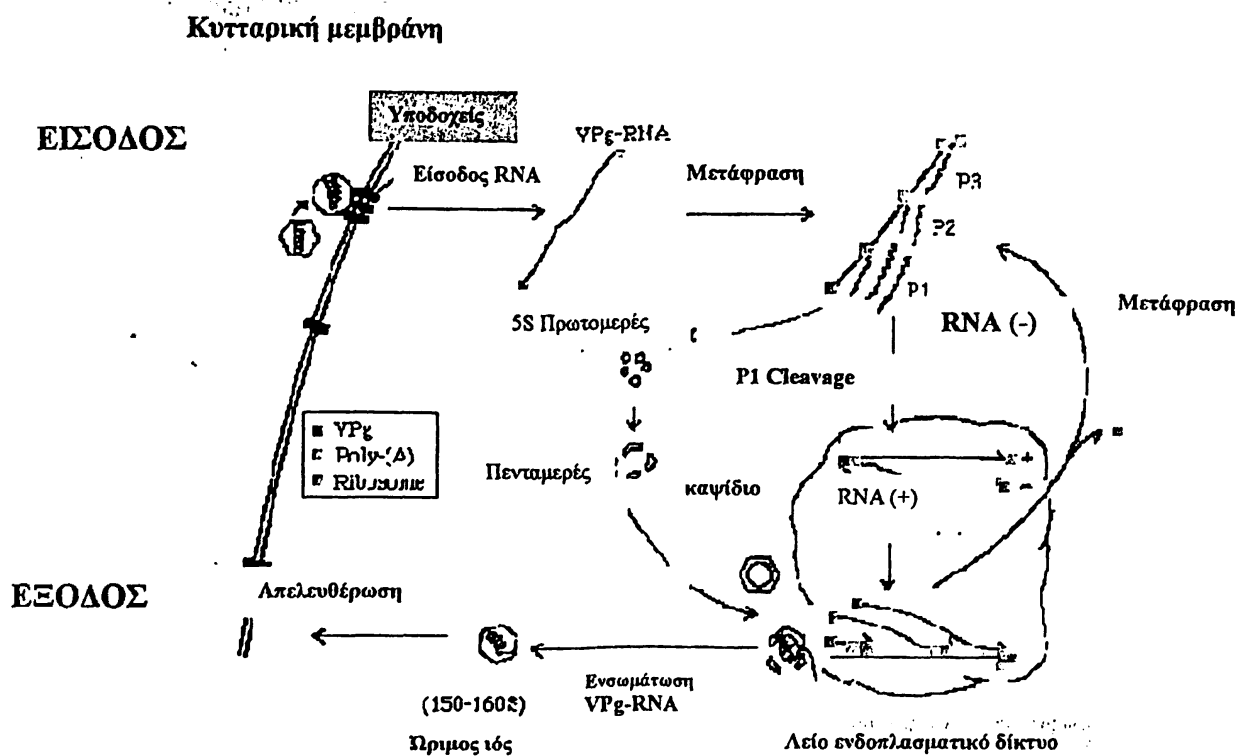
Η σύνδεση του ιϊκού σωματίου των picorna ιών με τον αντίστοιχο κυτταρικό υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή κινητοποιεί μια αλληλουχία γεγονότων με τελικό αποτέλεσμα την αποδιάταξη και αποσυναρμολόγηση του ιού. Η αλληλουχία των γεγονότων ολοκληρώνεται σε 4 στάδια. Τελικό αποτέλεσμα είναι η είσοδος του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου.

(Προσαρμογή από Cann A (1999) Course BS335: Virology. Διαδικτυακός τόπος <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Picornaviruses.html> [πρόσβαση 3-2005])



Εικόνα 5. Πολλαπλασιασμός ricorna ιών

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή επιτυγχάνεται μέσω ειδικών υποδοχέων με ενδοκύτωση. Την είσοδο του ιού στο κύτταρο ακολουθεί η απελευθέρωση του ιϊκού RNA και η έναρξη της μετάφρασης στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η αρχικά παραγόμενη πολυπρωτεΐνη, υπό την επίδραση πρωτεασών, διασπάται σε μικρότερα τμήματα σχηματίζοντας δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες. Η RNA πολυμεράση αντιγράφει τις αλυσίδες RNA θετικής πολικότητας σε αλυσίδες αρνητικής πολικότητας, οι οποίες με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση νέων αλυσίδων RNA θετικής πολικότητας. Μετά την ενσωμάτωση του RNA στα νέα ιϊκά καψίδια, ο ώριμος πλέον ιός εξέρχεται από το κύτταρο ξενιστή προκαλώντας λύση του κυττάρου.



Ένα από τα προϊόντα, η εξαρτώμενη από το ιικό RNA RNA-πολυμεράση (3D), αντιγράφει το γενωμικό RNA σε συμπληρωματικό RNA αρνητικής πολικότητας. Αυτό στη συνέχεια λειτουργεί ως μήτρα για τη σύνθεση πολλών νέων θετικών κλώνων (Johnson et al., 1995). Στη συνέχεια, ακολουθεί ο εγκλεισμός του νεοσχηματισθέντος ιικού RNA στην πρόωπη μορφή του ιικού καψιδίου, που αποτελείται από τις πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3. Η διάσπαση της VP0 σε VP2 και VP4, οδηγεί στη δημιουργία του ώριμου ιικού σωματιδίου (Arnold et al., 1987). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων και η έξοδός τους από το κυτταρόπλασμα (περίπου 10^4 - 10^5 ιικά σωματίδια ανά κύτταρο) συμβαίνει με λύση του κυττάρου - πιθανότατα με μία διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

3.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η οικολογία και η επιδημιολογία των λοιμώξεων από εντεροϊούς εξαρτάται σημαντικά από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Οι εντεροϊοί είναι σταθεροί σε όξινο περιβάλλον ακόμη και σε pH 3 ή χαμηλότερο, σε αντίθεση με τους ρινοϊούς που είναι ασταθείς σε pH μικρότερο του 6. Χάρη στην ιδιότητά τους αυτή, μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό τους στον οροφάρυγγα, μπορούν να επιβιώσουν κατά τη δίοδό τους διαμέσου του όξινου περιβάλλοντος του στομάχου και να φθάσουν στο κατώτερο γαστρεντερικό σύστημα, όπου και αναπαράγονται πιο εκτεταμένα. (Modlin, 2000a).

Ευνοϊκή θερμοκρασία για τον πολλαπλασιασμό των εντεροϊών θεωρείται η θερμοκρασία των 37°C. Έκθεση σε θερμοκρασία 50° C αδρανοποιεί ταχύτατα τους ρινοϊούς, στην ίδια θερμοκρασία παρουσία 1M MgCl₂ για 1 ώρα αναστέλλεται μερικώς η αδρανοποίηση. Οι εντεροϊοί διατηρούνται για χρόνια στη θερμοκρασία των -20° C και παραμένουν βιώσιμοι για εβδομάδες, όταν συντηρηθούν στους 4°C και για μέρες σε θερμοκρασία δωματίου (Melnick, 1996).

Η ανθεκτικότητα των εντεροϊών έναντι των οργανικών διαλυτών όπως ο αιθέρας και

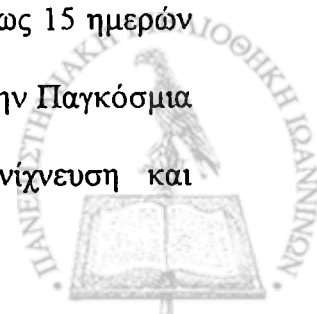


το δεοξυχολικό, εξηγείται πιθανότατα από την έλλειψη λιπιδικού περιβλήματος (Rueckert, 1996). Η ξηρασία και η υπεριώδης ακτινοβολία αδρανοποιούν γρήγορα τους εντεροϊούς, ενώ οι έμβιες χρώσεις (πχ. ουδέτερο ερυθρό, πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης κλπ.) εισχωρούν στο εσωτερικό του ιϊκού σωματιδίου, καθιστώντας τους φωτοευαίσθητους (Grandien et al., 1995). Επιπρόσθετα, αντιβιοτικά και χημειοθεραπευτικά σχήματα, αλκοόλη 70%, Lysol 5%, ενώσεις τετραμερούς αμμωνίου 1% ή παρόμοια απολυμαντικά δεν είναι αποτελεσματικά. Γρήγορη αδρανοποίηση επιτυγχάνεται με φορμαλδεύδη 0,3%, υδροχλωρικό οξύ 0,1% ή υπολειμματικό ελεύθερο χλώριο 0,3-0,5 ppm, ωστόσο η παρουσία άλλου οργανικού υλικού προστατεύει τους εντεροϊούς από την αδρανοποίηση (Melnick, 1996).

3.4 Καλλιέργεια σε κυτταρικές σειρές

Η απομόνωση σε ειδικές κυτταρικές σειρές και πειραματόζωα αποτέλεσε στο παρελθόν ευρέως διαδεδομένη διαγνωστική μέθοδο (Muij & van Loon, 1997). Ο ενοφθαλμισμός σε ποντίκια χρησιμοποιείται σπανίως σήμερα. Αντίθετα, η απομόνωση σε κυτταροκαλλιέργειες παραμένει το ισχυρότερο τεκμήριο λοίμωξης από εντεροϊούς. Η πιθανότητα απομόνωσης του υπεύθυνου ιού αυξάνεται με τη διενέργεια ελέγχου σε πολλά δείγματα. Για παράδειγμα, οι ιοί Echo απομονώνονται από το ENY ασθενών με άσηπτη μηνιγγίτιδα, ενώ δεν ανευρίσκονται στο πεπτικό σύστημα (Lerow et al., 1962). Αντιστρόφως, στο προχωρημένο στάδιο της λοίμωξης από εντεροϊούς και για επιδημιολογικές μελέτες, οι κυτταροκαλλιέργειες κοπράνων είναι καταλληλότερες, λόγω του γεγονότος ότι, το κατώτερο πεπτικό σύστημα είναι η θέση όπου ο ιός εξακολουθεί να πολλαπλασιάζεται.

Με τη χρησιμοποίηση τριών ή τεσσάρων κατάλληλων κυτταρικών σειρών, η εργαστηριακή απομόνωση του υπεύθυνου ιού μπορεί να επιτευχθεί εντός 2 έως 15 ημερών (Dagan & Menegus, 1986). Οι κυτταρικές σειρές οι οποίες προτείνονται από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Anonymous, 1996; Anonymous, 1998) για την ανίχνευση και



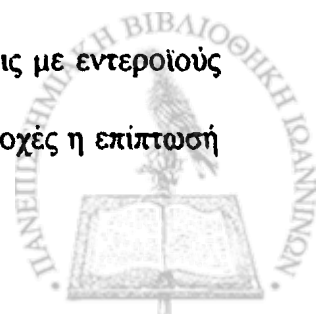
απομόνωση των εντεροϊών είναι (i) η κυτταρική σειρά Her-2, η οποία προέρχεται από το ανθρώπινο επιδερμοειδές καρκίνωμα, (ii) η κυτταρική σειρά RD (rhabdomyosarcoma), προερχόμενη από κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος (iii) η κυτταρική σειρά L20B, η οποία προέρχεται από κύτταρα ποντικού, τα οποία είναι γενετικώς τροποποιημένα για να εκφράζουν στην κυτταρική τους μεμβράνη τον υποδοχέα PVR (*Polio Virus Receptor*) των ανθρωπίνων κυττάρων για τους πολιοϊούς και (iv) η κυτταρική σειρά Buffalo Green Monkey (BGM), η οποία επιπρόσθετα προτείνεται από την Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας του περιβάλλοντος (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) για την απομόνωση εντεροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα (Dahling et al., 1974; Guttman-Bass, 1987).

Με την καλλιέργεια σε κλασικές και νεότερες κυτταρικές σειρές, η αναγνώριση των χαρακτηριστικών κυτταροπαθολογικών αλλοιώσεων θέτει τη διάγνωση μιας πιθανής λοίμωξης από εντεροϊό. Από τη στιγμή που ο ιός έχει απομονωθεί με την κυτταροκαλλιέργεια, ο προσδιορισμός του οροτύπου μπορεί να επιτευχθεί με εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης του με ειδικούς για τον ορότυπο αντιορούς.

4. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ - ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

4.1 Κατανομή λοιμώξεων από εντεροϊούς: γεωγραφική, εποχιακή, κοινωνικοοικονομική, ανάλογα με το φύλο και την ηλικία – ενδημική και επιδημική συμπεριφορά

Οι λοιμώξεις από εντεροϊούς έχουν παγκόσμια κατανομή. Η συχνότητά τους ποικίλλει ευρύτατα ανάλογα με την εποχή, τη γεωγραφική θέση, την ηλικία και την κοινωνικοοικονομική κατάσταση του πληθυσμού που εξετάζεται. Λοιμώξεις με εντεροϊούς παρατηρούνται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, ωστόσο στις εύκρατες περιοχές η επίπτωσή



τους είναι μεγαλύτερη τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες. Αυτή η εποχιακή περιοδικότητα, η οποία δεν έχει επαρκώς εξηγηθεί, δεν παρατηρείται στις τροπικές περιοχές, όπου οι εντεροϊοί ενδημούν όλη τη διάρκεια του έτους (Moore, 1982).

Τα τρία τέταρτα των λοιμώξεων από εντεροϊούς παρατηρούνται σε παιδιά μικρότερα των 15 ετών (Grist et al., 1978). Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ), οι λοιμώξεις από εντεροϊούς πλην των πολιοϊών (non-polio enteroviruses, NPEVs) είναι συχνότερες πριν το πρώτο έτος της ζωής (Dagan et al., 1985; Froeschle et al., 1966). Έχει βρεθεί ότι κατά τη διάρκεια της περιόδου που παρατηρείται αιχμή των λοιμώξεων στη Νέα Υόρκη, η επίπτωσή τους τον πρώτο μήνα της ζωής είναι 12,8% (Jenista et al., 1984). Τα επίπεδα των συμπτωματικών λοιμώξεων ελαττώνονται μετά το δεύτερο μήνα, ωστόσο παραμένουν υψηλά για τα μεγαλύτερα βρέφη και νήπια σε σχέση με τα μεγαλύτερα παιδιά και τους ενήλικες (Rogabaugh et al., 1993).

Η ηλικία δεν σχετίζεται μόνο με τη συχνότητα αλλά και με τη βαρύτητα της νόσου. Οι ιοί Coxsackie B προκαλούν σηπτική νόσο συχνότερα στα νεογέννητα από ότι στα μεγαλύτερα παιδιά και στους ενήλικες, ενώ οι πολιοϊοί δημιουργούν σοβαρές επιπλοκές και παράλυση συχνότερα στους ενήλικες (Mogens et al., 1995).

Οι λοιμώξεις από εντεροϊούς έχουν μεγαλύτερη επίπτωση στα παιδιά χαμηλότερης κοινωνικοοικονομικής κατάστασης σε σχέση με αυτά της μεσαίας και ανώτερης. Το γεγονός αυτό εξηγείται λόγω των κακών συνθηκών υγιεινής, του συγχρωτισμού και της αυξημένης πιθανότητας μόλυνσης μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Υπό αυτές τις συνθήκες είναι συχνή η ταυτόχρονη λοίμωξη με περισσότερους από έναν οροτύπους εντεροϊών (Parks et al., 1969). Ο συγχρωτισμός είναι επίσης πιθανότατα η αιτία που στις ανεπτυγμένες χώρες παρουσιάζεται αυξημένη επίπτωση των λοιμώξεων στις αστικές περιοχές σε σχέση με τις αγροτικές (Mogens et al., 1995).



Η επίπτωση της νόσου από εντεροϊούς είναι πιο συχνή στους άνδρες από ότι στις γυναίκες, με μια σχέση ανδρών - γυναικών που κυμαίνεται μεταξύ 1,5:1 και 2,5:1 (Mogens et al., 1995). Οι λοιμώξεις με εντεροϊούς παρατηρούνται συνήθως σε υγιή, ανοσοεπαρκή άτομα και δεν έχει μελετηθεί εάν είναι αυξημένη η επίπτωσή τους στους ανοσοκατασταλαμένους. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι, σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (ηλικιωμένοι, βρέφη, ασθενείς υπό χημειοθεραπεία ή ανοσοκατασταλτική θεραπεία, συγγενείς και επίκτητες διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως λοίμωξη με HIV και ασθενείς με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο) και πιο συγκεκριμένα σε άτομα με διαταραχή του χυμικού σκέλους της ανοσίας, ο ιός πολλαπλασιάζεται εντός του εντέρου για μεγάλα χρονικά διαστήματα (έως και δέκα έτη) και έτσι τα άτομα αυτά εμφανίζουν έως και 3000 φορές υψηλότερο κίνδυνο για παραλυτική πολιομυελίτιδα (Bellmunt et al., 1999; Martin et al., 2000).

Η συχνότητα με την οποία παρατηρούνται συγκεκριμένοι ορότυποι εντεροϊών ποικίλλει σημαντικά. Οι πολιοϊοί που κυκλοφορούν στις ανεπτυγμένες χώρες είναι σχεδόν αποκλειστικά στελέχη του εμβολίου. Αντίθετα, στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου η νόσος ενδημεί, απομονώνονται 'άγρια' στελέχη. Οι τρεις ορότυποι των πολιοϊών συνήθως κυκλοφορούν ταυτόχρονα, παρόλο που ένας ή δύο από τους τρεις μπορεί να επικρατούν ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή (Modlin, 2000a). Οι ορότυποι των εντεροϊών που ενδημούν σε μια συγκεκριμένη περιοχή κυκλοφορούν ανάμεσα σε μη άνοσα άτομα, συνήθως παιδιά (Melnick, 1996). Επιπλέον, παρανόμως μετακινούμενοι πληθυσμοί όπως πχ. οι οικονομικοί μετανάστες ή ακόμα θρησκευτικές μειονότητες που αρνούνται τον εμβολιασμό, μπορούν να αποτελέσουν 'θύλακες' μη ανοσοποιημένων ατόμων μέσα στον ευρύτερο πληθυσμό (Τσότσος, 1992). Ορισμένοι ορότυποι παρουσιάζουν περιοδικότητα σε μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή στο πέρασμα του χρόνου, προκαλώντας σποραδικές ή επιδημικές λοιμώξεις με ελάχιστα μεταξύ των επιδημιών κρούσματα, ενώ άλλοι απομονώνονται με χαμηλότερη συχνότητα (Muir et al., 1998). Οι ορότυποι που

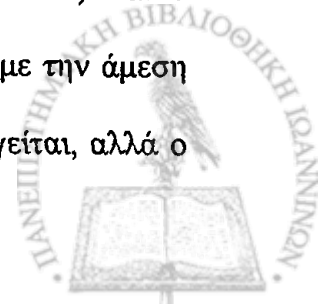


απομονώνονται συχνότερα είναι οι ιοί Coxsackie A9, A16 και B1 έως B5, καθώς και οι ιοί Echo 6, 9, 11, 16 και 30 (Drew, 2001). Οι ορότυποι αυτοί έχουν παγκόσμια διασπορά και κάθε χρόνο υπάρχει η τάση ένας από αυτούς να επικρατεί. Στις ΗΠΑ, οι λοιμώξεις με ιούς Echo αποτελούν περισσότερες από το 50% των περιπτώσεων λοιμώξεων με εντεροϊούς πλην των πολιοϊών (non-polio enteroviruses, NPEVs), ενώ οι ιοί Cosackie B το 25% (Strikas et al., 1986). Η απουσία ή περιορισμένη διασπορά οροτύπων σε έναν πληθυσμό για αρκετά χρόνια, ενέχει τον κίνδυνο μιας ευρείας και ταχύτατης διασποράς των ιών αυτών στον πληθυσμό με τη μορφή επιδημίας (Melnick, 1996). Το γιατί συγκεκριμένοι ορότυποι εμφανίζονται και εξαφανίζονται, καθώς και οι αιτίες για την ενδημική ή επιδημική κυκλοφορία των εντεροϊών δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Κάποια επιδημικά στελέχη, όπως για παράδειγμα ο ιός Echo 9, μπορεί να είναι περισσότερο μεταδοτικά, 'εξαντλώντας' έτσι τον ευπαθή πληθυσμό, ενώ άλλα μπορούν να ενδημούν για χρόνια καθώς είναι λιγότερο μεταδοτικά.

4.2 Τρόποι μετάδοσης

Οι εντεροϊοί είναι ιδιαίτερα μεταδοτικοί. Η κακή υγιεινή και οι συνθήκες συγχρωτισμού διευκολύνουν τη μετάδοσή τους. Ο άνθρωπος αποτελεί τον φυσικό ξενιστή και φαίνεται ότι η στενή επαφή μεταξύ των ατόμων συμβάλλει στην εξάπλωση των λοιμώξεων (Melnick, 1996). Δεν υπάρχουν ενδείξεις μετάδοσης από τα ζώα.

Η κύρια οδός διασποράς των εντεροϊών είναι η κοπρανοστοματική. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αποβάλλονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το γαστρεντερικό σύστημα σε σχέση με τα άλλα συστήματα πχ. το αναπνευστικό. Ωστόσο, υπάρχουν και χαρακτηριστικές εξαιρέσεις, όπως ο ιός Coxsackie A21 που προκαλεί λοιμώξεις του ανωτέρου αναπνευστικού και μεταδίδεται με τις εκκρίσεις (Couch et al., 1970) και ο εντεροϊός 70 που προκαλεί οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα και μεταδίδεται με την άμεση επαφή (Hierholzer et al., 1975). Η μετάδοση από άτομο σε άτομο πιθανολογείται, αλλά ο



μηχανισμός αυτός δεν έχει μελετηθεί πειραματικά. Καλό πλύσιμο των χεριών με νερό και σαπούνι φαίνεται ότι δεν εξαλείφει πλήρως τον πολιοϊό από τα χέρια (Schurmann & Eggers, 1985).

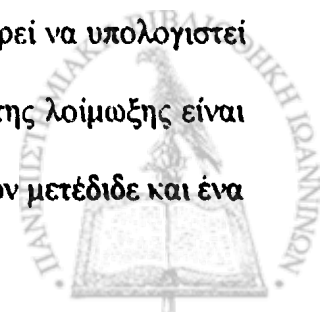
Διάφοροι ορότυποι εντεροϊών έχουν απομονωθεί από αστικά λύματα, λιμνάζοντα και θαλασσινά νερά, ιδιαίτερα τους καλοκαιρινούς μήνες (Horstmann et al., 1973; Krikelis et al., 1988). Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι τα επιφανειακά ύδατα και τα αστικά απόβλητα αποτελούν πηγή μόλυνσης για το γενικό πληθυσμό μέσω του πόσιμου νερού, των εντόμων και της χρήσης των λυμάτων ως λίπασμα (Melnick, 1996; Drew, 2001). Ωστόσο, παρόλο που έχουν απομονωθεί εντεροϊοί από μύγες, κατσαρίδες, κόπρανα σκύλων και τροφές που εκτέθηκαν σε μολυσμένα έντομα, η μετάδοση των εντεροϊών μέσω αυτών δεν έχει αποδειχθεί (Modlin, 2000a).

Η αιματογενής μετάδοση των εντεροϊών έχει προταθεί (Morens et al., 1995). Φαίνεται ότι η πρώιμη πρωτοπαθής λοίμωξη (εντός 4 ημερών από τη γέννηση) προκαλεί σοβαρές νεογνικές λοιμώξεις - ακόμη και θανατηφόρες, ενώ λοιμώξεις που συμβαίνουν αργότερα στην νεογνική ή παιδική ηλικία είναι ηπιότερες.

Οι εντεροϊοί εξαπλώνονται ταχύτερα εντός της ίδιας οικογένειας, ιδιαίτερα από τα μικρά παιδιά και η έκταση της λοίμωξης φαίνεται ότι σχετίζεται με τη διάρκεια αποβολής του ιού (Melnick, 1996). Επαναλοίμωξη, με την έννοια της αποβολής του ιού από ένα άτομο που διαθέτει αντισώματα για τον συγκεκριμένο ορότυπο, μπορεί να συμβεί, αλλά χωρίς να συνοδεύεται από νόσηση. Η διάρκεια της αποβολής του ιού είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με την πρωτοπαθή λοίμωξη (Fox, 1958).

4.3 Περίοδος επώασης

Η περίοδος επώασης για τις λοιμώξεις από εντεροϊούς σπάνια μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια. Ο χρόνος έκθεσης είναι συνήθως άγνωστος, καθώς η πηγή της λοίμωξης είναι ένα ασυμπτωματικό άτομο που μεταδίδει τον ιό στον ίδιο βαθμό που θα τον μετέδιδε και ένα



άτομο με τη νόσο. Κατά συνέπεια, η περίοδος επώασης κυμαίνεται μεταξύ 2 έως 10 ημέρες και στην πραγματικότητα είναι συνήθως 3 έως 5 ημέρες. Μπορεί όμως να είναι μεγαλύτερη ανάλογα με το στέλεχος, το όργανο-στόχο και την ηλικία του ξενιστή. Οι ασθενείς με λοίμωξη από εντεροϊούς, αποβάλλουν τον ιό στις εκκρίσεις του φάρυγγα και στα κόπρανα για αρκετές ημέρες πριν την έναρξη των συμπτωμάτων και συνεχίζουν να εκκρίνουν ιικά σωματίδια στα κόπρανα για πολλές εβδομάδες μετά. Ο χρόνος έκθεσης στον ιό μπορεί επομένως να είναι ιδιαίτερα μεγάλος. Ωστόσο, η περίοδος της υψηλότερης μεταδοτικότητας θεωρείται ότι είναι στην έναρξη της νόσου, όταν η αποβολή του ιού είναι μεγαλύτερη (Modlin, 2000a).

4.4 Μοριακή επιδημιολογία

Στη μελέτη της επιδημιολογίας των λοιμώξεων με εντεροϊούς έχουν συμβάλει σημαντικά οι νεότερες μοριακές τεχνικές. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται η ανοσοαποτύπωση ("fingerprinting"), η τεχνολογία των ιχνηθετών, η ενίσχυση και ο προσδιορισμός καθορισμένων RNA νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), η ανάλυση πολυμορφισμού με τη χρήση ενζύμων περιορισμού και ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) διαφόρων RNA γονιδίων ή και του συνόλου του γενώματος. Οι μέθοδοι αυτές αρχικά χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα για τη διάκριση μεταξύ 'αγρίων' στελεχών και στελεχών εμβολίου (Kew, 1988; Yang et al., 1991), καθώς και για την παρακολούθηση της επιδημικής διασποράς του πολιοϊού οροτύπου 1 (Hatch et al., 1981), του ιού Coxsackie A24 (Lin et al., 1993), και του Enterovirus 70 (Takeda et al., 1984; Miyamura et al., 1986), με τον καθορισμό του βαθμού ομοιότητας των βάσεων RNA μεταξύ των διαφόρων απομονωθέντων στελεχών. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του ιϊκού RNA (sequencing) αποτελεί την καλύτερη τεχνική για τον προσδιορισμό των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών πολιοϊού του ίδιου οροτύπου.



4.5 Εντεροϊοί και περιβάλλον

Κατά προσέγγιση, 140 ιοί είναι δυνατό να απομονωθούν σε περιβαλλοντικά δείγματα, κυρίως τα επιφανειακά ύδατα και τα αστικά λύματα (Rusin et al., 2000). Οι εντεροϊοί είναι οι συχνότερα ανιχνευόμενοι ιοί στο περιβάλλον. Το γένος των εντεροϊών αποτελεί το σημαντικότερο μέλος της οικογένειας των Picornaviridae από την άποψη της παθογένειας στον άνθρωπο.

Οι εντεροϊοί εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό με την κοπρανοστοματική οδό, πολλαπλασιάζονται στο γαστρεντερικό σύστημα, και τελικά απορρίπτονται στο περιβάλλον με τα κόπρανα. Παρόλο που ανευρίσκονται σε νερά που έχουν μολυνθεί από λύματα, η υδατογενής μετάδοσή τους έχει επιβεβαιωθεί περιστασιακά, λόγω του ότι οι λοιμώξεις που μεταδίδονται υδατογενώς είναι στην πλειοψηφία τους υποκλινικές (Rusin et al., 2000). Οι συνήθεις επιδημιολογικές τεχνικές διαθέτουν χαμηλή ευαισθησία για να ανιχνεύσουν το χαμηλό τίτλο των ιών (Melnick, 1996). Δεν υπάρχουν επίσης σαφείς αποδείξεις ότι είναι δυνατή η μετάδοση των εντεροϊών μέσω της κατάποσης νερού σε μολυσμένες πισίνες (Mogens et al., 1995). Τέλος, υδατογενείς επιδημίες από εντεροϊούς που αποδίδονται στην κατανάλωση μαλακίων και θαλασσινών δεν έχουν αποδειχθεί (Modlin, 2000a).

Προγράμματα περιβαλλοντικής επιτήρησης έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν για την παρακολούθηση και καταγραφή της κυκλοφορίας των ιών του γαστρεντερικού συστήματος στο γενικό πληθυσμό. Η περιβαλλοντική επιτήρηση μπορεί να συμβάλλει στον εντοπισμό της εστίας, στην εκτίμηση της έκτασης και διάρκειας της επιδημικής κυκλοφορίας των πολιοϊών, στη συσχέτιση στελεχών / οροτύπων με την κλινική εικόνα και είναι σε θέση να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα για τους τρόπους μετάδοσης και βιολογικής εξέλιξης των εντεροϊών.

Ο έλεγχος των αστικών λυμάτων έχει αποδειχθεί χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση 'αγρίων' στελεχών πολιοϊών στον γενικό πληθυσμό, περισσότερο από ότι η ίδια η



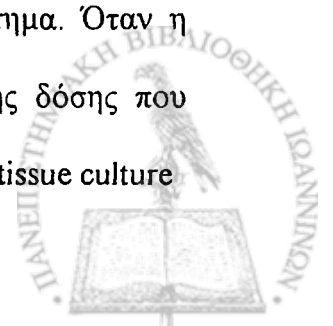
επιδημιολογική καταγραφή της οξείας παράλυσης (acute flaccid paralysis, AFP) (Grabow et al., 1999). 'Άγρια' στελέχη πολιοϊών απομονώθηκαν στα λύματα, ενώ την ίδια στιγμή δεν ήταν δυνατό να απομονωθούν από ασθενείς με οξεία παράλυση (Bottinger et al., 1992; Metcalf et al., 1995; Van der Avoort et al., 1995).

5. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ - ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η παθογένεια των λοιμώξεων από εντεροϊούς έχει μελετηθεί εκτεταμένα στην περίπτωση του ιού της πολιομυελίτιδας τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο (Bodian, 1952; Sabin, 1955; Sabin, 1956; Horstmann & McCollum, 1953; Ogra & Karzon, 1971). Παρόλο που δεν υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα για τους υπόλοιπους εντεροϊούς, φαίνεται ότι ο παθογενετικός μηχανισμός τους είναι ανάλογος με αυτόν των πολιοϊών, με εξαίρεση τα όργανα-στόχους που προσβάλλονται μετά το αρχικό στάδιο της αιμίας (Melnick, 1996). Υπάρχουν αρκετά κοινά κλινικά χαρακτηριστικά, ωστόσο παρατηρείται μεγάλο εύρος και σημαντική ποικιλία στον τροπισμό κάθε ιού (Dagan et al., 1995).

Οι εντεροϊοί προκαλούν νόσο στον άνθρωπο κυρίως μέσω της κοπρανοστοματικής οδού (Εικόνα 6). Ο ιός εισέρχεται στο πεπτικό σύστημα από το στόμα, εμφυτεύεται και πολλαπλασιάζεται στο φάρυγγα και σε απομακρυσμένα τμήματα του εντέρου. Το ακριβές σημείο εισόδου και αρχικού πολλαπλασιασμού του ιού στο γαστρεντερικό σύστημα δεν έχει προσδιορισθεί, ωστόσο έχει επισημανθεί η παρουσία εντεροϊών εντός των Μ κυττάρων του εντερικού επιθηλίου, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση των ιών Reovirus (Wolf et al., 1981).

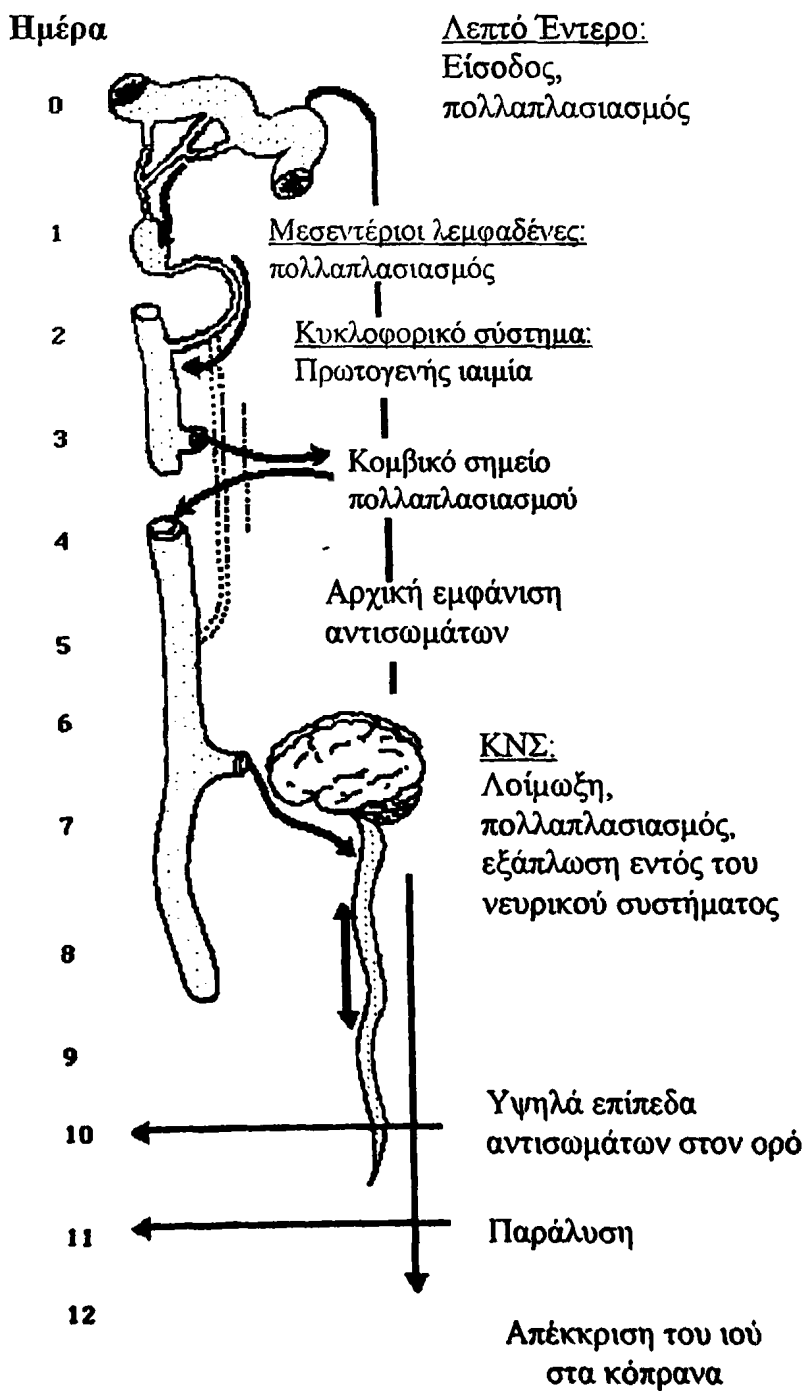
Ο πολλαπλασιασμός των εντεροϊών στο λεμφικό ιστό του λεπτού εντέρου μπορεί να ανιχνευθεί 1 έως 3 ημέρες μετά την είσοδό τους στο γαστρεντερικό σύστημα. Όταν η ποσότητα του πολιοϊού είναι μεγαλύτερη από 10^6 της μέσης μολυσματικής δόσης που προκαλεί κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις στο 50% της κυτταροκαλλιέργειας (tissue culture



Εικόνα 6. Παθογένεια λοίμωξης από πολιοϊό

(Προσαρμογή από Cann A (1999) Course BS335: Virology. Διαδικτυακός τόπος

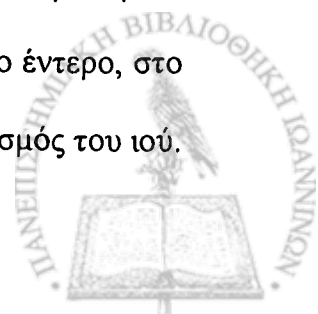
<http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Picornaviruses.html> [πρόσβαση 3-2005])



infective dose, TCID₅₀), ο ιός απεκκρίνεται τόσο από το στοματοφάρυγγα όσο και από τα κόπρανα. Σε μικρότερη λοιμογόνο δόση (<10⁵ TCID₅₀), ο ιός απεκκρίνεται μόνο από τα κόπρανα (Sabin, 1955). Επιπρόσθετα, ο ιός βρίσκεται σε αρκετά μικρότερη ποσότητα στις αμυγδαλές από ότι στις πλάκες του Peyer, όπου μπορεί να φθάσει το φορτίο των 10⁷-10⁸ TCID₅₀/g. Η μέγιστη διάρκεια αποβολής του ιού είναι 3 έως 4 εβδομάδες από τον φάρυγγα και 5 έως 6 εβδομάδες ή και περισσότερο από τα κόπρανα. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι οι πολιοϊοί πολλαπλασιάζονται επαρκέστερα στο βλεννογόνο του εντέρου και ειδικότερα στον ειλέο.

Μετά τον πολλαπλασιασμό στον υποβλεννογόνο λεμφικό ιστό, οι εντεροϊοί περνούν στους επιχώριους λεμφαδένες (τραχηλικούς, μεσεντέριους) και προκαλούν παροδική «ελάσσονα» ιαιμία η οποία συνήθως δεν ανιχνεύεται. Ο ιός διασπείρεται αιματογενώς στο δικτυενδοθηλιακό σύστημα (ΔΕΣ) σε όργανα όπως το ήπαρ, ο σπλήνας, ο μυελός των οστών και οι εν τω βάθει λεμφαδένες. Στις υποκλινικές λοιμώξεις, οι οποίες απαντώνται συχνότερα, ο πολλαπλασιασμός του ιού σταματά αυτομάτως ή μετά την αντίδραση του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή. Ωστόσο, στην μειοψηφία των νοσούντων ατόμων, η συνέχιση του πολλαπλασιασμού του ιού στις παραπάνω θέσεις του ΔΕΣ, έχει σαν αποτέλεσμα μία εμμένουσα, «μείζονα» ιαιμία, η οποία εξελίσσεται ταυτόχρονα με την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων της «ελάσσονος» ιαιμίας. Η πρόδρομη φάση της ιαιμίας έχει παρατηρηθεί με άγρια στελέχη πολιοϊών (Davis & Melnick, 1957) και ιών Echo (Yoshioka & Horstmann, 1960), αλλά είναι σπάνια σε στελέχη του εμβολίου Sabin πλην του οροτύπου 2 (Horstmann et al., 1964).

Η «μείζων» ιαιμία έχει σαν αποτέλεσμα τη διασπορά στα όργανα-στόχους, όπως οι μήνιγγες, η καρδιά και το δέρμα. Στους ιστούς αυτούς παρατηρούνται ιστική νέκρωση και φλεγμονώδεις βλάβες, ενώ ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις δεν παρατηρούνται στο έντερο, στο λεμφικό σύστημα και το ΔΕΣ, όπου και λαμβάνει χώρα ο αρχικός πολλαπλασιασμός του ιού.



Στα όργανα-στόχους, ο βαθμός της φλεγμονώδους βλάβης και της ιστικής νέκρωσης είναι ευθέως ανάλογος του τίτλου του ιού. Στα πειραματόζωα η σοβαρότητα της λοίμωξης ενισχύεται από την έντονη άσκηση, την έκθεση στο κρύο, τον υποσιτισμό, την εγκυμοσύνη και την ανοσοκαταστολή λόγω λήψης κορτικοστεροειδών ή ακτινοβολίας (Modlin JF, 2000a).

Οι εντεροϊοί παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων κατά τον πολλαπλασιασμό τους στο πεπτικό σύστημα. Τα λάθη κατά τη μεταγραφή του μονόκλωνου RNA συμβαίνουν με συχνότητα 1 για κάθε 10^4 αζωτούχες βάσεις. Μονοσημειακές μεταλλάξεις παρατηρούνται συχνά στην 5' μη-κωδική περιοχή των ζώντων εξασθενημένων στελεχών πολιοϊών εμβολίου, μέρες μόνο μετά τη χορήγησή τους. Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με μακροχρόνια αποβολή των στελεχών του εμβολίου από το γαστρεντερικό σύστημα, και πιθανά με αυξημένη λοιμογόνο δύναμη αυτών εντός του νευρικού συστήματος (Jameson et al., 1985; Minor et al., 1986).

Η ταυτόχρονη λοίμωξη του ίδιου κυττάρου με διαφορετικά στελέχη εντεροϊών μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ανασυνδυασμένων στελεχών, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για στελέχη του ίδιου οροτύπου. Ανασυνδυασμοί μεταξύ στελεχών διαφορετικών οροτύπων είναι λιγότερο συχνοί, αλλά ωστόσο έχουν παρατηρηθεί *in vitro* σε 1 ανά 10^4 έως 1 ανά 10^5 λοιμογόνα ιικά σωματίδια (Tolskaya et al., 1983), καθώς επίσης και στα κόπρανα παιδιών που τους έχει χορηγηθεί το από του στόματος τριδύναμο εμβόλιο κατά της πολιομυελίτιδας (Kew & Nottay, 1985)

Η ανοσία στις λοιμώξεις από εντεροϊούς είναι ειδική για τον ορότυπο. Αμυντικοί μηχανισμοί του χυμικού σκέλους της ανοσίας είναι παρόντες τόσο στο πεπτικό σύστημα για την πρόληψη της εμφύτευσης του ιού, όσο και στην αιματογενή κυκλοφορία για την παρεμπόδιση της διασποράς των ιών στα όργανα-στόχους. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι, ακόμη και ελάχιστες ποσότητες ειδικών εξουδετερωτικών αντισωμάτων



προλαμβάνουν την ιαιμία και την παράλυση (Bodian & Nathanson, 1960). Παθητική ανοσία στην παραλυτική νόσο επιτυγχάνεται με τη χορήγηση άνοσης σφαιρίνης πριν την έκθεση στον πολιοϊό (Hammon et al., 1952; Stevens, 1959). Η παρεντερική χορήγηση ανοσοσφαιρίνης δεν τροποποιεί την εξέλιξη της παραλυτικής νόσου (Bahlke & Perkins, 1945). Δεν έχει αποδειχθεί η χρησιμότητα της χορήγησης ανοσοσφαιρίνης σε άλλες συστηματικές λοιμώξεις από εντεροϊούς (Modlin, 2000a).

Ειδικό IgA αντίσωμα εμφανίζεται στις ρινικές εκκρίσεις 2-4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση από του στόματος εμβολίου ζώντων εξασθενημένων πολιοϊών, και εξακολουθεί να παράγεται για τουλάχιστον 15 χρόνια (Horstmann & McCollum, 1953). Στο πεπτικό σύστημα η ανοσία είναι σχετική. Σε επανέκθεση στον ιό, οι υψηλοί τίτλοι εκκριτικής IgA στον οροφάρυγγα προλαμβάνουν ή μειώνουν σημαντικά την απέκκριση του πολιοϊού (Horstmann et al., 1964). Παρόμοια αναστολή του πολλαπλασιασμού των IgA αντισωμάτων έχει παρατηρηθεί και στο λεπτό έντερο (Ogra & Karzon, 1969). Αντισώματα έναντι των εντεροϊών είναι παρόντα στο μητρικό γάλα και μπορεί να επηρεάσουν τον πολλαπλασιασμό του ιού σε παιδιά που θηλάζουν και λαμβάνουν το εμβόλιο από του στόματος (Warren et al., 1964). Μητρικά αντισώματα που αποκτώνται παθητικά είτε διαπλακουντιακά είτε μέσω του μητρικού γάλακτος, επηρεάζουν την εξέλιξη των λοιμώξεων από εντεροϊούς, είτε προλαμβάνοντας τη λοίμωξη είτε προκαλώντας υποκλινικές λοιμώξεις (Warren et al., 1964; Modlin et al., 1981).

Στον ορό, IgM και IgG αντισώματα παράγονται 1 έως 3 ημέρες μετά την επαφή με τον ιό. Τα IgM αντισώματα κυριαρχούν κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα και εξαφανίζονται 2-3 μήνες μετά τον εμβολιασμό (Horstmann & McCollum, 1953). Τα IgG αντισώματα ανήκουν κυρίως στους υποτύπους IgG1 και IgG3 (Torfason et al., 1987). Η παραγωγή IgA ανοσοσφαιρίνης στον ορό, η οποία είναι ανιχνεύσιμη μεταξύ 2^{ης} και 6^{ης}



εβδομάδας, είναι συνήθως μικρή. Εξουδετερωτικά IgG αντισώματα παραμένουν στον ορό εφόρου ζωής μετά από φυσική λοίμωξη με εντεροϊούς (Εικόνα 7).

Ασθενείς με ανεπάρκεια παραγωγής εξουδετερωτικών αντισωμάτων παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα για εμμένουσες λοιμώξεις από εντεροϊούς (McKinney et al., 1987). Υπάρχουν τόσο εργαστηριακές όσο και κλινικές ενδείξεις ότι, η χυμική ανοσία δεν επαρκεί για τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού των εντεροϊών στα όργανα-στόχους. Η λειτουργία των μακροφάγων είναι εξίσου σημαντική για την ανοσιακή απάντηση (Roger-Zisman & Allison, 1973; Woodruff, 1979). Επιπλέον, δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα έδειξαν ότι, ενώ ο περιορισμός της δράσης των μακροφάγων οδηγεί σε σοβαρότερες λοιμώξεις από ιούς Coxsackie B (Roger-Zisman & Allison, 1973), η αναστολή της δράσης των T-λεμφοκυττάρων έχει μικρή επίδραση στην εξέλιξη των λοιμώξεων (Woodruff & Woodruff, 1974). Άτομα με ανεπάρκεια του κυτταρικού σκέλους της ειδικής ανοσίας δεν είναι ευάλωτα σε σοβαρές και μεγάλης διάρκειας λοιμώξεις από εντεροϊούς, παρά μόνο εφόσον συνυπάρχει δυσλειτουργία των B-λεμφοκυττάρων. Παρόλο που τα T-λεμφοκύτταρα δεν αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των εντεροϊών, υπάρχουν ενδείξεις ότι η δράση των T-λεμφοκυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο σε ορισμένα ανοσοπαθολογικά φαινόμενα μετά την αρχική φάση της λοίμωξης (Rose et al., 1986).

6. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

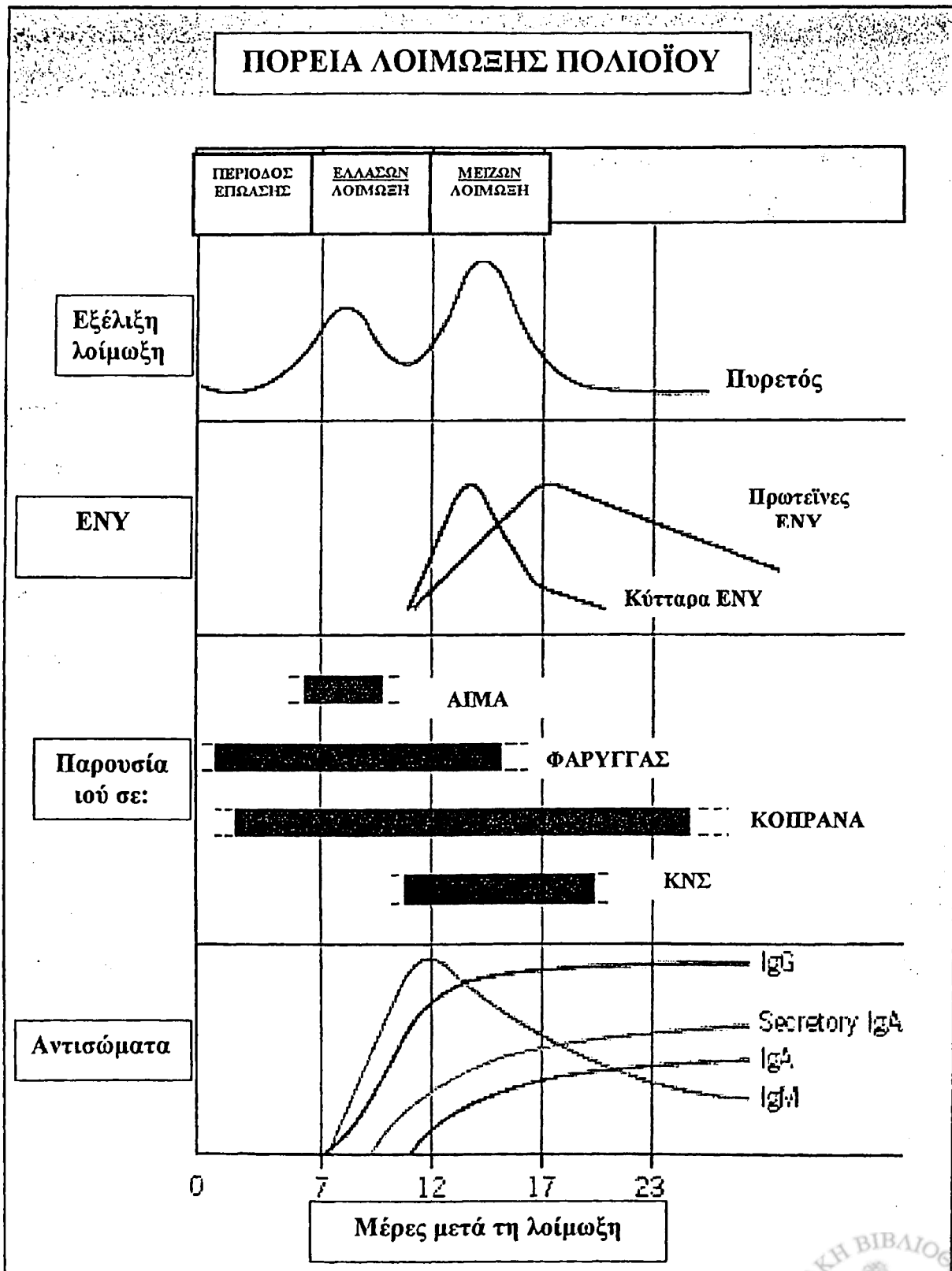
6.1 Λοίμωξη από τον ιό της πολιομυελίτιδας

Η κλινική εικόνα της λοίμωξης με πολιοϊό κυμαίνεται από την ασυμπτωματική λοίμωξη μέχρι τη θανατηφόρο παραλυτική πολιομυελίτιδα. Το 95% των λοιμώξεων είναι ασυμπτωματικές και μπορούν να διαγνωσθούν με την απομόνωση του ιού στα κόπρανα, στον οροφάρυγγα ή με την εύρεση αυξημένου τίτλου αντισωμάτων. Η εκτρωτική μορφή της νόσου που αποτελεί το 4-8% των περιπτώσεων, περιλαμβάνει πυρετό, κεφαλαλγία,



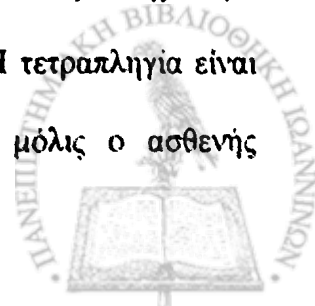
Εικόνα 7. Πορεία της λοίμωξης με πολιοϊό

(Προσαρμογή από Cohen & Powderly. *Infectious Diseases*, 2nd Edition, Mosby, 2004).



ανορεξία, εμετό, πονόλαιμο και κοιλιακό άλγος. Η νευρολογική εξέταση είναι φυσιολογική. Η διάρκεια της νόσου κυμαίνεται από λίγες ώρες έως 2-3 ημέρες. Η λοίμωξη δεν μπορεί να διακριθεί κλινικά από άλλες ιογενείς λοιμώξεις και η υποψία της διάγνωσής της συνήθως τίθεται κατά τη διάρκεια μιας επιδημίας. Η μη-παραλυτική πολιομυελίτιδα συνοδεύεται από σημεία μηνιγγικής προσβολής. Η νόσος παρουσιάζεται με την εικόνα της άσηπτης μηνιγγίτιδας. Οι συστηματικές εκδηλώσεις της μη-παραλυτικής πολιομυελίτιδας είναι πιο σοβαρές σε σχέση με την εκτρωτική μορφή (Modlin, 2000b).

Η παραλυτική πολιομυελίτιδα αποτελεί το 0,1% των λοιμώξεων από πολιοϊό. Στα παιδιά είναι συχνή μια διφασική πορεία εξέλιξης με «ελάσσονα» και «μείζονα» λοίμωξη (Horstmann, 1949). Η ήπια λοίμωξη, που συνδυάζεται με τη φάση της αιμίας, εμφανίζει την εικόνα της εκτρωτικής πολιομυελίτιδας και διαρκεί 1-3 ημέρες. Εν συνεχεία, ο ασθενής αναρρώνει και παραμένει ασυμπτωματικός για 2-5 ημέρες, μέχρι την οξεία έναρξη της μείζονος λοίμωξης. Τα συμπτώματα πριν την παράλυση ανήκουν στην κλινική εικόνα της μηνιγγίτιδας με πονοκέφαλο, πυρετό, κακουχία, εμετό, αυχενική δυσκαμψία και αύξηση των λευκοκυττάρων στο ΕΝΥ. Ο πυρετός 37-39°C συνοδεύεται από ρίγος. Στους ενήλικες η νόσος εξελίσσεται μονοφασικά και όχι διφασικά, ωστόσο πριν την προοδευτική έναρξη της παράλυσης προηγείται μια πιο παρατεταμένη περίοδος πρόδρομων συμπτωμάτων (Weinstein et al., 1952). Σπανιότατα η παράλυση αποτελεί την πρώτη εκδήλωση της νόσου, ενώ οι έντονες μυαλγίες, ειδικά σε ηλικιωμένα άτομα, υποδηλώνουν την έναρξη της μείζονος λοίμωξης. Η σοβαρότητα της νόσου ποικίλλει από την αδυναμία τμήματος ενός μόνο μυός μέχρι την ολική τετραπληγία. Η παράλυση είναι χαλαρή και έχει χαρακτηριστικά ασύμμετρη κατανομή, κατά την οποία επηρεάζονται επιλεκτικά ορισμένες μόνο μυϊκές ομάδες. Οι εγγύς μύες των άκρων προσβάλλονται πιο συχνά από τους περιφερικούς, τα κάτω άκρα συχνότερα από τα άνω και οι μεγάλες μυϊκές ομάδες του χεριού από τις μικρές. Η τετραπληγία είναι πολύ σπάνια στα παιδιά. Η εξέλιξη της παράλυσης αναστέλλεται μόλις ο ασθενής



απυρετήσει (Horstmann, 1949). Η μορφή της προμηκικής παράλυσης διαφέρει από αυτήν της νωτιαίας και αφορά ομάδες μυών που νευρώνονται από κρανιακά νεύρα. Εκδηλώνεται με δυσφαγία, ένρινη ομιλία και σπανιότερα δύσπνοια, σύγχυση, κώμα και τελικά θάνατο (Spencer et al., 1960).

Οι σημαντικότερες επιπλοκές της παραλυτικής πολιομυελίτιδας αφορούν στο αναπνευστικό σύστημα και οδηγούν σε αναπνευστική ανεπάρκεια. Η παράλυση των αναπνευστικών μυών αφορά το διάφραγμα και τους μεσοπλεύριους μυς. Είναι επίσης δυνατό να προκληθεί πνευμονικό οίδημα και πνευμονική εμβολή. Άλλες επιπλοκές περιλαμβάνουν μυοκαρδίτιδα (Galpine & Wilson, 1959) και γαστρεντερικές διαταραχές πχ. αιμορραγία ή παραλυτικό ειλέο (Neu, 1958). Η θνητότητα της παραλυτικής πολιομυελίτιδας, βάσει δεδομένων από την εποχή που αυτή ήταν επιδημική, κυμαίνεται από 5-60% (Modlin, 2000b).

6.2 Λοιμώξεις από τους ιούς Coxsackie, Echo και τους λοιπούς εντεροϊούς

Τα υπόλοιπα μέλη του γένους των εντεροϊών πλην των πολιοϊών (non-polio enteroviruses, NPEVs), δηλαδή οι ιοί Coxsackie ομάδας Α και Β, οι ιοί Echo και οι νεότεροι εντεροϊοί, έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τους πολιοϊούς, όσον αφορά στη δομή, στις φυσικοχημικές ιδιότητες, στην αναπαραγωγή, στην παθογένεια και στην επιδημιολογία τους. Πάνω από το 90% των λοιμώξεων από NPEVs παραμένουν ασυμπτωματικές (Kogon et al., 1969). Όταν προκαλούνται συμπτώματα, η σοβαρότητα των κλινικών εκδηλώσεων ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, αλλά και την υποομάδα, τον ορότυπο και την ενδο-οροτυπική ποικιλομορφία του ίδιου του ιού. Αρκετοί εντεροϊοί είναι συχνά υπεύθυνοι για επιδημίες που εμφανίζονται με τη μορφή ειδικού συνδρόμου με συγκεκριμένα συμπτώματα, ενώ είναι δυνατό οι ίδιοι ορότυποι των εντεροϊών να εμπλέκονται σε σποραδικές ή επιδημικές λοιμώξεις ασυμπτωματικές ή με ποικιλία άλλων



κλινικών εκδηλώσεων (Melnick, 1996). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται το σύνολο των κλινικών συνδρόμων που προκαλούνται από εντεροϊούς.

6.2.1 Οξεία άσηπτη μηνιγγίτιδα

Η οξεία άσηπτη μηνιγγίτιδα χαρακτηρίζεται από σημεία και συμπτώματα μηνιγγικού ερεθισμού και πλειοκύτωσης του ΕΝΥ με χαρακτηριστική απουσία βακτηρίων ή μυκήτων. Η διάρκεια της μηνιγγίτιδας είναι συνήθως λιγότερο από μια εβδομάδα, σε ενήλικες ασθενείς όμως κάποια συμπτώματα μπορεί να επιμείνουν για αρκετές εβδομάδες (Rotbart, 1998). Οι ιοί Coxsackie ομάδας Β και οι ιοί Echo είναι υπεύθυνοι για περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων άσηπτης μηνιγγίτιδας ιογενούς αιτιολογίας, η οποία είναι άλλωστε και η συχνότερη (Berlin et al., 1993). Παρά το γεγονός ότι πολλοί ορότυποι έχουν αναφερθεί ως υπεύθυνοι για την πρόκληση άσηπτης μηνιγγίτιδας, οι κύριοι υπεύθυνοι ορότυποι για νοσήματα του ΚΝΣ είναι οι CBV 1-6, CAV 7 και CAV 9, ECV 4, 6, 9, 11, 14, 16, 25, 30, 31, 33 (Melnick, 1996) και ο ENV 71 (Huang et al., 1999), ενώ με μεγαλύτερη συχνότητα ενοχοποιούνται οι ιοί CBV 2 και 5 (Modlin, 2000c) και οι CAV 9, ECV 7, 9, 11, 19 και 30 (Atkinson et al., 1998).

Τη μεγαλύτερη συχνότητα άσηπτης μηνιγγίτιδας παρουσιάζουν τα βρέφη κάτω των 3 μηνών (Rorabaugh et al., 1993). Μικρό μόνο ποσοστό των βρεφών αυτών παρουσιάζει νευρολογική συμπτωματολογία (Dagan et al., 1988). Η σοβαρότητα της μηνιγγικής και νευρολογικής συμπτωματολογίας ποικίλλει αρκετά στα μεγαλύτερα παιδιά και τους ενήλικες. Η έναρξη των συμπτωμάτων μπορεί να είναι προοδευτική ή και οξεία. Ο ασθενής παρουσιάζει χαρακτηριστικά πρόδρομα συμπτώματα όπως πυρετός, ρίγος και κεφαλαλγία. Τα σημεία Kernig και Brudzinski παρατηρούνται μόλις στο ένα τρίτο των περιπτώσεων. Συχνά συνυπάρχουν συμπτώματα φαρυγγίτιδας και λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού



Πίνακας 2. Σχέση οροτύπου και κλινικών συνδρόμων από εντεροϊούς

(Προσαρμογή από Cohen & Powderly. *Infectious Diseases*, 2nd Edition, Mosby, 2004).

ΙΟΙ	ΟΡΟΤΥΠΟΣ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ
ΠΟΛΙΟΪΟΙ	1-3	Εκτρωτική πολιομυελίτιδα Μη-παραλυτική πολιομυελίτιδα (άσηπτη μηνιγγίτιδα) Παραλυτική πολιομυελίτιδα Σύνδρομο μετά από πολιομυελίτιδα
ΙΟΙ COXSACKIE Ομάδα Α	2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 10 2, 4, 7, 9, 10 7, 9 4, 14, 16 4, 5, 6, 9, 16 4, 5, 9, 10, 16 9, 16 21, 24 4, 9 18, 20, 21, 22, 24 24	Ερπητική κονάγχη Φαρυγγοαμυγδαλίτιδα Άσηπτη μηνιγγίτιδα Παράλυση (σπάνια) Μυοκαρδίτις, περικαρδίτις Εξάνθημα Νόσος χεριών, ποδιών, στόματος Πνευμονίτιδα (παιδιά) Κοινό κρυολόγημα Ηπατίτις Διάρροια (νεογνά) Οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτις Μη-ειδική εμπύρετη λοίμωξη
Ομάδα Β	Διάφοροι ορότυποι 1, 2, 3, 4, 5 1, 2, 3, 4, 5 1, 2, 3, 4, 5, 6 2, 3, 4, 5 1, 2, 3, 4, 5 1, 2, 3, 4, 5 4, 5 5 2, 5 5 1, 2, 4 4 1, 2, 3, 4, 5, 6	ΓΠευροδυνία Νόσος Bornerholm Άσηπτη μηνιγγίτιδα Παράλυση (σπάνια) Συστηματική νόσος (νεογνά) Μυοκαρδίτις, περικαρδίτις Λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού Εξάνθημα Νόσος χεριών, ποδιών, στόματος Ηπατίτις Πανγκρεατίτις Σακχαρώδης διαβήτης Μη-ειδική εμπύρετη λοίμωξη
ΙΟΙ ECHO	1-7, 9, 11, 13-23, 25, 27, 30, 31 4, 6, 9, 11, 30 +(1, 7, 13, 14, 16, 18, 31) 2, 6, 9, 19 + (3, 4, 7, 11, 14, 18, 22) 2, 4, 6, 9, 11, 16, 18 + (1, 3, 5, 7, 12, 14, 19, 20) 4, 9, 11, 20, 25 +(1-3, 6-8, 16, 19, 22) 7, 11 1, 6, 9 1, 6, 9, 19 4, 9 Διάφοροι ορότυποι	Άσηπτη μηνιγγίτιδα Παράλυση (σπάνια) Εγκεφαλίτιδα, αταξία, σ. Guillain-Barre Εξάνθημα νόσος εξανθήματος Boston Αναπνευστική νόσος Επιπεφυκίτις Επιδημική μυαλγία (σπάνια) Μυοκαρδίτις, περικαρδίτις (σπάνια) Ηπατίτις Μη-ειδική εμπύρετη λοίμωξη
ΝΕΟΤΕΡΟΙ ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ	68 70 71 70, 71 70, 71 71	Πνευμονία βρογχιολίτις Οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτις Άσηπτη μηνιγγίτιδα Παράλυση Μηνιγγοεγκεφαλίτις Νόσος χεριών, ποδιών, στόματος



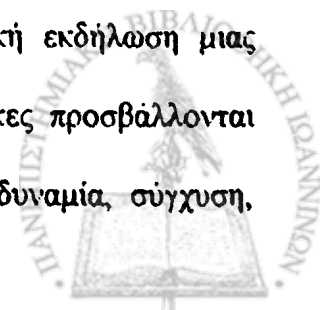
συστήματος. Η νόσος και ιδιαίτερα ο πυρετός μπορεί να εξελίσσεται διφασικά, όπως και στην πολιομυελίτιδα. Ο πυρετός και η μυαλγία εμφανίζονται για λίγες μέρες, ακολουθεί απυρεξία και περίοδος 2-10 ημερών χωρίς συμπτώματα, πριν την ξαφνική επανεμφάνιση πυρετού και κεφαλαλγίας, σημείων έναρξης της μηνιγγίτιδας. Επιπλοκές όπως πυρετικοί σπασμοί, επιληπτικοί σπασμοί, λήθαργος, κόμα και κινητικές διαταραχές εμφανίζονται σπάνια στο 5-10% των ασθενών (Rogabaugh et al., 1993).

Στις εύκρατες περιοχές, η εμφάνιση της μηνιγγίτιδας έχει εποχιακή κατανομή με μεγαλύτερη επίπτωση κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και στις αρχές του φθινοπώρου (Rotbart, 1995). Έχουν ωστόσο αναφερθεί και σποραδικά περιστατικά κατά τη διάρκεια της χειμερινής περιόδου (Chambon et al., 2001). Παρόλο που δεν είναι απαραίτητη η νοσηλεία όλων των περιπτώσεων άσηπτης μηνιγγίτιδας κατά την διάρκεια των καλοκαιρινών επιδημιών, φαίνεται ότι αυτή είναι προτιμότερη για την αντιμετώπιση σποραδικών περιπτώσεων, καθώς και όταν συνυπάρχουν συμπτώματα όπως διαταραχές συνείδησης, μυϊκή αδυναμία, ή αιμορραγικό εξάνθημα. Στις περισσότερες περιπτώσεις η θεραπεία είναι ανακουφιστική (Modlin, 2000c).

6.2.2 Εγκεφαλίτιδα

Η εγκεφαλίτιδα αποτελεί ασυνήθιστη εκδήλωση προσβολής του ΚΝΣ από τους ιούς Coxsackie και Echo, τα συμπτώματα της οποίας συχνά περιπλέκονται με αυτά της άσηπτης μηνιγγίτιδας. Οι εντεροϊοί, συμπεριλαμβανομένων των πολιοϊών, ενοχοποιούνται για το 11-22% όλων των περιπτώσεων ιογενούς εγκεφαλίτιδας (Meyer et al., 1960; Lennette et al., 1960). Οι ορότυποι που έχουν συχνότερα αναφερθεί ως υπεύθυνοι είναι οι ιοί Coxsackie A9, B2 και B5 και οι ιοί ECV 6 και 9 (Modlin, 2000c).

Κατά την νεογνική ηλικία, η εγκεφαλίτιδα αποτελεί σημαντική εκδήλωση μιας γενικευμένης ιογενούς λοίμωξης. Τα μεγαλύτερα παιδιά και οι ενήλικες προσβάλλονται συχνότερα. Τα κλινικά συμπτώματα ποικίλλουν και περιλαμβάνουν αδυναμία, σύγχυση,

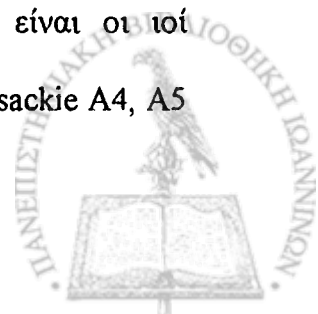


λήθαργο, ενώ κάποιοι ασθενείς εμφανίζουν σπασμούς, πάρεση και κόμα. Παρόλο που η γενικευμένη εγκεφαλική προσβολή είναι συχνότερη, παρατηρείται επίσης και εστιακή εγκεφαλίτιδα, που συνήθως αποδίδεται στους ιούς Coxsackie Ομάδας Α (Roden et al., 1975; Chalhub et al., 1977 ; Mogens, 1978 ; Peters et al., 1979 ; Modlin et al., 1991). Οι ασθενείς με εστιακή εγκεφαλίτιδα παρουσιάζουν εστιακούς κινητικούς σπασμούς, ημιχορεία και οξεία παρεγκεφαλιδική αταξία, συμπτώματα που ομοιάζουν με αυτά της εστιακής εγκεφαλίτιδας που προκαλεί ο ιός του απλού έρπητα (Whitley et al., 1981).

Τα ευρήματα της ιογενούς εγκεφαλίτιδας από το ENY είναι παρόμοια με αυτά της άσηπτης μηνιγγίτιδας. Οι περισσότεροι ασθενείς με εγκεφαλίτιδα από NPEVs αναρρώνουν πλήρως, παρόλο που σπανιότερα μπορεί να διατηρηθούν νευρολογικές διαταραχές και να παρατηρηθούν ακόμη και θάνατοι (Price et al., 1970). Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί και ενδοκρινικές διαταραχές ως επιπλοκή εγκεφαλίτιδας από τον ιό Coxsackie B5, λόγω διαταραχής του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης (Hagg et al., 1978).

6.2.3 Παράλυση και άλλες νευρολογικές επιπλοκές

Διάφοροι ορότυποι ιών Coxsackie, Echo και ο ENV 71 έχουν συσχετισθεί με τη σποραδική εμφάνιση περιπτώσεων που ομοιάζουν με παραλυτική πολιομυελίτιδα. Η παραλυτική αυτή νόσος είναι λιγότερο σοβαρή από αυτή που προκαλεί ο ιός της πολιομυελίτιδας. Η απομόνωση του υπεύθυνου ιού από τα κόπρανα συχνά συνοδεύεται από αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων και την απουσία συνλοίμωξης με πολιοϊό. Λιγότερο συχνή είναι η απομόνωση των NPEVs από το ENY, τον εγκέφαλο ή τον νωτιαίο μυελό. Ο ιός Coxsackie A7 και ο ENV 71 έχουν αναγνωρισθεί ως οι κυριότεροι ορότυποι που προκαλούν επιδημίες παράλυσης (Grist & Bell, 1970; Shindarov et al., 1979). Επίσης, ορότυποι οι οποίοι εμπλέκονται σε σποραδικές περιπτώσεις παράλυσης είναι οι ιοί Coxsackie A7, A9 και B1-5, οι ιοί Echo 6 και 9 και λιγότερο συχνά οι ιοί Coxsackie A4, A5



και A10 και οι ιοί Echo 1-4, 7, 11, 14, 16-18 και 30 (Assaad & Cockburn, 1972; Kibrick, 1975).

Το σύνδρομο Guillain-Barré έχει βιβλιογραφικά συσχετιστεί σε ένα μικρό αριθμό ασθενών με τους οροτύπους CAV 2, 5, 9 και ECV 6 και 22 (Dery et al., 1974). Σε λίγες μόνο περιπτώσεις ο υπεύθυνος ιός έχει απομονωθεί από το ENY. Σε δύο περιπτώσεις ασθενών με εγκάρσια μυελίτιδα παρατηρήθηκε αύξηση στα αντισώματα έναντι των ιών CBV 4 και ECV5 στο ENY (Dery et al., 1974; Barak et al., 1988). Η συστηματική λοίμωξη με τον ιό Cocksackie B2 παρουσιάζει πολλά χαρακτηριστικά του συνδρόμου Reye's (Kaul et al., 1979). Επιπλέον, σε πολλά παιδιά με τεκμηριωμένη διάγνωση συνδρόμου Reye's, απομονώνονται ταυτόχρονα εντεροϊοί από διάφορες θέσεις, συμπεριλαμβανομένου του ENY και του εγκεφάλου (Brunberg & Bell, 1974; Alvirga & Mendoza, 1975). Ωστόσο, επιβεβαιωμένη αιτιολογική και επιδημιολογική συσχέτιση δεν υπάρχει.

6.2.4 Δερματικές εκδηλώσεις

Οι ιοί Cocksackie και Echo προκαλούν ποικιλία εξανθημάτων, τα οποία δεν είναι χαρακτηριστικά και έτσι δεν επιτρέπουν την αξιόπιστη αιτιολογική διάγνωση. Η νοσηρότητα που προκαλούν είναι μικρή. Δεν είναι γνωστό εάν οφείλονται στον ίδιο τον ιό ή είναι αποτέλεσμα ανοσοπαθολογικών μηχανισμών (Modlin, 2000c). Τα εξανθήματα που προκαλούνται από εντεροϊούς θα πρέπει να διαφοροδιαγνωσθούν από άλλα λοιμώδη εξανθήματα, τα οποία και μιμούνται. Αυτά περιλαμβάνουν εξανθήματα ιλαροειδή ή ερυθρόμορφα, τύπου ροδάνθης, φουσαλιδώδη και πετεχειώδη.

Τα ιλαροειδή εξανθήματα παρατηρούνται συχνότερα στη διάρκεια των καλοκαιρινών επιδημιών και θεωρείται ότι προκαλούνται από τους ιούς Echo. Ως συχνότερος έχει αναφερθεί ο ορότυπος ECV 9 (Bell et al., 1975). Χαρακτηριστικά, το εξάνθημα δεν είναι κνησμώδες και δεν συνοδεύεται από τραχηλική λεμφαδενίτιδα (Lerner et



al., 1960). Άλλοι πλην του οροτύπου ECV 9 ιοί που προκαλούν ιλαροειδές εξάνθημα είναι οι ECV 2, 4, 11, 19 και 25.

Τα εξανθήματα τύπου ροδάνθης προκαλούνται κυρίως από τον ECV 16 (Neva et al., 1954; Neva, 1956). Παρατηρούνται κυρίως σε παιδιά (Hall et al., 1977). Συνήθως συνυπάρχουν πυρετός 38-39°C, φαρυγγίτις και κόρυζα. Ο πυρετός διαρκεί 24-36 ώρες, ενώ το εξάνθημα 1-5 ημέρες. Εκτός από τον ECV 16, άλλοι ορότυποι που σπανιότερα συσχετίζονται είναι οι CBV 1, 5 και οι ECV 11 και 25 (Cherry et al., 1963; Moritsugu et al., 1968).

Ο ιός Coxsackie A16 (και σπανιότερα οι A5, A7, A9, A10, B2, και B5) θεωρείται ο αιτιολογικός παράγοντας του **φυσαλιδώδους εξανθήματος** στα πλαίσια της νόσου «**χειριών, ποδιών και στόματος**» (hand-foot-and-mouth disease, HFMD) (Hughes & Roberts, 1972; Lindenbaum et al., 1975). Το σύνδρομο αυτό, το οποίο συμβαίνει κυρίως σε παιδιά πριν την ηλικία των 10 ετών, περιλαμβάνει κυνάγχη, πυρετό 38-39°C που διαρκεί 1-2 μέρες και σχηματισμό φυσαλίδων στη στοματική κοιλότητα που καταλήγουν σε εξέλκωση (Adler et al., 1970). Το εξάνθημα είναι χαρακτηριστικά εντοπισμένο στην περιφέρεια. Οι βλάβες εντοπίζονται συχνότερα στα χέρια και τα πόδια (παλάμες και πέλματα). Η νόσος είναι καλοήθης, συχνά υποχωρεί από μόνη της και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρουσιάζει μακροχρόνιες επιπλοκές (Melnick, 1996). Το εξάνθημα της **ερπητικής κυνάγχης** μοιάζει με αυτό της νόσου HFMD, ωστόσο έχει διαφορετική εντόπιση. Ο ENV 71 επίσης προκαλεί τη νόσο HFMD και μπορεί να απομονωθεί εκτός από τα κόπρανα και τα φαρυγγικά επιχρίσματα και στο υγρό των φυσαλίδων (Melnick, 1996).

Πορφυρικά και πετεχειώδη εξανθήματα έχουν περιγραφεί σε λοιμώξεις με τους ιούς ECV 9 (Sabin et al., 1958; Frothingham, 1958) και CAV 9 (Cherry & Jahn, 1966). Λόγω του αιμορραγικού τους χαρακτήρα, τα εξανθήματα αυτά συχνά συγχέονται με



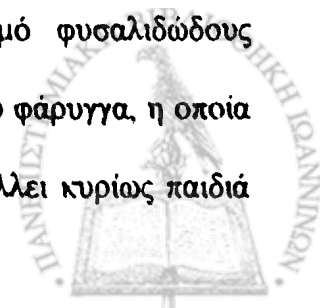
μηνιγγιτιδοκοκκική λοίμωξη, ειδικά όταν επιπλέκονται με άσηπτη μηνιγγίτιδα (Modlin, 2000c).

6.2.5 Λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος

Οι εντεροϊοί είναι οι συχνότεροι ιογενείς αιτιολογικοί παράγοντες που προκαλούν λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος στη διάρκεια του θέρους, με την χαρακτηριστική μορφή της καλοκαιρινής γρίπης (Kerfer et al., 1974). Η κλινική εικόνα είναι παρόμοια με αυτή άλλων αιτιολογικών παραγόντων, όπως οι ρινοϊοί, οι ιοί της παραγρίπης και οι αδενοϊοί. Η σημασία των εντεροϊών δεν έχει ξεκαθαριστεί για τις λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος και επομένως θα πρέπει να θεωρούνται μάλλον ασυνήθεις παράγοντες ιογενούς πνευμονίας.

Οι ιοί CAV 21 και 24 είναι τα κυριότερα παθογόνα του αναπνευστικού συστήματος (Johnson et al., 1963). Παρόλο που δεν έχουν αναγνωριστεί επιδημίες στο γενικό πληθυσμό, οι σποραδικές λοιμώξεις πιθανότατα ευθύνονται για την ανεύρεση αντισωμάτων στο 70% των ατόμων μετά τα 50 έτη (Jackson & Muidoon, 1973). Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους εντεροϊούς ο ιός Coxsackie A21, ο οποίος προκαλεί τραχειοβρογχίτιδα και πνευμονία, ανευρίσκεται συχνότερα στο φάρυγγα από ότι στα κόπρανα (Couch et al., 1965). Από τους ιούς Echo, ο ECV 11 είναι πιθανότατα η πιο συχνή αιτία αναπνευστικής νόσου (Jackson & Muidoon, 1973), παρόλο που οι ορότυποι 4, 8, 9, 20, 22, και 25 ενοχοποιούνται επίσης. Οι CBV έχουν επιπλέον ενοχοποιηθεί, ειδικά σε νεογνά και παιδιά, χωρίς ωστόσο να έχει αποδειχθεί η αιτιολογική τους σχέση. Η κλινική εικόνα περιλαμβάνει ρινική καταρροή, λαρυγγοτραχειοβρογχίτιδα, βρογχιολίτιδα και πνευμονία (Eckert et al., 1967; Dery et al., 1974).

Η ερπητική κυνάγχη (herpangina) αποτελεί τον συνδυασμό φυσαλιδώδους ενανθήματος των παρίσθμιων και της μαλακής υπερώας με φλεγμονή του φάρυγγα, η οποία συνοδεύεται από πυρετό, κυνάγχη και δυσκαταποσία. Η νόσος προσβάλλει κυρίως παιδιά



ηλικίας 3 έως 10 ετών, αλλά μπορεί να παρατηρηθεί και σε εφήβους και νεαρούς ενήλικες. Εμφανίζεται επιδημικά, ιδιαίτερα κατά τους θερινούς μήνες και σπανιότερα σποραδικά. Αιτιολογικοί παράγοντες θεωρούνται οι ιοί Coxsackie ομάδας A 1-6, 8, 10 και 22 (Melnick, 1996) και σπανιότερα οι ιοί Coxsackie B 1-5 και οι ιοί Echo 3, 6, 9, 16, 17, 25 και 30 (Cherry & Jahn, 1965).

Η κλινική εικόνα εκδηλώνεται με αιφνίδια έναρξη πυρετού 37.7-40.5°C, εμετό, μυαλγία, κεφαλαλγία και δυσκαταποσία. Εάν δεν επισημανθεί το χαρακτηριστικό ενάνθημα, η διάγνωση φαρυγγίτιδας ή αμυγδαλίτιδας μπορεί να τεθεί εσφαλμένα. Ο πυρετός υποχωρεί σε 2-4 ημέρες, ωστόσο τα έλκη επιμένουν για περίπου 1 εβδομάδα (Modlin, 2000c). Η νόσος είναι αυτοπεριοριζόμενη, με χαρακτηριστική καλοήγη πορεία. Σπάνια παρατηρούνται νευρολογικές επιπλοκές (Huang et al., 1999). Θα πρέπει να γίνεται διαφορική διάγνωση από την βακτηριακή φαρυγγίτιδα, τις ιογενείς αμυγδαλίτιδες, την ερπητική ουλοστοματίτιδα και την αφθώδη στοματίτιδα. Η διάκριση μεταξύ τους στηρίζεται στην διαφορετική ηλικιακή κατανομή, στο είδος και την εντόπιση του ενανθήματος και στη συνύπαρξη τραχηλικής λεμφαδενοπάθειας.

Παραλλαγή της ερπητικής κυνάγχης αποτελεί η λεμφοοζώδης φαρυγγίτιδα, η οποία έχει συσχετισθεί με τον ιό CAV 10 (Steigman et al., 1962). Οι βλάβες παρουσιάζουν την ίδια κατανομή με την ερπητική κυνάγχη, αλλά αποτελούνται από μικρούς λεμφοκυτταρικούς όζους, που υποχωρούν χωρίς να υφίστανται αλλοιώσεις φουσαλιδοποίησης ή εξέλκωσης.

Η **επιδημική πλευροδυνία** (επιδημική μυαλγία, επιδημική καλοήγης ξηρά πλευρίτιδα ή νόσος του Borgholm) αποτελεί οξεία λοιμώδη νόσο που χαρακτηρίζεται από πυρετό και οξύ πόνο στο στήθος και το επιγάστριο. Η νόσος έχει πάρει το όνομά της από τη νήσο Borgholm στη Βαλτική θάλασσα, όπου και περιγράφηκε αρχικά (Sylvest, 1934). Η σημασία των ιών Coxsackie για την πρόκληση της νόσου κατανοήθηκε δεκαπέντε χρόνια μετά την παραπάνω περιγραφή (Weller et al., 1950).



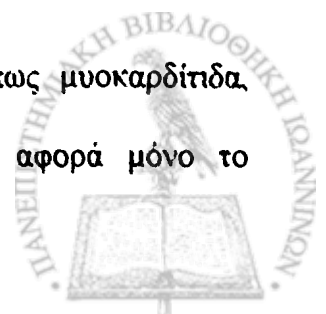
Οι σημαντικότεροι αιτιολογικοί παράγοντες θεωρούνται οι ιοί Coxsackie Ομάδας Β (Modlin, 2000c). Εμπλέκονται επίσης οι ιοί Echo 1, 6, 9, 16, 19 και οι ιοί Coxsackie Α 4, 6, 9 και 10 (Bell & Grist, 1971; Madhavan et al., 1977), οι οποίοι εμφανίζονται περισσότερο σποραδικά. Η επιδημική πλευροδυνία εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ηλικίες σε σχέση με τις λοιπές κλινικές οντότητες που οφείλονται στους ιούς Coxsackie και Echo. Η εμφάνιση σημαντικών επιδημιών χαρακτηρίζεται από την μεσολάβηση μεσοδιαστήματος 10 έως 20 ετών.

Η πλευροδυνία χαρακτηρίζεται από έλλειψη προδρόμων συμπτωμάτων. Η νόσος εμφανίζεται αιφνίδια, με οξύ πόνο στο κατώτερο τμήμα του θωρακικού κλωβού ή στο επιγάστριο. Πυρετός 38-39.5°C παρουσιάζεται μέσα σε 1 ώρα από την έναρξη του παροξυσμικού άλγους και υποχωρεί όταν αυτό υφίεται. Μπορεί να συνυπάρχουν κυνάγχη και κεφαλαλγία, ωστόσο είναι αξιοσημείωτη η έλλειψη βήχα και καταρροϊκών συμπτωμάτων. Η ένταση του πόνου ποικίλλει σημαντικά. Συνήθως έχει διαξιφιστικό «δίκηνη μαχαιριάς» χαρακτήρα και είναι ασαφώς εντοπισμένος (Disney et al., 1953). Εκλύεται αυτόματα, επιτείνεται με τις κινήσεις και περιορίζει την βαθιά εισπνοή, ενώ υφίεται σε συγκεκριμένες θέσεις του σώματος του ασθενή (Melnick, 1996).

Η νόσος είναι αυτοπεριοριζόμενη, διαρκεί 4 έως 6 ημέρες (εύρος από 12 ώρες έως 3 εβδομάδες). Η ανάρρωση είναι πλήρης, ωστόσο οι υποτροπές, οι οποίες είναι ηπιότερες από τον αρχικό παροξυσμό, φθάνουν το 25% των περιπτώσεων. Μαζί με την πλευροδυνία μπορεί να συνυπάρχουν άσηπτη μηνιγγίτιδα (Wagin et al., 1953), ορχίτιδα (Wagin et al., 1959; Gordon et al., 1959) και σπανιότερα περικαρδίτιδα και πνευμονία (Bain et al., 1961).

6.2.6 Λοιμώξεις της καρδιάς

Οι εντεροϊοί προκαλούν φλεγμονώδεις μυοκαρδιοπάθειες όπως μυοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα και διατατική μυοκαρδιοπάθεια. Σπάνια η προσβολή αφορά μόνο το



περικάρδιο και επομένως ο όρος **μυοπερικαρδίτιδα** περιγράφει ακριβέστερα τη νόσο (Smith, 1966).

Η απομόνωση του ιού ή η ανεύρεση ιικών αντιγόνων στο μυοκάρδιο ή το περικαρδιακό υγρό, έχει συσχετίσει την πρόκληση μυοκαρδίτιδας με όλους τους οροτύπους της ομάδας Β των ιών Coxsackie (οι ορότυποι 2-5 είναι οι συχνότεροι), αλλά και τους ιούς CAV 4 και 16 και ECV 9 και 22 (Russell & Bell, 1970; Lerner & Wilson, 1973; Woodruff, 1980). Σε μικρότερο ποσοστό έχουν ενοχοποιηθεί οι ιοί CAV 1, 2, 5, 8, και 9, και οι ECV 1-4, 6-8, 11, 14, 19, 25, και 30 (Grist & Bell, 1968; Lerner & Wilson, 1973).

Όσον αφορά στη παθογένεια, οι εντεροϊοί πιστεύεται ότι προσεγγίζουν το μυοκάρδιο κατά τη φάση της αιμίας. Σε πειραματικά μοντέλα έχει αποδειχθεί ότι, η αρχική νέκρωση των μικροϊνιδίων ακολουθείται από εστιακή διήθηση με φλεγμονώδη κύτταρα, όπως πολυμορφοπύρρηνα, λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και μακροφάγα (Woodruff, 1980). Η φλεγμονώδης αντίδραση επιμένει για αρκετές εβδομάδες ακόμη μετά την αναστολή πολλαπλασιασμού του ιού. Η προσβολή του μυοκαρδίου ολοκληρώνεται με διάμεση ίνωση και απώλεια μυϊκού ιστού.

Η προκαλούμενη από εντεροϊούς μυοκαρδίτιδα παρατηρείται σε όλες τις ηλικίες, με αυξημένη συχνότητα στους εφήβους και στους νεαρούς ενήλικες. Η επίπτωση στους άνδρες είναι τουλάχιστον διπλάσια από ότι στις γυναίκες. Στα δύο τρίτα των περιπτώσεων, 7 έως 14 ημέρες πριν την εκδήλωση συμπτωμάτων από τον καρδιακό μυ, προηγούνται σημεία λοίμωξης του ανωτέρου αναπνευστικού (Sainani et al., 1968). Τα συχνότερα συμπτώματα (60-90% των περιπτώσεων) είναι δύσπνοια, θωρακικό άλγος, πυρετός και κακουχία (Helin et al., 1968). Σοβαρότερη μυοκαρδιακή νόσος, συχνά συνυπάρχει με περικαρδίτιδα και εκδηλώνεται με κοιλιακή αρρυθμία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε συγκοπή και αιφνίδιο θάνατο (Kim et al., 2001).



Η πλειοψηφία των ασθενών με μυοκαρδίτιδα αναρρώνει πλήρως. Θνητότητα στην οξεία φάση παρατηρείται μόνο σε ένα ποσοστό 0-4% και ουσιαστικά περιορίζεται στα άτομα όπου η μυοκαρδίτιδα κυριαρχεί έναντι της περικαρδίτιδας. Εμμένουσες ηλεκτροκαρδιογραφικές ανωμαλίες (10-20%), καρδιομεγαλία (5-10%) και χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια αποτελούν ενδείξεις μόνιμης μυοκαρδιακής βλάβης, η οποία παρατηρείται σπάνια (Smith, 1970).

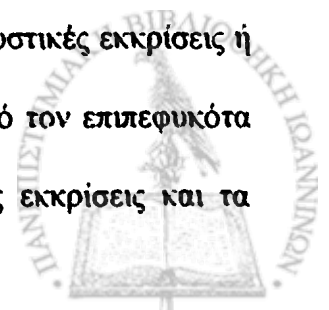
Η διατακτική μυοκαρδιοπάθεια αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα αιτία χρόνιας συμφορητικής ανεπάρκειας μετά την ισχαιμία του μυοκαρδίου. Είναι αποτέλεσμα της μυοπερικαρδίτιδας από εντεροϊούς σε ένα ποσοστό από 10-30% (Sole et al., 1993; Modlin, 2000c). Η πρόγνωση της νόσου είναι κακή και το 50% των ασθενών καταλήγει μέσα στα πρώτα δύο χρόνια (Goodwin, 1992).

6.2.7 Οφθαλμικές λοιμώξεις

Η οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα (acute haemorrhagic conjunctivitis, AHC) είναι μία μεταδοτική νόσος των οφθαλμών, η οποία χαρακτηρίζεται από πόνο, οίδημα των βλεφάρων και αιμορραγία υπό τον επιπεφυκότα. Εμφανίζεται αιφνίδια και συνήθως αυτοιάται εντός μίας εβδομάδας. Στα περισσότερα μέρη του κόσμου έχει παρουσιαστεί με την μορφή επιδημίας ή και πανδημίας.

Ο εντεροϊός ENV 70 έχει ενοχοποιηθεί για δεκάδες εκατομμυρίων των περιπτώσεων της AHC από το 1969, ενώ και ο ιός CAV 24 προκαλεί μία παρόμοια, αλλά πιο περιορισμένη γεωγραφικά νόσο, η οποία έχει προσβάλλει στο παρελθόν εκατοντάδες χιλιάδες άτομα κυρίως στην Ασία και στην Αφρική (Modlin, 2000c).

Σε αντίθεση με τις άλλες λοιμώξεις από εντεροϊούς, η ACH μεταδίδεται κυρίως με τα δάχτυλα ή τα σταγονίδια απευθείας στον οφθαλμό και όχι με τις αναπνευστικές εκκρίσεις ή τα κόπρανα. Τόσο ο ENV 70 όσο και ο CAV 24 έχουν απομονωθεί από τον επιπεφυκότα στην αρχική φάση της νόσου. Το ίδιο δεν συμβαίνει στις φαρυγγικές εκκρίσεις και τα



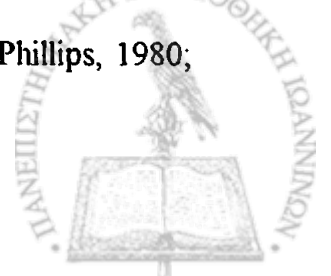
κόπρανα. Πιθανότατα η θερμοκρασία των 33-35°C στον επιπεφυκότα, ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των δύο ιών (Stanton et al., 1977).

Η νόσος συνήθως ξεκινά αιφνίδια με συμπτώματα που εντοπίζονται στον ένα οφθαλμό. Γρήγορα, τα συμπτώματα επεκτείνονται και στον άλλο οφθαλμό και περιλαμβάνουν πόνο, καύσος, αίσθημα ξένου σώματος, φωτοφοβία, οίδημα των βλεφάρων και ορώδες έκκριμα (Stanton et al., 1977). Στο 20% των περιπτώσεων συνυπάρχουν συστηματικά συμπτώματα όπως πυρετός, κακουχία και κεφαλαλγία. Το χαρακτηριστικότερο εύρημα είναι η αιμορραγία υπό τον επιπεφυκότα, η οποία παρατηρείται στο 70-90% των περιπτώσεων ACH από τον ENV 70 (Kono & Uchida, 1977), αλλά σπανιότερα όταν αιτιολογικός παράγοντας είναι ο ιός CAV 24 (Christopher et al., 1982). Η αιμορραγία είναι εντονότερη στους νεότερους ασθενείς (Kono & Uchida, 1977). Στις σοβαρότερες περιπτώσεις, η κερατίτιδα μπορεί να επιμείνει για αρκετές εβδομάδες, αλλά ποτέ σχεδόν δεν καταλείπει μόνιμη βλάβη. Η επιπεφυκίτιδα μπορεί να επιπλακεί με δευτεροπαθή βακτηριακή λοίμωξη (Modlin, 2000c).

Η νόσος είναι αυτοπεριοριζόμενη. Νευρολογικές επιπλοκές αναφέρονται σπάνια, κυρίως σε περιπτώσεις επιδημιών από ENV 70, προκαλώντας κινητική παράλυση ομοιάζουσα με πολιομυελίτιδα (Katiyar et al., 1983). Η θεραπεία είναι συμπτωματική.

6.2.8 Νεογνικές λοιμώξεις

Τα νεογνά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις λοιμώξεις από τους ιούς Coxsackie και Echo. Παρόλο που οι περισσότεροι ορότυποι των εντεροϊών προκαλούν στα νεογνά την ίδια αυτοπεριοριζόμενη κλινική συνδρομή με τα μεγαλύτερα παιδιά και τους ενήλικες, κάποιοι ορότυποι είναι υπεύθυνοι για κεραυνοβόλο, συχνά θανατηφόρα προσβολή των νεογνών. Οι ορότυποι CBV 2 έως 5 και ECV 11 είναι οι συχνότεροι που εμπλέκονται σε συστηματικές νεογνικές λοιμώξεις. Σπανιότεροι θεωρούνται οι CAV 3, 9 και 16 (Baker & Phillips, 1980;



Modlin, 1986). Σχεδόν όλες οι νεογνικές λοιμώξεις μεταδίδονται από την μητέρα στο παιδί και συχνά θεωρούνται ενδονοσοκομειακές (Gear & Measroch, 1973; Kinney et al., 1986).

Οι κλινικές εκδηλώσεις των λοιμώξεων από ιούς Coxsackie και Echo στα νεογνά εμφανίζονται συνήθως μεταξύ 3^{ης} και 7^{ης} ημέρας της ζωής (Karlan et al., 1983). Τα πρώιμα συμπτώματα είναι γενικά ήπια και μη ειδικά και περιλαμβάνουν ατονία, ανορεξία και αναπνευστική δυσχέρεια. Ο πυρετός μπορεί να συνυπάρχει. Η νόσος συνήθως εξελίσσεται καλοήθως. Η γενικευμένη νόσος εκδηλώνεται είτε ως μυοκαρδίτιδα είτε ως κεραυνοβόλος ηπατίτιδα. Η νεογνική μυοκαρδίτιδα, η οποία συχνά συνοδεύεται από εγκεφαλίτιδα, οφείλεται κυρίως σε ιούς Coxsackie ομάδας B (Gear & Measroch, 1973) και σπανιότερα στον ECV 11 (Drew, 1973). Η κεραυνοβόλος νεογνική ηπατίτιδα εκδηλώνεται ως υπόταση, διαταραχές πήξης και πολυοργανική ανεπάρκεια. Ο ECV 11 ευθύνεται για τις περισσότερες περιπτώσεις, ενώ επίσης εμπλέκονται οι ECV 4, 6, 7, 9, 12, 14, 19, 21 και 31 (Speer & Yawn, 1984; Wreghitt et al., 1984; Modlin, 1986; Georgieff et al., 1987). Ποσοστό 80-90% των νεογνών με ηπατίτιδα και αιμορραγικές διαταραχές καταλήγουν 2 έως 6 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων (Modlin, 1980). Σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί νεογνά τα οποία έχουν αναρρώσει, η πρόγνωση των οποίων είναι εξαιρετική (Gillam et al., 1986; Abzug, 2001). Η φλεγμονή είναι συνήθως περιοριζόμενη στο ήπαρ και τα επινεφρίδια, ωστόσο οι επιπλοκές περιλαμβάνουν την πνευμονία, τη μυοσίτιδα, τη νεκρωτική εντεροκολίτιδα και την μηνιγγίτιδα (Abzug, 1995).

Παράγοντες κινδύνου που καθορίζουν τη βαρύτητα της νεογνικής νόσου αποτελούν η προωρότητα, το ιστορικό λοίμωξης της μητέρας πριν τον τοκετό, η έναρξη της νόσου τις πρώτες μέρες της ζωής, η απουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του ιού και η πολυσυστηματική προσβολή (Abzug et al., 1993). Η θεραπεία της νόσου είναι συμπτωματική.



6.2.9 Εντεροϊοί και χρόνιες παθήσεις

Οι εντεροϊοί έχουν συσχετισθεί με την παθογένεια αρκετών χρόνιων παθήσεων όπως ο ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης τύπου I, το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης, η δερματομυοσίτιδα και η πολυμυοσίτιδα και η μη-βακτηριακή γαστρεντερίτιδα. Στις περιπτώσεις αυτές ωστόσο, δεν έχει τεκμηριωθεί πλήρως η σχέση λοίμωξης και χρόνιας νόσου.

Αναμφισβήτητα, η σχέση του ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη τύπου I με τους ιούς Cocksackie της ομάδας B, είναι αυτή που έχει τεκμηριωθεί από μεγάλο αριθμό κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων (Notkins, 1977; Barrett-Connor, 1985; Modlin, 2000c). Σε πειραματόζωα, έχει επιβεβαιωθεί η καταστροφή των b-κυττάρων των νησιδίων του Langerhans από ιούς Cocksackie. Λόγω του ότι οι λοιμώξεις από ιούς Cocksackie είναι πολύ συχνές και ο νεανικός σακχαρώδης διαβήτης σπάνιος, πιθανολογείται ότι συνυπάρχει γενετική προδιάθεση για την εκδήλωση της νόσου (Modlin, 2000c).

Οι ιοί Cocksackie και Echo θεωρούνται συχνά αίτια μη-βακτηριακής διάρροιας και γαστρεντερίτιδας. Ωστόσο, το γεγονός αυτό συχνά δεν επιβεβαιώνεται στη βιβλιογραφία (Steinhoff, 1978). Υπάρχουν ισχυρότερες ενδείξεις ότι ορισμένοι ορότυποι ιών ECV και πιο συγκεκριμένα οι 11,14 και 18, εμπλέκονται σε περιπτώσεις επιδημικής διάρροιας στα νεογνά (Patel et al., 1985). Εντούτοις, η τοξινογόνος *E.coli*, οι ιοί Rota, οι αδενοϊοί και οι ιοί Norwalk παραμένουν τα κυριότερα αίτια επιδημικής διάρροιας.

Το αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο έχει συσχετισθεί με τους ιούς CAV 4, CBV 2 και 4 και τον ιό ECV 22 (Ray et al., 1970; Oregan et al., 1980). Επιπλέον, ο ιός CBV 5 έχει συνδεθεί με οξεία νεφρική ανεπάρκεια σε πέντε ασθενείς (Aranson & Phillips, 1975). Ωστόσο, σήμερα θεωρείται ότι η εντεροαιμορραγική *E.coli* είναι η κύρια λοιμώδης αιτία του αιμολυτικού – ουραιμικού συνδρόμου.



Οι εντεροϊοί έχουν θεωρηθεί επίσης αιτία της οξείας μυοσίτιδας σε ορισμένους ασθενείς (Jehn & Fink, 1980; Bowles et al., 1987), χωρίς η διάγνωση να έχει επιβεβαιωθεί ιολογικά. Οι συχνότεροι ορότυποι είναι οι ECV 11 (Halfon & Spector, 1981), CAV 9, CBV 2 και 6 και ο ECV 9. Κλινικά, η μυοσίτιδα εκδηλώνεται με πυρετό, ρίγος, αδυναμία, ευαισθησία και οίδημα των συγκεκριμένων μυϊκών ομάδων.

Η ηπατίτιδα είχε στο παρελθόν συσχετισθεί με λοίμωξη από εντεροϊούς, λόγω του γεγονότος ότι ο ιός της Ηπατίτιδας Α είχε ταξινομηθεί ως εντεροϊός 72 (Rueckert, 1996). Σήμερα ωστόσο συγκαταλέγεται στο γένος *Hepatovirus*.

Η παγκρεατίτιδα έχει αναφερθεί σε ασθενείς με λοίμωξη από τους ιούς CBV 1-5 και ECV 6, 11, 22 και 30 (Arnesjo et al., 1976). Η ορχίτιδα έχει παρατηρηθεί σε εφήβους κατά τη διάρκεια λοίμωξης με τους ιούς CAV 9, CBV 2,4 και 5, και ECV 6 (Welliver & Cherry, 1978).

6.3 Εντεροϊοί και Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS)

Από την δεκαετία του 1980, ο ιός του AIDS έχει προκαλέσει παγκόσμια πανδημία. Σήμερα, στην Ευρώπη, στην Βόρεια Αμερική, στην Αυστραλία και σε άλλες περιοχές του λεγόμενου αναπτυγμένου κόσμου, τα μέτρα ελέγχου της λοίμωξης φαίνεται να έχουν θετικό αποτέλεσμα, έχοντας περιορίσει την εξάπλωση του ιού. Στην Ελλάδα, ο συνολικός αριθμός των HIV οροθετικών ατόμων (συμπεριλαμβανομένων των κρουσμάτων AIDS), που δηλώθηκαν μέχρι τις 30 Ιουνίου 2004, ανέρχεται σε 6923 άτομα. Για πρώτη φορά το 2000 παρατηρήθηκε μείωση της επίπτωσης της HIV λοίμωξης και στη χώρα μας. Από τα 6923 οροθετικά άτομα, τα 5562 είναι άνδρες (80,34%) εκ των οποίων οι 3154 (56,7%) δηλώθηκαν ομο/αμφιφυλόφιλοι, τα 1321 (19,08%) είναι γυναίκες και για ένα μικρό ποσοστό δεν δηλώθηκε το φύλο. Ο συνολικός αριθμός κρουσμάτων AIDS, που είχαν δηλωθεί μέχρι τον Ιούνιο του 2004 ανέρχεται σε 2475, εκ των οποίων 2125 (85,85%) είναι άνδρες και 350 (14,14%) γυναίκες. Η συχνότερα προσβαλλόμενη ηλικιακά ομάδα είναι αυτή από 25 έως 45

ετών. Ο κυριότερος τρόπος μετάδοσης παραμένει η σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών (46%) και ακολουθεί η ετεροφυλοφιλική (για άνδρες και γυναίκες) σεξουαλική επαφή (20,1%) (Ανώνυμος, 2004).

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) ανήκει στην οικογένεια των ιών *Retroviridae*. Υπάρχουν δύο υπότυποι: ο HIV1, ο οποίος έχει παγκόσμια κατανομή και ο HIV2, ο οποίος ανευρίσκεται κυρίως στην Αφρική. Έχουν μέγεθος 80-120nm και είναι ελυτροφόροι RNA-ιοί θετικής πολικότητας και σφαιρικού σχήματος με εικοσαεδρική συμμετρία νουκλεοκαπιδίου. Ο ιός HIV1,2 παρέμενε άγνωστος μέχρι το 1980, οπότε και θεωρήθηκε αιτιολογικός παράγοντας του συνδρόμου Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS) στον άνθρωπο (Klatt, 2002). Χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη περίοδο επώασης – λανθάνουσα περίοδο, η οποία μεσολαβεί μεταξύ της λοίμωξης και της εκδήλωσης των συμπτωμάτων της νόσου, καθώς και από την ποιοτική και ποσοτική διαταραχή του υποπληθυσμού των Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων (T-helpers), την οποία προκαλεί (Fauci & Clifford, 1998). Αυτή η υποομάδα των Τ λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζεται φαινοτυπικά από την παρουσία στην επιφάνεια του κυττάρου, του μοριακού υποδοχέα CD4, που αποτελεί και τον πρωταρχικό κυτταρικό υποδοχέα για την είσοδο του ιού στο κύτταρο. Έτσι, σύμφωνα με το Αναθεωρημένο Σύστημα Ταξινόμησης για την HIV λοίμωξη, το οποίο προτείνει το CDC, ασθενείς με απόλυτο αριθμό CD4+ Τ λεμφοκυττάρων μικρότερο από 200/μλ, θεωρούνται ότι έχουν AIDS (Ομάδες A3, B3, C3) (Wallach, 2000). Σε προχωρημένο στάδιο νόσου, η διαταραχή δεν αφορά πλέον μόνο το κυτταρικό, αλλά και το χυμικό σκέλος της ειδικής ανοσίας. Πράγματι, τα Β λεμφοκύτταρα ασθενών με AIDS παρουσιάζουν ανώμαλη ενεργοποίηση, η οποία χαρακτηρίζεται από μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό και έκκριση ανοσοσφαιρινών, αυξημένη παραγωγή παράγοντα ιστικής νέκρωσης TNFα και ιντερλευκίνης IL-6 και μείωση του αριθμού των κυκλοφορούντων Β κυττάρων (Mims et al., 1998).



Έχει παρατηρηθεί ότι στα ανοσοκατεσταλμένα άτομα (ηλικιωμένοι, βρέφη, ασθενείς υπό χημειοθεραπεία ή ανοσοκατασταλτική θεραπεία, συγγενείς και επίκτητες διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως λοίμωξη με HIV και ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο) και ειδικότερα στα άτομα με διαταραχή της χυμικής ανοσίας, ο ιός πολλαπλασιάζεται εντός του εντέρου για μεγάλα χρονικά διαστήματα (έως και δέκα έτη) και έτσι τα άτομα αυτά εμφανίζουν έως και 3000 φορές υψηλότερο κίνδυνο για παραλυτική πολιομυελίτιδα (Bellmunt et al., 1999; Martin et al., 2000; Siafakas et al., 2000). Λόγω της εκτεταμένης ανοσοκαταστολής, η οποία αφορά τόσο στο κυτταρικό, όσο και στο χυμικό σκέλος της ειδικής ανοσίας, οι ασθενείς με AIDS πιστεύεται ότι μπορεί να αποτελέσουν 'θύλακα' παραμονής των πολιοϊών στο γενικό πληθυσμό στη 'μετά την εκρίζωση της πολιομυελίτιδας' εποχή. Ένας σημαντικός αριθμός βιβλιογραφικών δεδομένων υποδεικνύει ότι, είναι πιθανόν ένας ασθενής να εκκρίνει στα κόπρανά του πολιοϊούς για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την πρώτη επαφή του με τον ιό (Mckinney et al., 1987; Kew et al., 1998; Bellmunt et al., 1999; Gavrilin et al., 2000; Martin et al., 2000). Η μακροχρόνια αυτή αποβολή δημιουργεί σημαντικές επιλοκές στο πρόγραμμα της εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας παγκοσμίως (Dowdle & Birmingham, 1997). Επιπλέον, η έκθεση των ανοσοκατασταλμένων ατόμων στα στελέχη του εμβολίου, δημιουργεί σοβαρούς κινδύνους για τους ασθενείς αυτούς.

Ωστόσο, δεν έχει αναφερθεί αυξημένη επίπτωση παραλυτικής πολιομυελίτιδας σχετιζόμενης με στελέχη εμβολίου ακόμη και σε χώρες με πολύ υψηλά ποσοστά οροθετικών ατόμων. Στους ασθενείς με HIV λοίμωξη, η παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων φαίνεται ότι είναι λιγότερο διαταραγμένη σε σχέση με ασθενείς με πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια. (Ryder et al., 1993).



7. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς βασίζεται κυρίως στην ανίχνευσή τους σε κατάλληλα κλινικά δείγματα με κυτταροκαλλιέργεια και στην ταυτοποίησή τους με ειδικούς αντιορούς και μοριακές τεχνικές. Οι ορολογικές μελέτες μπορούν επίσης να επιβεβαιώσουν στοιχεία πρόσφατης λοίμωξης όταν δεν είναι διαθέσιμα κλινικά δείγματα από την οξεία φάση της λοίμωξης (Melnick, 1996). Άλλες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί περιλαμβάνουν την ηλεκτρονική μικροσκοπία (electron microscopy, EM), τον ανοσοφθορισμό (immunofluorescence, IF) και τις ανοσοενζυμικές μεθόδους (enzyme immunoassays, EIA).

7.1 Καταλληλότητα και συλλογή δειγμάτων

Η αιτιολογική διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς μπορεί να επιβεβαιωθεί με την απομόνωση του ιού από το ΕΝΥ, το περικαρδιακό υγρό, τους ιστούς ή το αίμα, ανάλογα με την εντόπιση της νόσου. Η απομόνωση από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα ή τα κόπρανα θεωρείται εξίσου σημαντική ένδειξη λοίμωξης, αν και παρέχει μόνο περιστασιακές αποδείξεις. Τα δείγματα κοπράνων ωστόσο, αποτελούν το πλέον αξιόπιστο υλικό για την ανίχνευση εντεροϊών και η καλλιέργεια αυτών των δειγμάτων ενδείκνυται για τη διάγνωση λοιμώξεων από εντεροϊούς. Η απομόνωση εντεροϊών από αστικά λύματα και άλλα περιβαλλοντικά δείγματα είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για επιδημιολογικές μελέτες. Διαγνωστική αξία έχουν επίσης υλικά νεκροψίας όπως εγκέφαλος, εντερικό περιεχόμενο, πνεύμονες, ήπαρ, μυοκάρδιο και λεμφαδένες (Grandien et al., 1995).

Τα δείγματα που πρόκειται να καλλιεργηθούν σε κυτταρικές σειρές μπορούν να διατηρηθούν στους -70°C ή ακόμη και στους -20°C για αρκετό χρονικό διάστημα. Στη συντήρηση (4°C) η λοιμογόνος δύναμη του ιού διατηρείται για λίγες εβδομάδες. Τα δείγματα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στις μοριακές τεχνικές διατηρούνται στους -20°C για μικρό χρονικό διάστημα (Romero & Rotbart, 2003).



7.2 Ανίχνευση και απομόνωση των εντεροϊών με κυτταροκαλλιέργεια

Η απομόνωση σε κυτταροκαλλιέργειες παραμένει το ισχυρότερο τεκμήριο λοίμωξης από εντεροϊούς. Η πιθανότητα απομόνωσης του υπεύθυνου ιού αυξάνεται με τη διενέργεια ελέγχου σε πολλά δείγματα. Οι κυτταρικές σειρές οι οποίες προτείνονται από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Anonymous, 1996; Anonymous, 1998) για την ανίχνευση εντεροϊών είναι όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο της Ιολογίας (i) η κυτταρική σειρά Hep-2 (Εικόνα 8), από ανθρώπινο επιδερμοειδές καρκίνωμα, (ii) η κυτταρική σειρά RD (rhabdomyosarcoma), από κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος (iii) η κυτταρική σειρά L20_B, από κύτταρα ποντικού, τα οποία είναι γενετικώς τροποποιημένα για να εκφράζουν στην κυτταρική τους μεμβράνη τον υποδοχέα PVR (*Polio Virus Receptor*) των ανθρωπίνων κυττάρων για τους πολιοϊούς και (iv) η κυτταρική σειρά Buffalo Green Monkey (BGM), η οποία επιπρόσθετα προτείνεται από την Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας του περιβάλλοντος (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) για την απομόνωση εντεροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα (Dahling et al., 1974; Guttman-Bass, 1987).

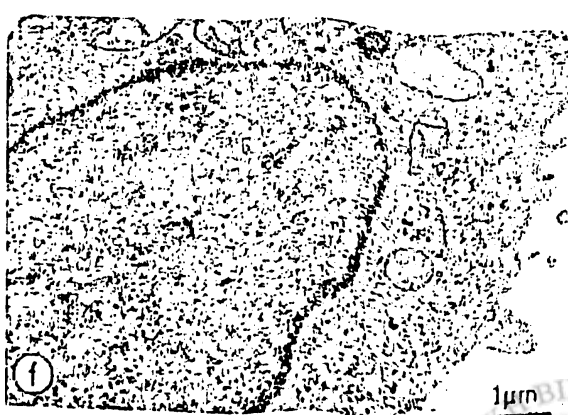
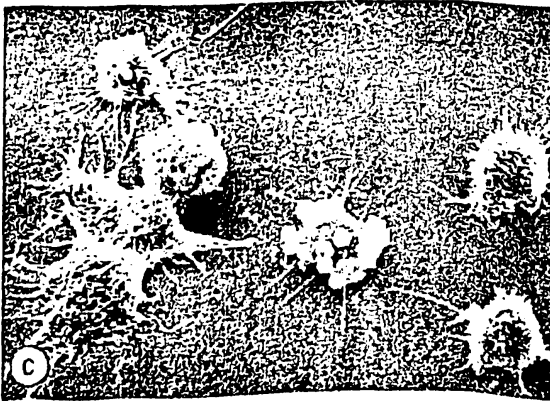
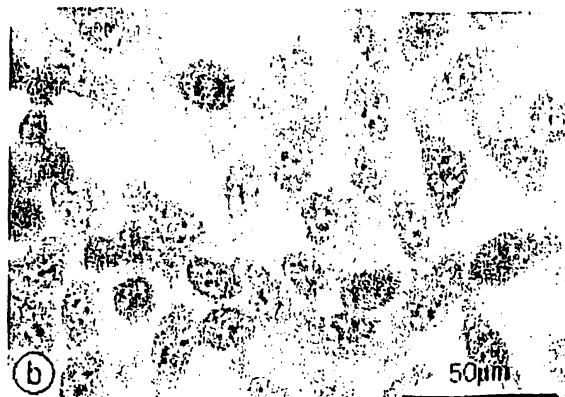
Η αναγνώριση των χαρακτηριστικών κυτταροπαθολογικών αλλοιώσεων (Εικόνα 8) θέτει τη διάγνωση μιας πιθανής λοίμωξης από εντεροϊό. Για την αναγνώριση οροτύπων με δυσκολία στην ανίχνευση και απομόνωση ή όταν τα κλινικά δείγματα περιέχουν μείγματα ιών, μπορεί να χρειαστεί χρονικό διάστημα 2 έως 3 εβδομάδων με συνεχείς ανακαλλιέργειες για την απομόνωση των υπεύθυνων εντεροϊών.

Αν και η ανίχνευση και απομόνωση σε κυτταρικές σειρές παραμένει η μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, η τεχνική δεν είναι πλήρως προτυποποιημένη. Επίσης, είναι επίπονη, χρονοβόρα, απαιτείται ειδικός εξοπλισμός και κατάλληλη χωροταξική διαμόρφωση στο εργαστήριο και επιπλέον, δεν επιτρέπει την ανάπτυξη όλων των οροτύπων των εντεροϊών, όπως πχ. των ιών Coxsackie A (Grandien et al., 1995).



Εικόνα 8. Κυτταροπαθογόνος δράση πολιοϊού

Κυτταροπαθογόνος δράση πολιοϊού οροτύπου 1 (a,c,e) σε μονόστιβο επιθήλιο κυττάρων HEp-2, σε σύγκριση με κύτταρα ελέγχου (b,d,f). (a+b): ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο, (c+d): ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning electron microscopy, SEM), (e+f): ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης (Transmission electron microscopy, TEM)
(Προσαρμογή από Cohen & Powderly. *Infectious Diseases*, 2nd Edition, Mosby, 2004).



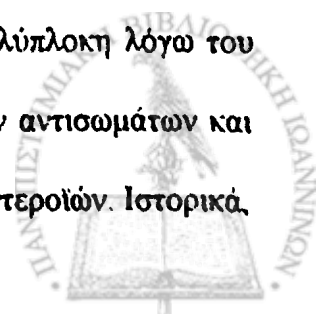
7.3. Ταυτοποίηση των εντεροϊών με μικροροξευδετέρωση

Μετά την ανίχνευση και απομόνωση του ιού με κυτταροκαλλιέργεια, ο προσδιορισμός του οροτύπου επιτυγχάνεται με εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης του με ειδικούς για τον ορότυπο αντιορούς. Για πρακτικούς λόγους, χρησιμοποιούνται μείγματα αντιορών, προερχόμενα από άλογα, που περιέχουν συνδυασμούς των ειδικών προς κάθε ορότυπο εξουδετερωτικών αντισωμάτων (Melnick, 1996). Η μέθοδος των Lim Benyesh – Melnick (LBM), που χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν, αποτελείται από οκτώ μείγματα αντιορών και επτά επιπρόσθετους αντιορούς, με τους οποίους είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν 42 διαφορετικοί ορότυποι εντεροϊών (Melnick et al., 1973) και 19 ορότυποι ιών Coxsackie A (Melnick et al., 1977). Σήμερα, στο δίκτυο εργαστηρίων πολιοϊών της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, χρησιμοποιούνται μείγματα αντιορών που έχουν αναπτυχθεί από το Εθνικό Ίδρυμα Δημόσιας Υγείας και Περιβάλλοντος (RIVM) της Ολλανδίας (Muir et al., 1998).

Η χρήση των εξουδετερωτικών αντιορών για την ταυτοποίηση των εντεροϊών παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα. Είναι πολύπλοκη και χρονοβόρα, απαιτεί εξειδικευμένο και καλά εκπαιδευμένο προσωπικό, η προμήθεια των αντιορών είναι περιορισμένη και γίνεται μόνο από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας, ενώ υπάρχουν ορότυποι οι οποίοι δεν είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν (Muir et al., 1998). Εκτός από τις μοριακές τεχνικές, έγιναν προσπάθειες ανάπτυξης μεθόδων ταυτοποίησης, όπως οι ανοσοενζυμικές (Grandien et al., 1995) και ο ανοσοφθορισμός με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Klespies et al., 1996).

7.4. Ορολογική διάγνωση

Η ορολογική διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς είναι πολύπλοκη λόγω του μεγάλου αριθμού οροτύπων, της ύπαρξης αναμνηστικών – ετεροτυπικών αντισωμάτων και της απουσίας ενός ομοιόμορφα αντιδρώντος αντιγόνου της ομάδας των εντεροϊών. Ιστορικά,



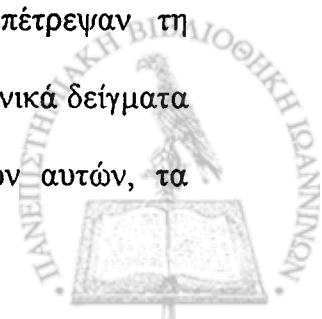
για την ορολογική διάγνωση έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές όπως α) η εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης των εντεροϊών σε μικροπλάκα β) η σύνδεση συμπληρώματος γ) η αναστολή αιμοσυγκόλλησης και δ) οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι (Melnick, 1996).

Η κυριότερη μέθοδος παραμένει η εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης σε μικροπλάκα. Η αρχή της μεθόδου, όπως προτείνεται από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας, βασίζεται στην έλλειψη λοιμογόνου ικανότητας των εντεροϊών όταν υπάρχουν εξουδετερωτικά αντισώματα (Anonymus, 1997). Απαιτούνται δύο δείγματα ορού αίματος, ένα στην οξεία φάση της λοίμωξης και ένα στη φάση ανάρρωσης 2 έως 3 εβδομάδες μετά τη λοίμωξη. Σημαντική αύξηση του τίτλου των εξουδετερωτικών αντισωμάτων επιβεβαιώνει τη διάγνωση (Grandien et al., 1995). Ωστόσο, τα εξουδετερωτικά αντισώματα παραμένουν για πολλά χρόνια ή ακόμα και εφόρου ζωής, έτσι ώστε να είναι δύσκολος ο χαρακτηρισμός της λοίμωξης ως οξείας, πρόσφατης ή παλαιάς (Melnick, 1996).

Η σύνδεση συμπληρώματος και η αναστολή αιμοσυγκόλλησης είναι δύο τεχνικές που σήμερα έχουν μειωμένη αξία και περιορισμένη εφαρμογή, καθώς έχουν χαμηλή ευαισθησία και παρουσιάζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις. Οι ανοσοενζυμικές τεχνικές τύπου δεσμευτικής ELISA (capture ELISA), είναι πιθανά πιο χρήσιμες, ωστόσο και αυτές παρουσιάζουν χαμηλή ευαισθησία (Bendig & Molyneaux, 1996). Η ανεύρεση των IgM αντισωμάτων επιτρέπει τη διάγνωση οξείας ή πρόσφατης λοίμωξης από εντεροϊό. Αντίθετα, απαραίτητη για την διάγνωση είναι η διαπίστωση τετραπλάσιας αύξησης του τίτλου των IgG αντισωμάτων.

7.5 Μοριακές τεχνικές και φυλογενετική ανάλυση

Οι γενετικές ομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων επέτρεψαν τη χρησιμοποίηση τεχνικών υβριδισμού για την ανίχνευση RNA εντεροϊών σε κλινικά δείγματα (Klingel & Kandolf, 1996). Λόγω της χαμηλής ευαισθησίας των μεθόδων αυτών, τα



τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και πιο συγκεκριμένα αυτή της Αντίστροφης Μεταγραφής / Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), κατά την οποία το εκχυλισθέν ιικό RNA μετατρέπεται πρώτα σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA). Η μελέτη των αλληλουχιών του γενετικού υλικού που έχουν δημοσιευτεί, επέτρεψε την αναγνώριση περιοχών που είναι εξαιρετικά διατηρημένες, όπως η 5'-UTR (Muir et al., 1998), καθώς και περιοχών που θεωρούνται ειδικές για τον ορότυπο, όπως συμβαίνει με την VP1 περιοχή (Oberste et al., 1999a). Οι περιοχές αυτές χρησιμοποιούνται ως στόχοι για τα εκκινητικά μόρια (primers) της RT-PCR, τα οποία ανιχνεύουν το σύνολο των εντεροϊών, ακόμα και των μη-ταυτοποιήσιμων με τις προαναφερθείσες συμβατικές μεθόδους (Rotbart, 1998; Siafakas et al., 2003).

Η περαιτέρω ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR με τεχνικές μελέτης του πολυμορφισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, RFLP) (Schweiger et al., 1994; Siafakas et al., 2003) και προσδιορισμό νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (Sequencing) / φυλογενετική ανάλυση (Oberste et al., 1999a; Oberste et al., 2003), είναι εξαιρετικά σημαντική για την ταυτοποίηση προτύπων και αγρίων στελεχών εντεροϊών. Οι νέες αυτές τεχνικές μοριακού προσδιορισμού του οροτύπου ('molecular serotyping'), αυξάνουν σημαντικά την ευαισθησία της ανίχνευσης με κυτταροκαλλιέργεια και προσφέρουν επιπρόσθετες πληροφορίες για τη βιολογία και εξέλιξη των εντεροϊών.

8. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Οι περισσότερες λοιμώξεις που προκαλούνται από εντεροϊούς είναι ήπιες και συνήθως αυτοϊώνται. Η θεραπεία του συνόλου σχεδόν των λοιμώξεων, πλην εκείνων που



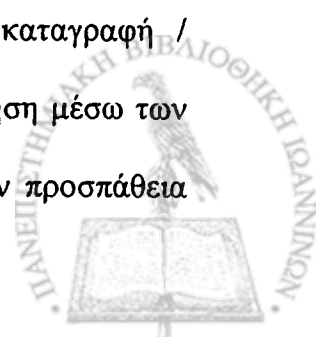
αφορούν προσβολή του ΚΝΣ, των πνευμόνων, του μυοκαρδίου και του ήπατος, είναι υποστηρικτική και συμπτωματική.

Ειδικοί παράγοντες για τη θεραπεία της πολιομυελίτιδας δεν υπάρχουν. Στην οξεία φάση της παραλυτικής πολιομυελίτιδας, οι ασθενείς θα πρέπει να νοσηλεύονται. Η κατάκλιση και η αποφυγή έντονης δραστηριότητας είναι απαραίτητες για την πρόληψη των επιπλοκών της παράλυσης (Modlin, 2000a). Το σημαντικότερο πρόβλημα που θα πρέπει να αντιμετωπιστεί άμεσα, με εισαγωγή σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) και διασωλήνωση, είναι η παράλυση των αναπνευστικών μυών.

Η χορήγηση *ιντερφερόνης* και σκευασμάτων *ανοσοσφαιρίνης* (immunoglobulin) σε ειδικές περιπτώσεις (πχ. παιδιά με οξεία μηνιγγίτιδα, νεογνά, ανοσοκατασταλμένοι), φαίνεται ότι βοηθούν στη γρηγορότερη ανάρρωση και στον περιορισμό της λοίμωξης (Rotbart, 2002). Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω κλινικές μελέτες που να επιβεβαιώνουν τα ευρήματα αυτά. Οι αντι-ϊικοί παράγοντες *pleconaril*, ο οποίος είναι αναστολέας της λειτουργίας του πρωτεϊνικού καψιδίου (Rotbart, 2002) και *eniviroxime*, ο οποίος αναστέλλει τη σύνθεση της πρωτεΐνης 3A του ιού (Heinz & Vance, 1995), παρουσιάζουν ελάχιστη έως μέτρια αποτελεσματικότητα και σημαντική τοξικότητα. Επί του παρόντος, η χορήγηση ανοσοσφαιρίνης ενδοφλεβίως φαίνεται ότι είναι η μόνη σχετικά αποτελεσματική παρέμβαση για τη θεραπεία των λοιμώξεων από εντεροϊούς.

9. ΠΡΟΛΗΨΗ

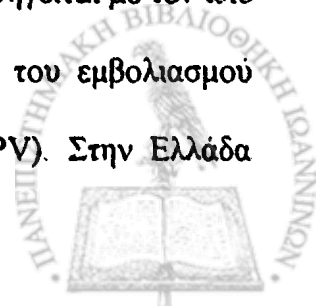
Η πρόληψη της πολιομυελίτιδας και των λοιμώξεων που προκαλούν οι υπόλοιποι εντεροϊοί είναι καθοριστικής σημασίας. Η βελτίωση των συνθηκών υγιεινής και διαβίωσης, η άνοδος του κοινωνικοοικονομικού επιπέδου, η συνεχής επιδημιολογική καταγραφή / παρακολούθηση της κυκλοφορίας των εντεροϊών και η ενεργητική ανοσοποίηση μέσω των εμβολιασμών είναι τα κυριότερα μέσα που διαθέτουμε. Κεντρική θέση στην προσπάθεια



εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας παγκοσμίως έχει το εμβόλιο IPV (Inactivated Polio Vaccine), το οποίο παρασκευάστηκε το 1950 από τον J. Salk με αδρανοποίηση και των τριών τύπων πολιοϊού με φορμαλίνη, και το εμβόλιο OPV (Oral Polio Vaccine), το οποίο παρασκευάστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 από τον A. Sabin, με ζώντα εξασθενημένα στελέχη και των τριών οροτύπων πολιοϊών, μέσω διαδοχικού ενοφθαλμισμού τους σε κατάλληλες κυτταρικές σειρές (Sabin, 1985). Και τα δύο εμβόλια έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για πάνω από 40 χρόνια. Επιπρόσθετα, στη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 παρασκευάστηκε και το ενισχυμένο αδρανοποιημένο εμβόλιο eIPV (enhanced inactivated polio vaccine), με μεγαλύτερη αντιγονική ισχύ από το προγενέστερο και το OPV (Simoes & John, 1986; McBean et al., 1988).

Το IPV χορηγείται υποδόρια ή ενδομυϊκά και μπορεί να συγχρηγηθεί με τα άλλα ενέσιμα εμβόλια της παιδικής ηλικίας, όπως της διφθερίτιδας, του τετάνου, του κοκκύτη, αλλά και το ανασυνδυασμένο εμβόλιο κατά της ηπατίτιδας Β, και έτσι να ενσωματωθεί σε συνδυασμένα εμβόλια για βρέφη και μικρά παιδιά. Το OPV χορηγείται από το στόμα, είναι χαμηλού κόστους και εύκολο στη χορήγησή του και πλεονεκτεί έναντι του IPV, λόγω της επίτευξης τοπικής ανοσίας στο πεπτικό σύστημα με την παραγωγή εκκριτικής IgA ανοσοσφαιρίνης (Melnick, 1996). Επιπλέον, ο άμεσος εμβολιασμός με OPV στη διάρκεια μιας επιδημίας πολιομυελίτιδας επιφέρει γρηγορότερη διακοπή της κυκλοφορίας του ιού εντός του πληθυσμού (Minog, 2000). Μειονεκτήματα του OPV είναι η αδυναμία χορήγησής του σε ανοσοκατασταλμένα άτομα και κυρίως ο υπαρκτός κίνδυνος πρόκλησης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (vaccine-associated paralytic poliomyelitis, VAPP).

Τα εμβόλια IPV και OPV χορηγούνται σε τέσσερις δόσεις, τον 2^ο, 4^ο, 6-18^ο μήνα της βρεφικής ηλικίας και στην ηλικία των 4-6 ετών. Και το εμβόλιο eIPV χορηγείται με τον ίδιο τρόπο (Centers for Disease Control and Prevention, 1987). Το σχήμα του εμβολιασμού μπορεί να περιλαμβάνει και μικτό εμβολιασμό (διαδοχικά eIPV / OPV). Στην Ελλάδα



χρησιμοποιείται περισσότερο το τελευταίο σχήμα εμβολιασμού, καθώς εξακολουθούν να υπάρχουν κρούσματα πολιομυελίτιδας σε γειτονικές χώρες (Prevots et al., 1998; Siafakas et al., 2000). Αντίθετα, σε χώρες όπου έχει επιτευχθεί η εκρίζωση των αγρίων στελεχών όπως πχ. στις ΗΠΑ, ήδη από το 1999 χρησιμοποιείται αποκλειστικά το εμβόλιο eIPV στα εθνικά προγράμματα εμβολιασμού (Modlin, 2000b).

Παρόλο που η πολιομυελίτιδα έχει εκριζωθεί από τον ανεπτυγμένο κόσμο, στις αναπτυσσόμενες χώρες του τρίτου κόσμου, εξακολουθεί να εμφανίζεται ενδημικά ή και επιδημικά. Ο στόχος τον οποίο έθεσε η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ) για την εξάλειψη της πολιομυελίτιδας έως το έτος 2000 (Wright et al., 1991), δεν ήταν δυνατό να επιτευχθεί και έτσι η ΠΟΥ δημοσίευσε ένα νέο στρατηγικό σχέδιο για τα έτη 2001-2005 (Anonymous, 2000). Ακόμη όμως και εάν επιτευχθεί ο στόχος της εκρίζωσης, υπάρχουν βέβαιες ανησυχίες για την επανεμφάνιση της πολιομυελίτιδας. Πιθανούς κινδύνους αποτελούν η ικανότητα μετάλλαξης των εντεροϊών, η διασπορά τους από το εργαστήριο, η βιοτρομοκρατία, η παράνομη μετανάστευση ή ακόμα και η εξάπλωσή της από ανοσοκατασταλμένα άτομα, στα οποία οι ιοί μπορούν να πολλαπλασιάζονται χωρίς εμφανή εικόνα νόσησης (Minor, 2000).



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση και απομόνωση εντεροϊών σε ενήλικες ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV), χωρίς συμπτώματα λοίμωξης του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, ή άλλης σχετικής με τους εντεροϊούς ευκαιριακής λοίμωξης. Η απομόνωση των ιών από δείγματα κοπράνων ασθενών σε στάδιο νόσου (AIDS), δηλαδή στα κλινικά στάδια A3, B3 και C3, σύμφωνα με την ταξινόμηση του Κέντρου Ελέγχου Νοσημάτων των Ηνωμένων Πολιτειών (Centers for Disease Control, CDC), πραγματοποιήθηκε σε κυτταροκαλλιέργειες. Εν συνεχεία, έγινε η ταυτοποίησή των εντεροϊών με μοριακές τεχνικές.

Στόχος επίσης της μελέτης ήταν η ανάπτυξη και εφαρμογή μιας νέας μεθόδου ανίχνευσης και ταυτοποίησης εντεροϊών από περιβαλλοντικά δείγματα. Μελετήθηκαν εντεροϊοί, οι οποίοι συγκεντρώθηκαν και απομονώθηκαν από μη-επεξεργασμένα αστικά λύματα χρησιμοποιώντας την τεχνική VIRADEN (ακρωνύμιο των λέξεων VIRus Adsorption ENumeration). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει προσρόφηση και καταμέτρηση των ιών σε μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης. Αρχικά τα απομονωθέντα στελέχη κατατάχθηκαν σε γενετικές υποομάδες με τη χρήση του ενζύμου περιορισμού HpaII, με βάση το προφίλ περιορισμού της 5'-UTR περιοχής του γενώματος των εντεροϊών. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε με τεχνικές μοριακής βιολογίας ο ορότυπος των στελεχών. Ειδικότερα, τμήμα του γενώματος που κωδικοποιεί την δομική πρωτεΐνη VP1 ενισχύθηκε με Αντίστροφη Μεταγραφή - Αλυσιδωτή Αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR) και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων με sequencing.

Η παρούσα διερεύνηση κινήθηκε εντός των πλαισίων του στρατηγικού σχεδιασμού της ΠΟΥ για την εκρίζωση της πολιομυελίτιδας παγκοσμίως στο χρονικό διάστημα 2001 – 2005.



A. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ AIDS

1. ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Υλικό-δείγματα

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν δείγματα κοπράνων ασθενών με HIV λοίμωξη σε στάδιο νόσου και σημαντική ανοσοανεπάρκεια. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο χρονικό διάστημα από 2-8-2002 έως 1-10-2002, στη Μονάδα Ειδικών Λοιμώξεων του Γενικού Νοσοκομείου 'Κοργιαλένειο-Μπενάκειο' του Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού (Ε.Ε.Σ).

Εξετάστηκαν 19 δείγματα κοπράνων τα οποία προέρχονταν από αντίστοιχους ενήλικες Έλληνες ασθενείς με AIDS. Οι ασθενείς αυτοί εκπλήρωναν το κριτήριο του μικρότερου από 200/μl απόλυτου αριθμού CD4+ T-λεμφοκυττάρων, σε μία τουλάχιστον μέτρηση ολικού αίματος, το τελευταίο εξάμηνο πριν από τη μελέτη. Όλοι οι ασθενείς βρίσκονταν υπό αντιρετροϊκή αγωγή. Οι δεκαοκτώ ασθενείς ήταν άνδρες και μία ήταν γυναίκα. Οκτώ (42%) ανήκαν στην Ομάδα C3, οκτώ (42%) στην ομάδα B3 και τρεις (16%) στην Ομάδα A κατά CDC. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 46 έτη (εύρος 22-68), το μέσο χρονικό διάστημα από την ορομετατροπή 8 έτη (εύρος 1-15) και ο μέσος αριθμός CD4+ T-λεμφοκυττάρων 125/μl (εύρος 3-240/μl στην τελευταία μέτρηση).

Η συλλογή των δειγμάτων γινόταν σε ευρύστομους αποστειρωμένους συλλέκτες. Τα δείγματα αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία -40°C σε ειδικούς καταψύκτες, μέχρι την εξέτασή τους, η οποία περιλάμβανε τις τεχνικές της κυτταροκαλλιέργειας και της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).



1.2 Μέθοδοι

1.2.1 Κυτταροκαλλιέργεια

Μετά την απόψυξη των κοπράνων, 2 gr από κάθε δείγμα προσθέτονταν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 10ml PBS, 5 gr glass beads για καλύτερη ομογενοποίηση και ανάδευση και 0.5 ml χλωροφόρμιο. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά, και συλλογή του υπερκειμένου, το οποίο χρησιμοποιείτο για τον ενοφθαλμισμό στις κυτταρικές σειρές (Αnonymous, 1996).

Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές σύμφωνα με τις οδηγίες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (Αnonymous, 1996; Αnonymous, 1998). Αυτές οι κυτταρικές σειρές ήταν:

(i) η κυτταρική σειρά **Hep-2**, η οποία προέρχεται από ανθρώπινο επιδερμοειδές καρκίνωμα,

(ii) η κυτταρική σειρά **RD (rhabdomyosarcoma)**, προερχόμενη από κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος και

(iii) η κυτταρική σειρά **L20_B**, η οποία προέρχεται από κύτταρα ποντικού, τα οποία είναι γενετικώς τροποποιημένα για να εκφράζουν στην κυτταρική τους μεμβράνη τον υποδοχέα **PVR (Polio Virus Receptor)** των ανθρωπίνων κυττάρων για τους πολιοϊούς.

Τα κύτταρα βρίσκονταν σε διάταξη μονόστιβου επιθηλίου μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιείχαν 2ml D-MEM.

Σε κάθε κυτταρική σειρά γινόταν:

- ενοφθαλμισμός με 150-180μl υπερκειμένου από την επεξεργασία των κοπράνων και εν συνεχεία,
- επώαση των σωλήνων εντός ειδικού, σταθερά περιστρεφόμενου κυλίνδρου στους 37°C



- παρακολούθηση επί επτά ημέρες, με καθημερινή οπτική παρατήρηση με ανάστροφο μικροσκόπιο, για αναζήτηση κυτταροπαθογόνων αλλοιώσεων.
- Μετά το πέρας της πρώτης εβδομάδας παρατήρησης, ακολουθούσε επανενοφθαλμισμός (έως τρεις συνολικά φορές για κάθε δείγμα).
- Τυπικά μοτίβα τέτοιων αλλοιώσεων, που αφορούν τους εντεροϊούς και στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, είναι η εστιακή ή διάχυτη, ταχέως και τυχαία εξελισσόμενη, εξοίδηση και μεγέθυνση των κυττάρων, τα οποία εμφανίζονται υαλοειδή και τελικά αποκολλώνται από την επιφάνεια του σωληναρίου (Εικόνα 8) (Koneman et al., 1997; Cohen & Powderly, 2004)

Μετά την πάροδο του πρώτου επταημέρου και εφόσον δεν παρατηρούνταν κυτταροπαθογόνος αλλοίωση, γινόταν

- επανενοφθαλμισμός, έως δύο επιπλέον φορές σε κάθε δείγμα..
- Σε όλες τις περιπτώσεις, χρησιμοποιούνταν μη ενοφθαλμισμένες κυτταρικές σειρές, ως αρνητικοί μάρτυρες

1.2.2 Μοριακές τεχνικές: Αντίστροφη Μεταγραφή – Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Λόγω του πιθανά χαμηλού αρχικού αριθμού των εντεροϊών, στο επόμενο πειραματικό στάδιο εφαρμόστηκε η τεχνική της Αντίστροφης Μεταγραφής/ Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (RT-PCR). Χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μοριακής ανίχνευσης εντεροϊών. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της RNA εκχύλισης και της ειδικής για εντεροϊούς Αντίστροφης Μεταγραφής/ Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (RT-PCR), με τη χρήση του ζεύγους εκκινητικών μορίων UG₅₂/UC₃₃, στην σημαντικά διατηρούμενη φυλογενετικά περιοχή 5'-UTR του γενώματος των εντεροϊών (Muir et al., 1998; Georgopoulou et al., 2000). Για την εκχύλιση του RNA:



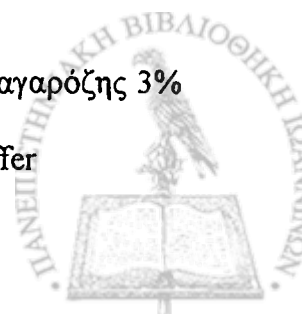
- 150μl ενοφθαλμισμένων κυττάρων προστίθεντο σε 600μl lysis buffer και 2μl glycogen και ακολουθούσε επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου (Casas et al., 1997). Ακολούθως,
- προστίθονταν 750 μl isopropyl alcohol (-20° C), γινόταν επώαση για 15 λεπτά στους 4°C, φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14000xg στους 4 °C, πλύση με 70% ethanol (1ml) και νέα φυγοκέντρηση στις 14000xg

Το εκχυλισθέν RNA χρησιμοποιείται για την παρασκευή συμπληρωματικού DNA (cDNA) με την μέθοδο της **Αντίστροφης Μεταγραφής**:

- σε 5 μl RNA από κάθε δείγμα προστίθεντο 2μl anti-sense primer και 20 units αναστολέα RNAsών (Promega Corporation, Madison, WI) και ακολουθούσε επώαση στους 70°C για 5 λεπτά.
- μετά από άμεση τοποθέτηση σε πάγο, προστίθεντο 5μl RT 5xbuffer, 5μl dNTPs 10mM, 100 units RTase M-MLV (Promega) και 6μl Rnase-free water (Sigma Aldrich, St Louis, MO)
- ακολουθούσε επώαση στους 42°C για μία ώρα και ανενεργοποίηση της RTase M-MLV με θέρμανση στους 95 °C για 5 λεπτά.

Τρία μl από το παραχθέν cDNA, ενισχύονταν με **Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)** σε μείγμα που περιλάμβανε:

- 5μl 10xPCR buffer, 5μl dNTPs 10mM, 2μl MgCl₂ 50mM, 33μl Rnase-free water, 2 units Taq Platinum DNA πολυμεράση (Invitrogen Ltd, Life Technologies, Paisley, UK) και 2μl primers UG₅₂/UC₅₃ 20pmol/ml
- 40 κύκλοι Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης πραγματοποιούνται στον Θερμικό Κυκλοποιητή Perkin-Elmer 9600
- ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα (gel) αгарόζης 3% (Gibco BRL) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο 1μg/ml σε TBE buffer



- η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της RT-PCR στο τελικό πήκτωμα αγαρόζης, γινόταν μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (FOTO/PHORESIS I, FOTODYNE, Hartland, WI, USA).



2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε κανένα από τα 19 δείγματα κοπράνων που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκε κυτταροπαθολογική δράση. Κυτταροπαθολογικό αποτέλεσμα δεν παρατηρήθηκε σε κανένα δείγμα ακόμη και μετά τον τρίτο ενοφθαλμισμό των κυτταρικών σειρών (συνολική διάρκεια παρατήρησης: τρεις εβδομάδες ανά δείγμα).

Η μέθοδος της Αντίστροφης Μεταγραφής / Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (RT-PCR) χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα, τα οποία ελήφθησαν από όλες τις κυτταρικές σειρές μετά και την τρίτη ανακαλλιέργεια. Η οπτική παρατήρηση των τελικών προϊόντων της RT-PCR στο πήκτωμα αγαρόζης δεν αποκάλυψε την ύπαρξη RNA εντεροϊών. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα στοιχεία των ασθενών (ηλικία, ημερομηνία ορομετατροπής, ομάδα HIV κατά CDC, αριθμός CD4+ κυττάρων και ιικό φορτίο), καθώς και τα αποτελέσματα της ανίχνευσης εντεροϊών στα δείγματα κοπράνων με τις μεθόδους της κυτταροκαλλιέργειας και της RT-PCR.



Πίνακας 3. Στοιχεία ασθενών και αποτελέσματα ανίχνευσης για εντεροϊούς στο σύνολο των δειγμάτων

Α/α	Η/Α	ΗΜΕΡ/ΝΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡ/ΝΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ HIV	ΣΤΑΔΙΟ ΝΟΣΟΥ	Απόλυτος αριθμός ΛΕΜΦΟ-ΚΥΤΤΑΡΩΝ	Απόλυτος αριθμός CD4+ (FC)	ΊΚΟ ΦΟΡΤΙΟ HIV Copies/ml ¹	ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗ ΦΑ ¹	CPE ²	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΊΚΟΥ RNA ENTEPOΪΩΝ
1	35	2-8-2002	7/1997	C3	500	12	238460	OXI	-	-
2	42	6-8-2002	9/2001	C3	1600	74	121	OXI	-	-
3	39	7-8-2002	1/1992	C3	1300	24	403974	NAI	-	-
4	61	7-8-2002	3/1994	B3	900	127	<50	OXI	-	-
5	46	7-8-2002	8/1996	B3	1300	184	3794	NAI	-	-
6	22	8-8-2002	11/1987	C3	1000	20	<50	NAI	-	-
7	34	9-8-2002	7/1994	C3	600	17	3961	OXI	-	-
8	45	9-8-2002	11/2001	B3	1400	187	236	OXI	-	-
9	44	9-8-2002	1/1993	B3	3100	182	24767	NAI	-	-
10	43	12-8-2002	6/1994	C3	2300	171	170605	NAI	-	-
11	49	4-9-2002	5/2000	C3	1700	204	<50	NAI	-	-
12	50	11-9-2002	12/1990	C3	3000	113	52595	OXI	-	-
13	45	12-9-2002	12/1990	B3	2000	200	27433	NAI	-	-
14	40	17-9-2002	3/1990	A3	1300	127	<50	OXI	-	-
15	55	18-9-2002	10/1998	A3	1800	240	<50	OXI	-	-
16	68	20-9-2002	10/1992	A3	1100	160	<50	OXI	-	-
17	52	24-9-2002	1/1992	B3	1400	131	185030	NAI	-	-
18	40	25-9-2002	2/1992	B3	2400	189	<50	NAI	-	-
19	50	26-9-2002	5/1992	B3	1600	109	315658	NAI	-	-

¹ Φαρμακευτική αγωγή

² κυτταροκαθγονικό αποτέλεσμα υπό το οπτικό μικροσκόπιο



3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

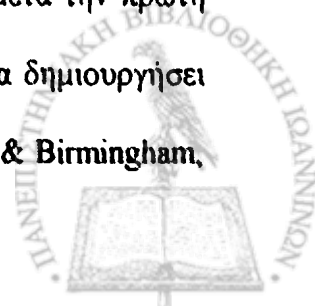
Σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί τις τελευταίες δεκαετίες για την εκκρίζωση της Πολιομυελίτιδας σε ολόκληρο τον πλανήτη. Το 1988 η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ) έθεσε ως στόχο την εκκρίζωση της Πολιομυελίτιδας παγκοσμίως έως το έτος 2000. Η απόφαση αυτή ήρθε ως συνέχεια της επιτυχίας εκκρίζωσης της ευλογιάς το 1977 και της εκκρίζωσης της Πολιομυελίτιδας στη Βόρεια Αμερική, γεγονός που απέδειξε ότι κάτι τέτοιο είναι εφικτό (Anonymous, 1999). Αξιοσημείωτη πρόοδος επιτεύχθηκε μέχρι αυτή την ημερομηνία-στόχο, ωστόσο η νόσος στις αρχές της νέας χιλιετίας εξακολουθούσε να ενδημεί σε δέκα περίπου χώρες. Από το 2002 η Ευρώπη θεωρείται ελεύθερη αγρίων στελεχών, όμως το φαινόμενο της μετακίνησης και μετανάστευσης πληθυσμών από χώρες που η νόσος ενδημεί προς το εσωτερικό της ηπείρου δημιουργεί κινδύνους. Έτσι, σύμφωνα με το νεότερο στρατηγικό σχεδιασμό της ΠΟΥ για τα έτη 2000-2005 (Anonymous, 2000), στις χώρες που θεωρούνταν ότι έχει εκκριζωθεί η νόσος, θα έπρεπε η εκκρίζωση να πιστοποιηθεί μέσα από ένα πρόγραμμα πρότυπης και συνεχούς εργαστηριακής επιδημιολογικής παρακολούθησης. Επιπλέον, ήταν σημαντικό να αναζητηθούν και εντοπιστούν οι πληθυσμοί εκείνοι που θα ήταν δυνατό να αποτελέσουν μακροπρόθεσμα 'δεξαμενές' του ιού στο γενικό πληθυσμό.

Στην Ελλάδα, οι λοιμώξεις με εντεροϊούς γενικότερα δεν είναι συχνές, ενώ οι πολιοϊοί που απομονώθηκαν τα τελευταία χρόνια στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Εντεροϊών ήταν στην μεγάλη τους πλειονότητα στελέχη του εμβολίου Sabin. Η επανεμφάνιση αγρίων στελεχών πολιοϊού το 1996, ταυτόχρονα σχεδόν με την επιδημία στην γειτονική Αλβανία και ενώ επί 14 χρόνια δεν είχε απομονωθεί άγριο στέλεχος του ιού (Siafakas et al., 2000), υποδείκνυε ότι η προσπάθεια θα έπρεπε και θα πρέπει να είναι συνεχής και επίμονη.



Στα πλαίσια της εργαστηριακής επιδημιολογικής επιτήρησης και της αναζήτησης 'θυλάκων' πολιοϊών και γενικότερα εντεροϊών στο γενικό πληθυσμό της χώρας μας, αναζητήθηκε η ύπαρξή τους σε άτομα με HIV λοίμωξη σε προχωρημένο στάδιο νόσου. Παρόλο που η ανεύρεση στελεχών στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι διαγνωστική, η απομόνωση εντεροϊών από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό σπάνια είναι εφικτή. Αντιθέτως, ο ιός συχνά απεκκρίνεται στα κόπρανα για αρκετές εβδομάδες (μέχρι και οκτώ συνολικά) σε άτομα με κλινικές και υποκλινικές ενδείξεις. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι, σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (ηλικιωμένοι, βρέφη, ασθενείς υπό χημειοθεραπεία ή ανοσοκατασταλτική θεραπεία, συγγενείς και επίκτητες διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως λοίμωξη με HIV και ασθενείς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο) και πιο συγκεκριμένα σε άτομα με διαταραχή της χυμικής ανοσίας, ο ιός πολλαπλασιάζεται εντός του εντέρου για μεγάλα χρονικά διαστήματα (έως και δέκα έτη) και έτσι τα άτομα αυτά εμφανίζουν έως και 3000 φορές υψηλότερο κίνδυνο για παραλυτική πολιομυελίτιδα (Bellmunt et al., 1999; Martin et al., 2000; Siafakas et al., 2000). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, επιλέχθηκαν ως δείγμα της παρούσας μελέτης τα κόπρανα.

Λόγω της εκτεταμένης ανοσοκαταστολής, η οποία αφορά τόσο στο κυτταρικό όσο και στο χυμικό σκέλος της ειδικής ανοσίας, οι ασθενείς με AIDS θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανή πηγή παραμονής των πολιοϊών στον πληθυσμό στη 'μετά την εκρίζωση' εποχή. Ένας σημαντικός αριθμός βιβλιογραφικών δεδομένων (Mckinney et al., 1987; Kew et al., 1998; Bellmunt et al., 1999; Gavrilin et al., 2000; Martin et al., 2000), υποδεικνυε στην έναρξη της μελέτης ότι είναι δυνατόν ένας ασθενής να εκκρίνει στα κόπρανά του πολιοϊούς για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την πρώτη επαφή του με τον ιό. Η μακροχρόνια αυτή αποβολή θα μπορούσε να δημιουργήσει σημαντικές επιπλοκές στο πρόγραμμα εκρίζωσης της νόσου (Dowdle & Birmingham,



1997). Η έκθεση των ανοσοκατασταλμένων ατόμων στα εξασθενημένα στελέχη του εμβολίου από το στόμα είτε με απευθείας εμβολιασμό είτε μετά από επαφή με εμβολιασθέντα άτομα (παιδιά ανοσοκατασταλμένων ατόμων), δημιουργεί σοβαρούς κινδύνους για τους ασθενείς αυτούς και είναι γνωστό ότι θα πρέπει να αποφεύγεται. Ήταν επομένως πολύ σημαντικό να γίνει μία αρχική εκτίμηση της επίπτωσης των επίμονων λοιμώξεων με πολιοϊούς στους ασθενείς με AIDS. Η ανακάλυψη μοριακών δεικτών, οι οποίοι πιθανά συσχετίζονται με τον μακροχρόνιο πολλαπλασιασμό των στελεχών του εμβολίου στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου, θα μπορούσε να αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμη.

Μέχρι σήμερα, δεν έχει αναφερθεί αυξημένη επίπτωση παραλυτικής πολιομυελίτιδας σχετιζόμενης με στελέχη εμβολίου, ακόμη και σε χώρες με πολύ υψηλά ποσοστά οροθετικών ατόμων. Στους ασθενείς με HIV λοίμωξη, η παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων είναι λιγότερο διαταραγμένη σε σχέση με ασθενείς με πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια. Εξουδετερωτικά αντισώματα ανιχνεύονται σε παιδιά με HIV λοίμωξη μετά τη χορήγηση του εμβολίου από του στόματος (Ryder et al., 1993). Ωστόσο, στους ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο νόσου η παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων διαταράσσεται σημαντικά. Σε αυτούς τους ασθενείς η αναζήτηση ανασυνδυασμένων στελεχών είναι σημαντική (Guillot et al., 2000a; Georgoroulou & Markoulatos, 2001). Ο μακροχρόνιος πολλαπλασιασμός των ιών στο γαστρεντερικό σωλήνα, σε συνδυασμό με τον υψηλό ρυθμό λαθών στην αντιγραφή του ιικού RNA και τον μοριακό ανασυνδυασμό, είναι παράγοντες που ευνοούν το γενετικό ανασυνδυασμό μεταξύ των στελεχών του εμβολίου ή ακόμη και μεταξύ αγρίων στελεχών και στελεχών εμβολίου. Ο ανασυνδυασμός μπορεί να αποτελέσει πιθανό μηχανισμό βιολογικής εξέλιξης των στελεχών του εμβολίου Sabin



προς στελέχη με ειδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, τα οποία άλλως θα αναπτύσσονταν με πολύ αργότερο ρυθμό μέσω των φυσικών μεταλλάξεων.

Τα αρνητικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης κατά κάποιο τρόπο επισημαίνουν τον χαμηλό επιπολασμό των λοιμώξεων από εντεροϊούς στον ελληνικό χώρο. Επιβεβαιώνουν επίσης σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητα των νεοτέρων συνδυασμών αντιρετροϊκών φαρμάκων στον περιορισμό της νοσηρότητας και θνητότητας των ασθενών με AIDS. Οι δύο κύριες κατηγορίες φαρμακευτικών παραγόντων και κυρίως τα νουκλεοσιδικά ανάλογα αναστολείς των πρωτεασών, φαίνεται ότι περιορίζουν σημαντικά την ικανότητα των εντεροϊών για χρόνια πολλαπλασιασμό στο γαστρεντερικό σύστημα των ασθενών με AIDS. Φυσικά, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι, προβλήματα που αφορούν στο μέγεθος και την αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος περιορίζουν τη δυνατότητα γενίκευσης των αποτελεσμάτων. Ωστόσο, δεν θα πρέπει να διαφεύγει το γεγονός της δυσκολίας ανεύρεσης και μελέτης ασθενών σε τόσο προχωρημένο στάδιο της νόσου. Μελλοντικές μελέτες ενδέχεται και ελπίζουμε να επιβεβαιώσουν τα ευρήματα αυτά.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ένδειξη ότι οι ασθενείς με AIDS και σημαντική ανοσοανεπάρκεια, δεν παρουσιάζουν ευπάθεια σε λοιμώξεις από εντεροϊούς και δεν αποτελούν πιθανή 'δεξαμενή' εντεροϊών για το γενικό πληθυσμό στον ελλαδικό χώρο.



B. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

1. ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Υλικό – περιβαλλοντικά δείγματα

Στο χρονικό διάστημα Απριλίου 2003 – Μαρτίου 2004 πραγματοποιήθηκαν 26 συνολικά δειγματοληψίες μη επεξεργασμένων αστικών λυμάτων και μελετήθηκαν περαιτέρω τα δείγματα εκείνα από τα οποία απομονώθηκαν εντεροϊοί. Τα λύματα συλλέχθηκαν από τους σταθμούς επεξεργασίας των πόλεων της Λευκωσίας και της Λεμεσού της Κύπρου και τον σταθμό επεξεργασίας αποβλήτων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου των Ιωαννίνων.

- **Συλλογή δειγμάτων**

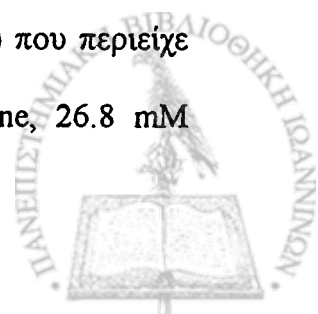
Δύο δείγματα μη-επεξεργασμένων λυμάτων, όγκου 1 λίτρο το καθένα, με χρονική διαφορά 30 λεπτών της ώρας, συλλέχθηκαν σε κάθε δειγματοληψία. Η συλλογή πραγματοποιήθηκε από το υπάρχον εκπαιδευμένο προσωπικό των σταθμών επεξεργασίας τις πρωινές ώρες, οπότε και παρατηρείται η αιχμή της εισόδου λυμάτων στους σταθμούς (Ανοnymous, 2003). Η μεταφορά των δειγμάτων έγινε σε αποστειρωμένους συλλέκτες με βιδωτό πώμα σε θερμοκρασία 4°C. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο την ημέρα της συλλογής.

1.2 Μέθοδοι

1.2.1 Μέθοδος VIRADEN

- **Κύτταρα, υλικά και αντιδραστήρια**

Για τον πολλαπλασιασμό των εντεροϊών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Buffalo Green Monkey (BGM). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Eagle's Minimum Essential Medium με Earle's salts (MEM, Gibco™, Invitrogen, Paisley, UK) που περιείχε 5% ορό εμβρύου μοσχαριού (fetal bovine serum, FBS), 2 mM L-glutamine, 26.8 mM NaHCO₃, 100 U πενικιλίνη ανά ml και 100 μg στρεπτομυκίνη ανά ml.



Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη των τρυβλίων (standard plaque assay) ήταν το Medium 199 με Earle's salts (Gibco™) συμπληρωμένο με 2% ορό εμβρύου μοσχαριού, 26.8 mM NaHCO₃, 100 U πενικιλίνη ανά ml, και 100 mg στρεπτομυκίνη ανά ml. Το υλικό αυτό προετοιμάστηκε ως ένα διάλυμα διπλής συγκέντρωσης και αναμίχθηκε πριν τη χρήση με ίσο όγκο 2% κεκαθαμένου άγαρ (Oxoid, Hampshire, United Kingdom).

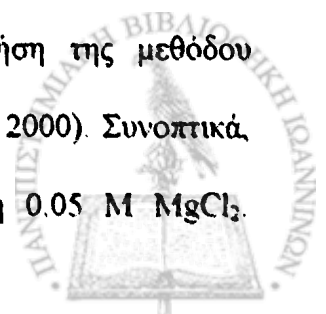
Τόσο στο θρεπτικό υλικό, όσο και στο μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τη επικάλυψη των τρυβλίων, προστέθηκαν επιπλέον αντιβιοτικά: πενικιλίνη (100U/ml), στρεπτομυκίνη (100mg/ml), γενταμυκίνη (50mg/ml), νυστατίνη (50mg/ml) και κεφταζιδίμη (20mg/ml). Όλα τα αντιβιοτικά πλην της κεφταζιδίμης αποκτήθηκαν από την εταιρεία Gibco. Η κεφταζιδίμη (Ceftazidime Fortum 1g) αποκτήθηκε από την εταιρεία GlaxoWellcome (Greenford, United Kingdom). Η κεφταζιδίμη διαλύθηκε σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό σε μια συγκέντρωση 10,000 mg per ml και αποθηκεύτηκε στους -20°C. Μετά την απόψυξη, η κεφταζιδίμη χρησιμοποιήθηκε εντός 7 ημερών.

- **Προ-φίλτρα και φίλτρα μεμβράνης**

Τα διαλυμένα στερεά σωματίδια και το μικροβιακό φορτίο των λυμάτων απομακρύνθηκε από τα δείγματα με τη χρήση ειδικών φίλτρων (0.22-μm-pore-size, syringe-driven hydrophilic Polyether Sulphonate (PES) filter units; SLGP R25 LS, Millipore Corp.), όπως έχει ήδη περιγραφεί (Mocé-Llivina et al., 2002; Mocé-Llivina et al., 2003). Για την απομόνωση και συγκέντρωση των ιών από τα δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα νιτρικής κυτταρίνης με μέγεθος πόρου 3μm και διάμετρο 47mm (Millipore, Bedford, MA).

- **Προσρόφηση των ιών στις μεμβράνες και ανίχνευση με τη μέθοδο VIRADEN**

Αρχικά, οι ιοί που υπήρχαν στα μη-επεξεργασμένα δείγματα αστικών λυμάτων προσροφήθηκαν στα ειδικά φίλτρα νιτρικής κυτταρίνης με τη χρήση της μεθόδου VIRADEN, όπως αυτή έχει περιγραφεί παλαιότερα (Parageorgiou et al., 2000). Συνοπτικά, στο αρχικό δείγμα προστέθηκε MgCl₂·6H₂O σε τελική συγκέντρωση 0.05 M MgCl₂.



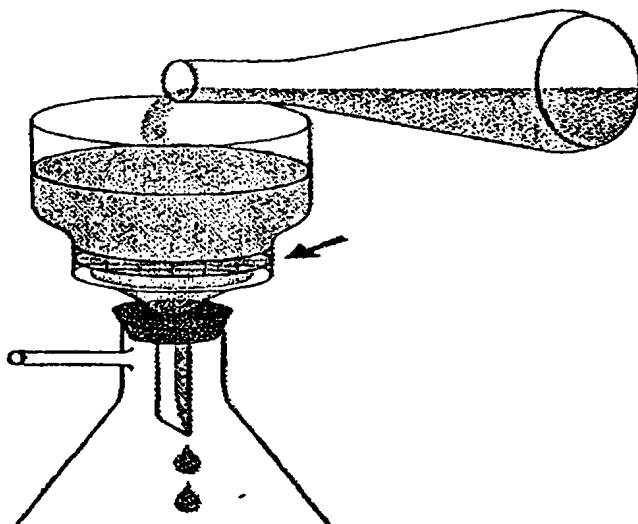
Ακολούθησε διήθηση με το φίλτρο νιτρικής κυτταρίνης διαμέτρου 47mm και πόρου 3μm σε μία ταχύτητα ροής, η οποία ποτέ δεν ξεπερνούσε τα 200 ml ανά min (Εικόνα 9α). Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλενόταν με 100 ml στείρου 0.05 M MgCl₂. Οι όγκοι που εξετάζονταν για κάθε δείγμα ήταν 5, 10 και 20 ml. Η μέθοδος VIRADEN μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μη-επεξεργασμένα λύματα όγκου έως 20 ml, χωρίς σημαντική απώλεια της ικανότητας συγκέντρωσης των ιών (Moce-Llivina et al., 2003).

Στο τελικό στάδιο, οι προσροφημένοι στην μεμβράνη ιοί ανιχνεύτηκαν και καταμετρήθηκαν πάνω σε ένα μονόστιβο επιθήλιο BGM κυττάρων ως ακολούθως (Εικόνα 9β). Αρχικά, απορρίπτονταν το θρεπτικό υλικό ενός διαμέτρου 60 mm τρυβλίου όπου είχε αναπτυχθεί μονόστιβο επιθήλιο. Στη συνέχεια, τοποθετούνταν στο κέντρο του τρυβλίου 100 μl εναιωρήματος κυττάρων BGM σε θρεπτικό υλικό MEM συμπληρωμένο με αντιβιοτικά, το οποίο περιείχε $1.75 \pm 0.25 \times 10^7$ κύτταρα ανά ml. Η μεμβράνη με τους προσροφημένους ιούς, τοποθετούνταν ανάποδα πάνω στο πλούσιο εναιώρημα και το μονόστιβο επιθήλιο των κυττάρων. Στο τελευταίο στάδιο, 5 ml του μέσου για την επικάλυψη των τρυβλίων ρίπτονταν αργά στο κέντρο της μεμβράνης και αφήνονταν να διασκορπιστεί σε ολόκληρο το τρυβλίο. Η διαδικασία εκτελούνταν υπό άσηπτες συνθήκες. Το άγαρ αφήνόταν να στερεοποιηθεί προστατευμένο από το φως και τα τρυβλία επωάζονταν στους 37°C παρουσία 5% CO₂ σε σχετική υγρασία πάνω από 80% για 48 έως 72 ώρες. Μετά την επώαση, τόσο το άγαρ όσο και η μεμβράνη προσεκτικά αφαιρούνταν με μία σπάτουλα. Το τρυβλίο εξετάζονταν προσεκτικά για την αναζήτηση κυτταροπαθογόνου δράσης (cytopathogenic effect, CPE) επί του μονόστιβου επιθηλίου με τη μορφή πλακών (Εικόνα 10). Από κάθε πλάκα, γινόταν δειγματοληψία υλικού με τη χρήση 3-4ml στείρου απεσταγμένου νερού και αποστειρωμένης πιπέτας. Το υλικό αυτό χρησιμοποιούνταν στη συνέχεια για να επιμολύνει εκ νέου BGM

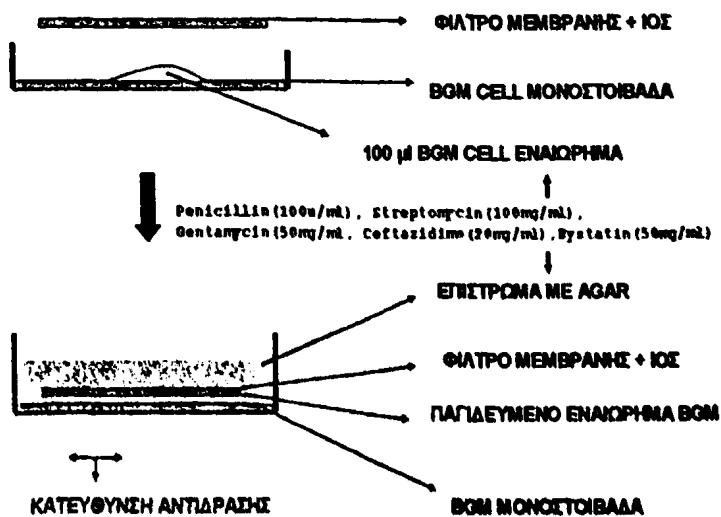


Εικόνα 9. Α. Σχηματική αναπαράσταση τεχνικής VIRADEN: αρχικά το δείγμα περνά μέσω φίλτρου 20 μm που δεν κατακρατεί τους ιούς. **Β.** Εφαρμογή της μεθόδου VIRADEN στο μονόστιβο BGM επιθήλιο (προσαρμογή από Parageorgiou, 2000)

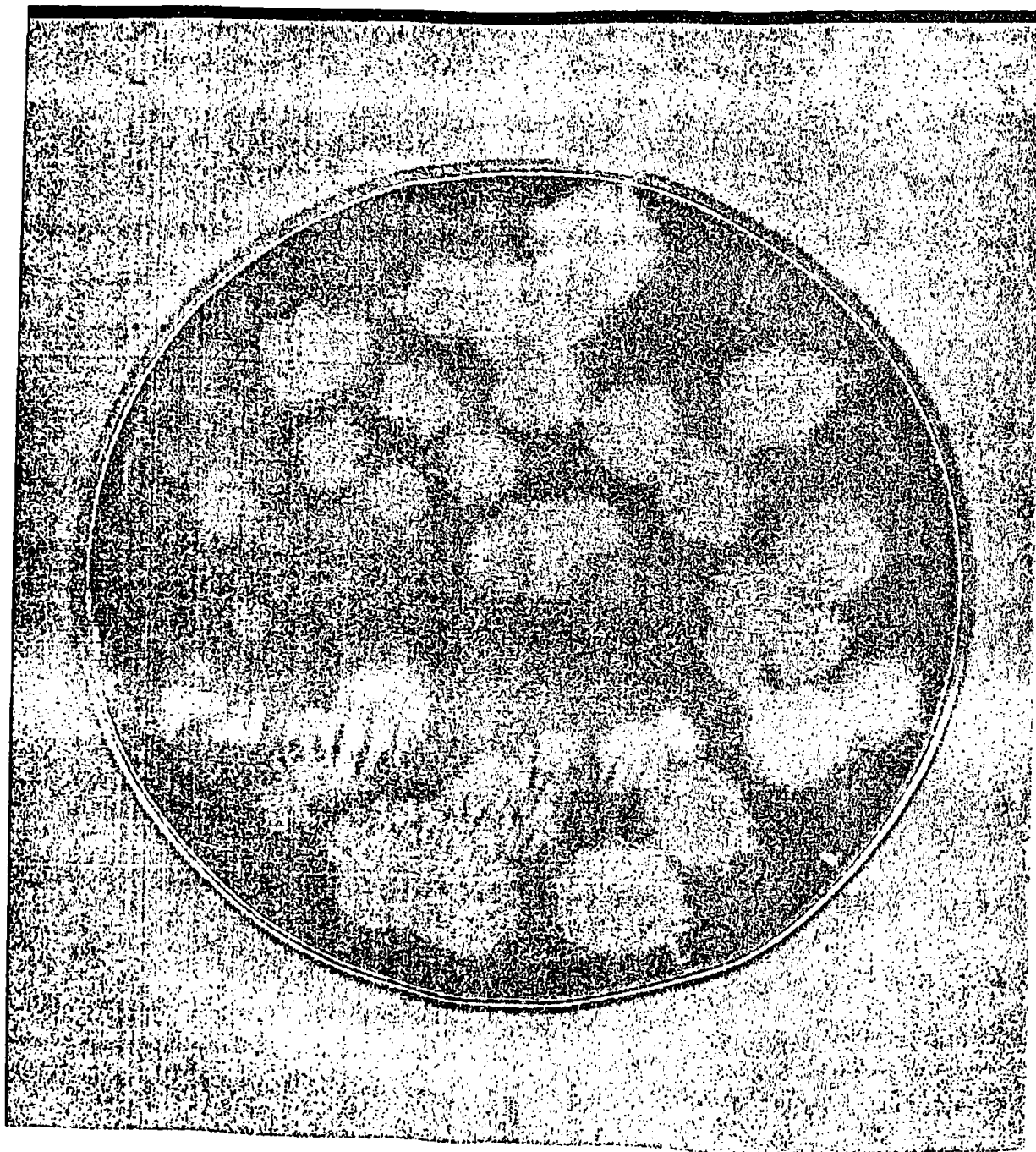
Α.



Β.



Εικόνα 10. Παρατήρηση πλακών επί του μονόστιβου BGM επιθηλίου μετά από χρώση με 0.1% κρυσταλλικό ιώδες



κύτταρα σε δίσκους κυτταροκαλλιεργειών 24 θέσεων. Η ανάμιξη υλικού από διαφορετικές πλάκες αποφεύγονταν συστηματικά. Τα τελικά προϊόντα, δηλαδή οι επιμολυσμένες κυτταρικές καλλιέργειες, αποθηκεύονταν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία και εξέτασή τους.

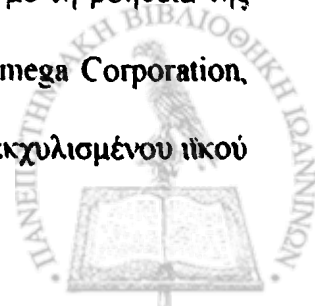
1.2.2 Μοριακές τεχνικές

1.2.2.1 Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση του ιϊκού RNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που έχει περιγραφεί από τους Casas et al. (1995) και εφαρμόστηκε κατευθείαν στα τελικά προϊόντα της VIRADEN. Η τεχνική της εκχύλισης του RNA περιελάμβανε τη χρήση ενός διαλύματος, το οποίο περιείχε θειοκυανιούχο γουανιδίνη (GuSCN), έναν χαοτροπικό παράγοντα, και δεν απαιτούσε τη χρήση οργανικού διαλύτη. Ειδικότερα, σε 100μl τελικού προϊόντος της VIRADEN προσθέτονταν 400μl διαλύματος GuSCN και 50μg κατεψυγμένου γλυκογόνου και το μείγμα επωάζονταν για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το μείγμα συμπληρωνόταν με 500μl ισοπροπανόλης (-20°C) και ακολουθούσε δεύτερη επώαση σε πάγο για 20 min. Το μείγμα φυγοκεντρώνταν σε 14,000xg για 10min στους 4°C , το υπερκείμενο απορρίπτονταν και το ίζημα ξεπλένονταν με 1ml αιθανόλης 70%. Η φυγοκέντρηση επαναλαμβανόταν σε 14,000xg για 10min στους 4°C , και το υπερκείμενο απορρίπτονταν εκ νέου. Το ίζημα αφήνονταν να στεγνώσει στους 70°C για 5 λεπτά και τελικά διαλύονταν σε 50μl δις-απεσταγμένου νερού. Η επάρκεια της χρησιμοποιούμενης μεθόδου εκχύλισης του RNA και η παρουσία αναστολέων της ενίσχυσής του σε κάθε δείγμα ελέγχονταν με τη χρήση εκκινητών α-τουμπουλίνης (Markoulatos et al., 2001).

1.2.2.2 Αντίστροφη Μεταγραφή –Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR)

Το απομονωμένο RNA μετατράπηκε σε συμπληρωματικό cDNA με τη βοήθεια της Αντίστροφης Μεταγραφής. Αρχικά, 40 μονάδες αναστολέα RNase (Promega Corporation, Madison, WI), 2μl d(N)₉ εκκινητών (50pmol/μl) (Takara, Japan) και 5 μl εκχυλισμένου ιϊκού



RNA από κάθε δείγμα αναμιγνύονταν και θερμαίνονταν στους 70°C για 5 λεπτά. Τα σωληνάρια τοποθετούνταν άμεσα στο πάγο και 5μl RT 5x ρυθμιστικού διαλύματος, 5μl dNTPs 10mM, 100 μονάδες RTase M-MuLV (Promega Corporation) και 6,5μl RNase-free water (Sigma Aldrich) προστίθεντο σε κάθε σωληνάριο, φτιάχνοντας ένα συνολικό μείγμα αντίδρασης 25μl. Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 1 ώρα και η άνοδος της θερμοκρασίας στους 95°C για 5 λεπτά απενεργοποιούσε την M-MuLV RTase. Το παραγόμενο cDNA ενισχύνονταν με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας ένα νέο μείγμα αντίδρασης 50μl ανά σωληνάριο, το οποίο περιείχε 5μl 10× PCR ρυθμιστικό διάλυμα, 5μl dNTPs 10mM, 2 μl MgCl₂ 50mM (φτιάχνοντας τελική συγκέντρωση MgCl₂ 2mM), 32,6μl RNase-ελεύθερο νερό, 2 μονάδες Taq Πολυμεράση (BIOTAQ, Moscow, Russia), 5μl cDNA, και 2μl από κάθε ένα από τα δύο ζεύγη εκκινητών, είτε το ζεύγος UC₅₃ και UG₅₂ (20pmol/tube), ή 292 και 222 (50pmol/tube). Σαράντα κύκλοι αποδιάταξης (94°C, 10sec), διαχωρισμού (42°C, 30sec) και επέκτασης (74°C, 10sec), ακολουθούμενοι από επώαση 15 λεπτών στους 78°C ώστε να ολοκληρωθεί η επέκταση των εκκινητών, εκτελούνταν σε ένα Θερμικό Κυκλοποιητή Perkin-Elmer 9600 Thermal Cycler:

<i>1 κύκλος</i>	<i>95° C</i>	<i>4 min</i>
<i>40 κύκλοι</i>	<i>95° C</i>	<i>10 secs</i>
	<i>42° C</i>	<i>30 secs</i>
	<i>74° C</i>	<i>10 secs</i>
<i>1 κύκλος</i>	<i>78° C</i>	<i>15 min</i>

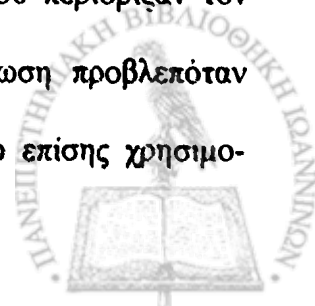


Δέκα μl από κάθε ενισχυμένο προϊόν αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2.5% (Gibco BRL, ultra pure agarose, electrophoresis grade), που περιείχε 1μg/μl βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide in Tris-Boric acid-EDTA buffer, TBE). Στη συνέχεια, τα προϊόντα της ενίσχυσης γινόταν ορατά με τη χρήση του UV transilluminator FOTO/PHORESIS I, FOTODYNE (Hartland, WI).

Το εκκινητικό μόριο UC₅₃ (anti-sense), με την αλληλουχία 5'-TTGTCACCATAACCAGCCA-3', (θέσεις 583-601 στο γένωμα του ιού CAV9, στέλεχος αναφοράς "Griggs") και το εκκινητικό μόριο UG₅₂ (sense), με τη αλληλουχία 5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3', (θέσεις 167-187 στο γένωμα του ιού CAV9, στέλεχος αναφοράς "Griggs") επιλέχθηκαν ως ομόλογα σε συγκεκριμένες περιοχές εντός της πολύ διατηρημένης περιοχής 5'-UTR (Πίνακας 4). Συντέθηκαν και αποκτήθηκαν από την εταιρεία Genosys Biotechnologies (Cambridge, UK). Αυτοί οι εκκινητές δίνουν προϊόν σε ύψος 435 ζευγών βάσεων (Εικόνα 11α). Η αποθήκευσή τους γινόταν στους -20°C (Siafakas et al., 2000; Georgopoulou & Markoulatos 2001; Siafakas et al., 2001a).

Το εκκινητικό μόριο 292 (sense), με την αλληλουχία 5'-MIGCIGYIGARACNGG-3' (θέσεις 2612-2627 στο γένωμα του στελέχους αναφοράς PV1 reference strain Mahoney) και το εκκινητικό μόριο 222 (anti-sense), με την αλληλουχία 5'-CICCIGGIGGIAYRWACAT-3' (θέσεις 2969-2951 στελέχους αναφοράς PV1 reference strain Mahoney), χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί την καψιδική πρωτεΐνη VP1 (Oberste et al., 1999b; Oberste et al., 2003) (Πίνακας 4). Αυτοί οι εκκινητές δίνουν προϊόν σε ύψος κατά προσέγγιση 350 ζευγών βάσεων (Εικόνα 11α). Η αποθήκευση και αυτών γινόταν στους -20°C.

Όλες οι διαδικασίες και τεχνικές εκτελούνταν υπό συνθήκες που περιορίζαν τον κίνδυνο επιμόλυνσης με 'εξωγενές' γενετικό υλικό. Σε κάθε περίπτωση προβλεπόταν χωροταξικός διαχωρισμός των διαδικασιών πριν και μετά την PCR, ενώ επίσης χρησιμο-



Πίνακας 4. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην Αντίστροφη Μεταγραφή – Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης (RT-PCR).

<u>ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ</u>	<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ*</u>
<u>ΘΕΣΗ**</u>	
UG52	5' CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG 3' 162-182
UC53	5' TTGTCACCATAACCAGCCA 3' 577-595
292	5' MIGCIGYIGARACNGG 3' 2612-2627
<u>222</u>	<u>5' CICCIGGIGGIAYRWACAT 3' 2969-2951</u>

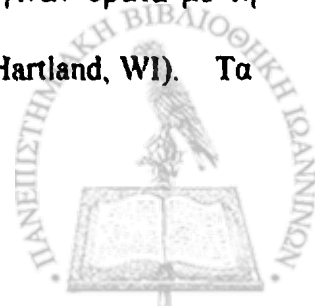
* I, deoxyinosine



ποιούνταν διαφορετικές ομάδες πιπετών με ειδικά ρύγχη μιας χρήσεως σε κάθε στάδιο, π.χ. προετοιμασία του μείγματος αντίδρασης, προσθήκη δειγμάτων, και ηλεκτροφορητική ανάλυση των ενισχυμένων προϊόντων. Χρησιμοποιήθηκαν αρνητικοί μάρτυρες και ήταν πάντα RT-PCR-αρνητικοί, γεγονός ενδεικτικό της αποτελεσματικότητας των προληπτικών μέτρων που λαμβάνονταν.

1.2.2.3 Αρχική ταυτοποίηση, με μελέτη του πολυμορφισμού των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια UC₅₃/UG₅₂ (Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, RFLP)

Έχει αποδειχθεί ότι η ανάλυση της 5'-UTR γενωμικής περιοχής με το ένζυμο περιορισμού HpaII ταξινομεί με ακρίβεια τόσο τα στελέχη αναφοράς όσο και τα 'άγρια' στελέχη εντεροϊών σε 5 διακριτές γενετικές υποομάδες, χωρίς να παρατηρείται ενδο-οροτυπική ποικιλομορφία στους παραγόμενους με το ένζυμο HpaII απλοτύπους (Siafakas et al., 2003) (Πίνακας 5). Με δεδομένη την πληροφορία αυτή, προχωρήσαμε σε μία αρχική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια UC₅₃/UG₅₂. Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού HpaII (New England Biolabs, Beverly, MA), όπως έχει ήδη περιγραφεί (Siafakas et al., 2003). Εν συντομία, 1μl του κατάλληλου 10x ρυθμιστικού διαλύματος, 20 μονάδες του ενζύμου περιορισμού (2μl) και 1μl απεσταγμένου, RNase-ελεύθερου αποστειρωμένου νερού (Sigma Aldrich) προστέθηκαν σε 6μl από κάθε ένα από τα προϊόντα της RT-PCR με τα μόρια UC₅₃/UG₅₂, που αφορούσαν στα απομονωθέντα με τη μέθοδο VIRADEN στελέχη εντεροϊών. Ο τελικός όγκος του μείγματος ήταν 10μl. Εν συνεχεία, τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 2 ώρες και τα προϊόντα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε gel υψηλής ανάλυσης αгарόζης 3% (Metaphor FMC Bioproducts, Rockland ME) που περιείχε 1μg/μl βρωμιούχο αιθίδιο. Τα προϊόντα έγιναν ορατά με τη χρήση του UV transilluminator FOTO / PHORESIS I, FOTODYNE (Hartland, WI). Τα



Πίνακας 5. Ταξινόμηση συνόλου κλινικών και στελεχών αναφοράς εντεροϊών σε γενετικές υποομάδες, με βάση το προφίλ περιορισμού με την περιοριστική ενδονουκλεάση HpaII. Απεικονίζονται ο αριθμός και το μήκος των παραχθέντων τμημάτων των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια UG₅₂ / UC₅₃ (Siafakas et al., 2003). Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται οι δύο υποομάδες, όπου ανήκουν τα απομονωθέντα στελέχη της παρούσας εργασίας (βλέπε Πίνακα 7).

ΣΤΕΛΕΧΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	ΠΡΟΦΙΛ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ (Μήκος σε ζεύγη βάσεων)
CAV2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16 CBV1, 2, 3, 4, 5 ECV1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 27, 29, 33 ENV73	213+148+55+18 (Cluster I)
CAV1, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 24 PV1 (Sabin and Mahoney), PV2 (MEF and Lansing), PV3 (Saukett) ENV70	161+148+108+18 (Cluster II)
ECV3, 11, 12, 15, 26 CBV5 ENV71	268+149+18 (Cluster III)
CAV11, 22 PV2 Sabin	148+121+108+40+18 (Cluster IV)
PV3 Sabin	148+148+121+18 (Cluster V)



αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού GelPro Analyzer software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

1.2.2.4 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (Sequencing) και Φυλογενετική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια 292/222

Καθώς δεν είναι δυνατό να υπάρξει άμεση συσχέτιση μεταξύ της γενωμικής περιοχής 5'-UTR και του οροτύπου των εντεροϊών (Siafakas et al., 2003), πραγματοποιήθηκε επίσης προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τμήματος της VP1 γενωμικής περιοχής για τα περιβαλλοντικά στελέχη τα οποία απομονώθηκαν. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίστηκαν οι ορότυποι αυτών των στελεχών, σύμφωνα με το μοντέλο το οποίο έχει προταθεί από τους Oberste & συν. (1999a; 2003). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η VP1 γενωμική περιοχή περιλαμβάνει σημαντικούς επιτόπους, οι οποίοι είναι ειδικοί για τον ορότυπο. Τα προϊόντα ενίσχυσης των στελεχών της VIRADEN με τα εκκινητικά μόρια 292/222 εκχυλίστηκαν μέσα από το ηλεκτροφορητικό gel με τη χρήση του NucleoSpin® Extract Isolation Kit (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) και στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων από την Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Η ταυτότητα του οροτύπου κάθε στελέχους προσδιορίστηκε με βάση τη σύγκριση της αλληλουχίας του τμήματος της VP1 με αντίστοιχες αλληλουχίες όλων των ανθρώπινων εντεροϊών, που έχουν κατατεθεί και είναι διαθέσιμες στην βάση δεδομένων GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος BLAST έκδοση 2.2.8 (διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997).

Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βάση την ανά ζεύγος σύγκριση των αλληλουχιών τμήματος της VP1 των στελεχών που απομονώθηκαν με τις αντίστοιχες τμηματικές αλληλουχίες της VP1 στελεχών αναφοράς και 'αγρίων' στελεχών εντεροϊών του ανθρώπου του ίδιου οροτύπου, που είναι επίσης διαθέσιμες στη βάση δεδομένων GenBank,



με την βοήθεια του λογισμικού ClustalW, το οποίο είναι διαθέσιμο από τον διαδικτυακό τόπο του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής (European Bioinformatics Institute, EBI) στην ηλεκτρονική διεύθυνση www.ebi.ac.uk/ClustalW. Οι κωδικοί πρόσβασης (accession numbers) όλων των γενετικών αλληλουχιών που αποκτήθηκαν σε αυτή ή σε προγενέστερες μελέτες και χρησιμοποιήθηκαν για την φυλογενετική σύγκριση παρατίθενται στους Πίνακες 7 και 8. Ο σχεδιασμός των φυλογενετικών δέντρων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ClustalX (έκδοση 1.83), χρησιμοποιώντας τα αρχεία ευθυγράμμισης (alignment files) που αποκτήθηκαν από την ανάλυση με το λογισμικό ClustalW. Με το πρόγραμμα αυτό, υπολογίζονται οι αποστάσεις ανάμεσα σε όλα τα ζεύγη αλληλουχιών και στην συνέχεια εφαρμόζεται η μέθοδος με την χαρακτηριστική ονομασία neighbour-joining (Thompson et al., 1994). Τα δενδρογράμματα, όπου απεικονίζονται οι φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα στα στελέχη που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη, στα στελέχη αναφοράς και στα 'άγρια' στελέχη εντεροϊών που έχουν κατατεθεί στη βάση GenBank, σχεδιάστηκαν σε μορφή PHYLIP χρησιμοποιώντας το λογισμικό TreeView software, έκδοση 3.0 (Page, 1996). Το λογισμικό αυτό αποκτήθηκε από τον διαδικτυακό τόπο του Πανεπιστημίου της Γλασκώβης στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod/html>.



2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

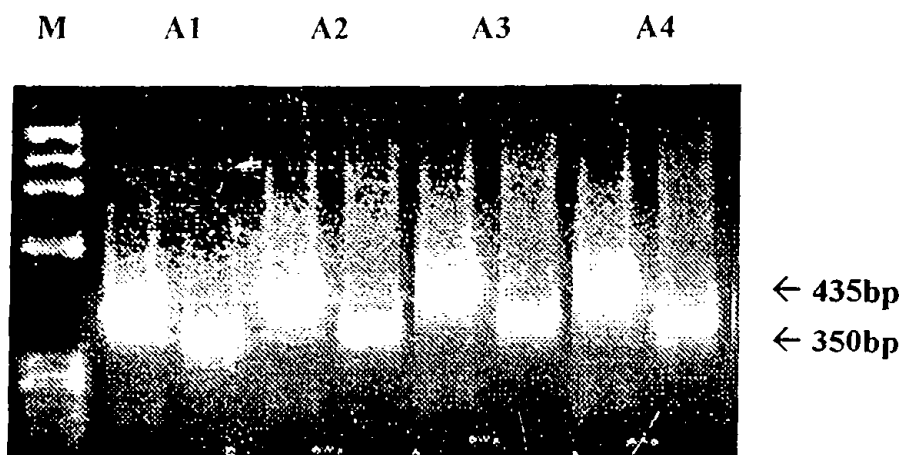
Από τα 26 δείγματα αστικών λυμάτων, τα οποία συλλέχθηκαν από τους τρεις σταθμούς βιολογικής επεξεργασίας αποβλήτων, μελετήθηκαν τα 12, στα οποία απομονώθηκαν εντεροϊοί με την τεχνική VIRADEN (Πίνακας 6). Από αυτά, 4 δείγματα προέρχονταν από την Λευκωσία (Απρίλιος, Μάιος, Σεπτέμβριος, Δεκέμβριος 2003), 5 από την Λεμεσό (Μάιος -2 δείγματα, Σεπτέμβριος, Δεκέμβριος 2003, Ιανουάριος, Φεβρουάριος 2004) και 2 από τα Ιωάννινα (Ιανουάριος, Φεβρουάριος 2004). Από τα δείγματα αυτά συγκεντρώθηκαν και απομονώθηκαν συνολικά 104 στελέχη εντεροϊών, από τα οποία 27 (26%) προέρχονταν από την Λευκωσία, 67 (64%) από την Λεμεσό και 10 (10%) από τα Ιωάννινα. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα απομονωθέντα στελέχη, η γεωγραφική και χρονική τους προέλευση, η HpaII γενετική υποομάδα στην οποία ανήκαν, ο προσδιορισθείς με sequencing ορότυπος, το επί της εκατό ποσοστό (%) ομοιότητας των βάσεων του RNA κατά την ταυτοποίηση και οι αριθμοί πρόσβασης στη διεθνή βάση δεδομένων GenBank, όπου έχουν κατατεθεί οι πρωτότυπες αλληλουχίες.

Όλα τα στελέχη προκάλεσαν κυτταροπαθογόνο δράση στο μονόστιβο επιθήλιο των BGM κυττάρων, αποκαλύπτοντας την παρουσία αναπαραγόμενων, δυνητικά λοιμογόνων ιών. Τα αναμενόμενα προϊόντα ενίσχυσης μήκους κατά προσέγγιση 435 νουκλεοτιδίων με το ζεύγος εκκινητικών μορίων UC₅₃/UG₅₂ και 350 νουκλεοτιδίων με το ζεύγος εκκινητικών μορίων 292/222 παρήχθησαν με επιτυχία (Εικόνα 11α). Επιπρόσθετα, η ενίσχυση των στελεχών με ειδικούς εκκινητές α-τουμπουλίνης έδωσε θετικά αποτελέσματα, αποδεικνύοντας την επάρκεια της μεθόδου εκχύλισης RNA με GuSCN, στα πλαίσια τόσο της εκχύλισης επαρκούς ποσότητας RNA από τα περιβαλλοντικά δείγματα, όσο και του περιορισμού της δράσης των αναστολέων PCR.

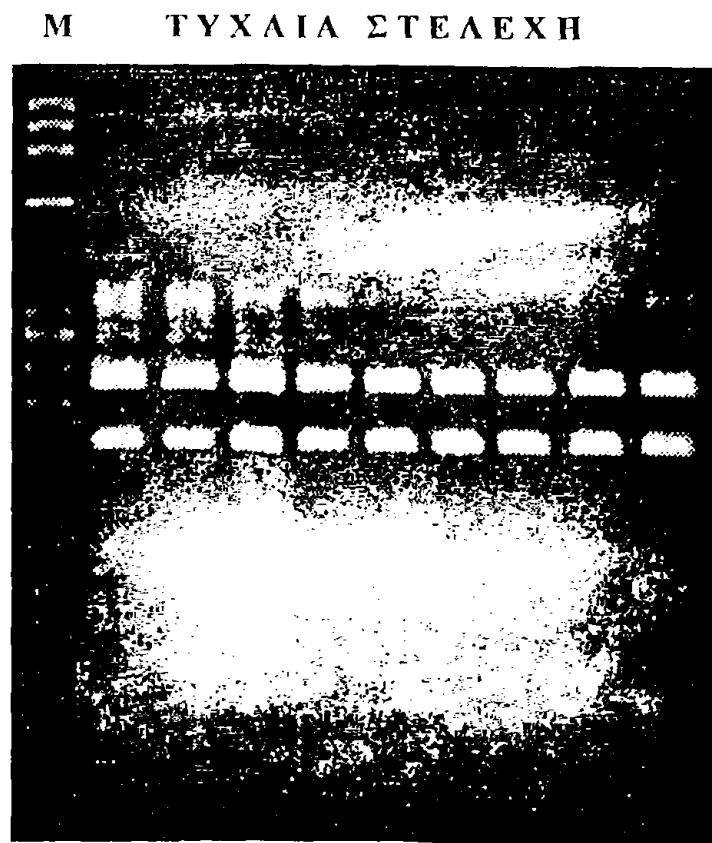
Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της RFLP ανάλυσης με την περιοριστική ενδονουκλεάση HpaII, για την αρχική ταξινόμηση των στελεχών που απομονώθηκαν σε



Εικόνα 11α. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα προϊόντων ενίσχυσης με τα εκκινητικά μόρια UG₅₂/UC₅₃ (435-bp) και 292/222 (350bp) (Απομονωθέντα στελέχη A1, A2, A3, A4)



Εικόνα 11β. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της RFLP ανάλυσης των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια UC₅₃/UG₅₂ για στελέχη εντεροϊών που απομονώθηκαν. Χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση HpaII. Όλα τα απομονωθέντα στελέχη πλην ενός (στέλεχος Λευκωσίας A5, το οποίο δεν απεικονίζεται στη φωτογραφία) ανήκαν στην ίδια γενετική υποομάδα, με προφίλ περιορισμού αποτελούμενο από 4 τμήματα με μήκος νουκλεοτιδίων 213, 149, 55 και 18, αντίστοιχα. Η ένδειξη M αντιστοιχεί στο μάρτυρα μοριακού βάρους (ΦΧ174 HaeIII-generated restriction fragments, Gibco BRL).



γενετικές υποομάδες παρουσιάζονται στην Εικόνα 11β. Όλα τα απομονωθέντα στελέχη πλην ενός (στέλεχος Λευκωσίας A5, δεν απεικονίζεται στην Εικόνα 11) ανήκαν στην ίδια γενετική υποομάδα, με προφίλ περιορισμού που αποτελείτο από 4 τμήματα με μήκος 213, 149, 55 και 18 νουκλεοτίδια, αντίστοιχα. Αυτή η γενετική υποομάδα περιλαμβάνει 38 διακριτούς οροτύπους της ομάδας Human Enterovirus Species B, που έχουν ήδη περιγραφεί λεπτομερώς (Πίνακας 5) (Siafakas et al., 2003). Με αυτόν τον τρόπο έγινε μία πρώτη, αρχική υπόθεση σε σχέση με την πιθανή ομάδα οροτύπων στους οποίους ανήκαν τα απομονωθέντα στελέχη. Το απομονωθέν στέλεχος A5 ήταν και το μοναδικό το οποίο ανήκε σε διαφορετική γενετική υποομάδα, με προφίλ περιορισμού που αποτελούνταν από πέντε τμήματα μήκους 148, 121, 108, 40 και 18 νουκλεοτιδίων. Αυτή η γενετική υποομάδα περιλαμβάνει τρεις εντεροϊούς της ομάδας “polio-like”, όπως προκύπτει από την ταξινόμηση με βάση την 5'-UTR γενωμική περιοχή: ένα στέλεχος PV2 του εμβολίου Sabin και τα στελέχη CAV 11 και 22, παρέχοντας και σε αυτήν την περίπτωση επίσης, την πρώτη ένδειξη σε σχέση με την πιθανή οροτυπική ταυτότητα του απομονωθέντος στελέχους.

Οι προσδιορισθείσες αλληλουχίες τμήματος της VP1 γενωμικής περιοχής των απομονωθέντων στελεχών συγκρίθηκαν φυλογενετικά με διαθέσιμες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων GenBank και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Το εύρος αποτελεσμάτων ταύτισης των προσδιορισθέντων αλληλουχιών σε σχέση με τις αλληλουχίες στελεχών αναφοράς και ‘αγρίων’ στελεχών εντεροϊών που έχουν ήδη καταγραφεί κυμαίνονταν μεταξύ 82 και 98%. Η δεύτερη υψηλότερη βαθμολογία ταύτισης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις μικρότερη από 70%. Επιπλέον, όλα τα στελέχη του ίδιου οροτύπου παρουσίαζαν υψηλό ποσοστό ομοιότητας των αλληλουχιών της VP1 περιοχής (98-100%), ένδειξη ότι πιθανότατα προέρχονταν εξελικτικά από το ίδιο στέλεχος του συγκεκριμένου οροτύπου.



Όλα τα απομονωθέντα στελέχη πλην ενός ανήκαν στην ομάδα των non-polio εντεροϊών (NPEVs). Ειδικότερα, οι προσδιορισθέντες ορότυποι στο σύνολο των προερχόμενων από την Κύπρο στελεχών ήταν 43/94 CBV4 (46%), 17/94 CBV5 (18%), 12/94 CAV9 (13%), 12/94 CBV2 (13%), 8/94 CBV1 (8%), 1/94 PV2 (1%) και 1/94 ECV7 (1%). Αντίστοιχα, στα δύο θετικά δείγματα από τα Ιωάννινα, προσδιορίστηκαν 7/10 CBV4 (70%) και 3/10 CBV1 (30%) (Εικόνα 12α). Επίσης, επιβεβαιώθηκε η ταυτόχρονη επικράτηση τριών έως πέντε οροτύπων, καθώς και η περιοδικότητα που ορισμένοι ορότυποι παρουσιάζουν σε μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή στο πέρασμα του χρόνου (Sedmak et al., 2003). Στη Λευκωσία για παράδειγμα, ενώ στους πρώτους μήνες του 2003 ο επικρατέστερος ορότυπος ήταν αυτός του ιού CAV9, στο τέλος του έτους επικρατούσε ο ιός CBV4. Αντίστοιχα, στη Λεμεσό επικρατέστερος ορότυπος τον Μάιο του 2003 ήταν ο CBV5, το Σεπτέμβριο του 2003 ο CBV2 και στο τέλος του 2003 και αρχές του 2004 ο CBV4. Τέλος, στα δείγματα που προέρχονται από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, επικρατέστερος ορότυπος ήταν ο CBV4 (Εικόνα 12β).

Θα πρέπει να επισημανθεί το γεγονός ότι η ανάλυση πολυμορφισμού με το ένζυμο HpaII προέβλεψε ορθά την γενετική υποομάδα όλων των απομονωθέντων κλινικών στελεχών πλην των στελεχών CBV5. Ειδικότερα, όλα τα απομονωθέντα στελέχη CAV9, CBV4, CBV2, CBV1 και ECV7, παρουσίασαν προφίλ περιορισμού ταυτόσημο με το προφίλ περιορισμού της ομάδας εντεροϊών που περιείχε τα αντίστοιχα στελέχη του ίδιου οροτύπου. Τα στελέχη που αναγνωρίστηκαν ως CBV5 ανήκαν στην ίδια γενετική υποομάδα με τα παραπάνω απομονωθέντα στελέχη, ωστόσο, σύμφωνα με προηγούμενα δεδομένα (Siafakas et al., 2003), ο ορότυπος CBV5 ανήκει σε διαφορετική γενετική υποομάδα, από την οποία λείπει μία θέση περιορισμού με το ένζυμο HpaII (τμήματα περιορισμού μήκους 268, 149 και 18 νουκλεοτιδίων) σε σχέση με το προφίλ περιορισμού που παρατηρήθηκε. Οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων που αποκτήθηκαν από την 5'-UTR γενωμική περιοχή για



πέντε από αυτά τα CBV5 απομονωθέντα στελέχη, κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GenBank με αριθμούς πρόσβασης AY599872-AY599876.

Όσον αφορά επίσης το στέλεχος πολιοϊού που απομονώθηκε, ο προσδιορισμός τμήματος της VP1 γενωμικής περιοχής αποκάλυψε ότι ήταν στέλεχος εμβολίου Sabin τύπου 2. Το προφίλ περιορισμού με το ένζυμο HpaII κατέταξε το συγκεκριμένο στέλεχος σε μία γενετική υποομάδα, η οποία πράγματι περιλαμβάνει τον PV2 Sabin και δύο άλλα στελέχη CAV της "polio-like" ομάδας της 5'-UTR. Η συγκεκριμένη υποομάδα περιλαμβάνει μόνο τον PV2 στέλεχος του εμβολίου Sabin και όχι ένα άλλο 'άγριο' πρωτότυπο στέλεχος PV2, παρέχοντας επιβεβαίωση της πιθανής προέλευσης του στελέχους από το εμβόλιο.

Τέλος, η φυλογενετική σύγκριση των απομονωθέντων στελεχών με τα στελέχη αναφοράς καθώς και τα 'άγρια' στελέχη, απέδειξε την με βάση τον ορότυπο κατάταξη των στελεχών (Εικόνες 13 και 14-20). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα απομονωθέντα στελέχη PV2, CBV5, CBV4 και λιγότερο τα στελέχη CAV9, παρουσίασαν την μεγαλύτερη ταύτιση με βάση τις αλληλουχίες τμήματος της VP1 με στελέχη εντεροϊών που έχουν απομονωθεί σε άλλες περιοχές της Ευρώπης, της Ασίας, της Βορείου Αφρικής και της Μέσης Ανατολής (Εικόνες 14, 15, 18 και 19). Ειδικότερα, τα στελέχη PV2 παρουσίασαν μεγαλύτερη συσχέτιση με στελέχη PV2 προέλευσης εμβολίου που έχουν απομονωθεί στο Ισραήλ το 2002 (μη δημοσιευμένα δεδομένα που αποκτήθηκαν από την βάση δεδομένων GenBank) και στην Αίγυπτο από το 1983 έως το 1993 (Yang et al., 2003), ενισχύοντας την προέλευση του στελέχους από το εμβόλιο Sabin. Οι δύο ορότυποι των ιών CBV και τα στελέχη CAV9 συσχετιζόνταν εξελικτικά με παρόμοια στελέχη που απομονώθηκαν στο Βέλγιο από το 1999 έως το 2002 (Thoelen et al., 2004) και ειδικότερα τα στελέχη ιών CBV4 συσχετιζόνταν με στελέχη του ίδιου οροτύπου που έχουν απομονωθεί τις τέσσερις τελευταίες δεκαετίες στη Γαλλία, τη Φιλανδία, τη Ρουμανία, τη Δανία, τη Βόρειο Αμερική και το Πακιστάν (Mulders et al., 2000).



3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρουσιάστηκε μία απλή, τεχνικά εύκολη, οικονομική και αποτελεσματική μέθοδος για τη συγκέντρωση και καταμέτρηση κυταροπαθογόνων ιών από τα αστικά λύματα. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει προσρόφηση των ιών σε μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης (Parageorgiou et al., 2000). Κατά προσέγγιση, 140 ιοί είναι δυνατό να απομονωθούν στο νερό και στα λύματα. Οι εντερικοί ιοί που αναγνωρίζονται και συμμετέχουν σε επιδημίες ή σε σημαντικές ασθένειες στον πληθυσμό και ανιχνεύονται στο νερό είναι οι ιοί Norwalk, οι ρεοϊοί, οι ιοί Rota, οι αδενοϊοί, ο ιός της ηπατίτιδας A και οι εντεροϊοί (Metcalf et al, 1995). Οι εντεροϊοί είναι αυτοί που έχουν ανιχνευθεί συχνότερα (Rusin et al., 2000). Το γένος των εντεροϊών, το οποίο είναι και το σημαντικότερο της οικογένειας των Picornaviridae από την άποψη της παθογένειας στον άνθρωπο (Melnick, 1996; Stanway, 1990), περιλαμβάνει, όπως προαναφέρθηκε, 65 ανοσολογικά διακριτούς οροτύπους, που κατατάσσονται σε 5 ομάδες Human Enterovirus Species (A-D και Poliovirus) (King et al., 2000). Οι εντεροϊοί εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό με την κοπρανοστοματική οδό, πολλαπλασιάζονται στο γαστρεντερικό σύστημα, και τελικά απορρίπτονται στο περιβάλλον με τα κόπρανα. Παρόλο που ανευρίσκονται σε νερά που έχουν μολυνθεί από λύματα, η υδατογενής μετάδοσή τους έχει επιβεβαιωθεί περιστασιακά, λόγω του ότι οι λοιμώξεις που προκαλούνται είναι στην πλειοψηφία τους υποκλινικές (Rusin et al., 2000).

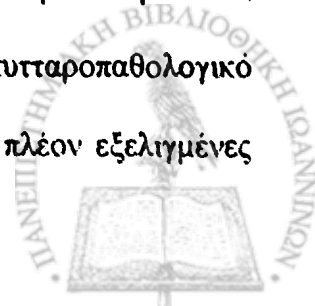
Τα προγράμματα περιβαλλοντικής επιτήρησης χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση και καταγραφή της κυκλοφορίας των ιών του γαστρεντερικού συστήματος και την εκτίμηση της έκτασης και διάρκειας της επιδημικής κυκλοφορίας των πολιοϊών υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Anonymous, 2003; Pallin et al., 1997; Shieh et al., 1997). Η περιβαλλοντική επιτήρηση μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των εμβολιασμών κατά της πολιομυελίτιδας και την ανίχνευση της επανα-εισαγωγής 'αγρίων' στελεχών σε πληθυσμούς και κοινότητες που προηγουμένως είχε



επιβεβαιωθεί η εκρίζωσή τους (Patriarca, 1994; Cochi et al., 1995). Ο έλεγχος των λυμάτων ειδικότερα, έχει αποδειχθεί χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση 'αγρίων' στελεχών πολιοϊών στον γενικό πληθυσμό, περισσότερο από ότι η ίδια η επιδημιολογική καταγραφή της οξείας παράλυσης (acute flaccid paralysis, AFP) (Grabow et al., 1999). Και αυτό διότι τα 'άγρια' στελέχη πολιοϊών έχουν απομονωθεί στα λύματα, ενώ την ίδια στιγμή δεν απομονώνονται από τους ασθενείς με οξεία παράλυση (Bottinger et al., 1992; Tambini et al., 1993; Metcalf et al., 1995; Van der Avoort et al., 1995).

Για τη συγκέντρωση και απομόνωση των εντεροϊών από επεξεργασμένα και μη-επεξεργασμένα λύματα, έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η υπερφυγοκέντρωση και έκλυση ιϊκών σωματιδίων και η PEG (polyethylene glycol) καθίζηση και υπερδιήθηση. Οι μέθοδοι αυτές όπως και άλλες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν, παρουσιάζουν σημαντικούς περιορισμούς, κυρίως λόγω της φύσης του δείγματος που εξετάζεται. Τα λύματα συνήθως περιέχουν οργανικά και άλλα συστατικά σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα οποία μπορεί να εμποδίσουν είτε την συγκέντρωση, είτε τον πολλαπλασιασμό του ιού σε κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, μεγάλο ποσοστό των ιών βρίσκονται στα στερεά σωματίδια των λυμάτων, με αποτέλεσμα την ανεπαρκή έκλουσή τους, οδηγώντας σε σημαντικούς τεχνικούς περιορισμούς.

Έως σήμερα, η ταυτοποίηση των απομονωθέντων εντεροϊών βασίζεται: (i) στον προσδιορισμό του οροτύπου με τη χρήση ειδικών μειγμάτων αντισωμάτων ορού αλόγων (Melnick, 1996), προσέγγιση η οποία είναι χρονοβόρα, παρουσιάζει τεχνικές δυσκολίες και είναι υψηλού κόστους και (ii) στη χρήση μοριακών τεχνικών που βασίζονται στην τεχνική της Αντίστροφης Μεταγραφής -Αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), μετά την απομόνωση RNA, μονόστιβων επιθηλίων κυτταρικών σειρών, οι οποίες έχουν υλοστεί κυτταροπαθολογικό αποτέλεσμα από την επίδραση των ιών. Επιπρόσθετα εφαρμόζονται οι πλέον εξελιγμένες

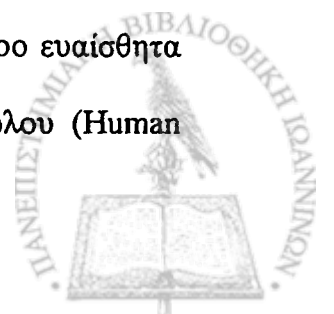


τεχνικές μοριακής βιολογίας, και πιο συγκεκριμένα η ανάλυση με ένζυμα περιορισμού και ο προσδιορισμός των γενετικών αλληλουχιών (Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis-RFLP και τεχνικές Sequencing) (Reynolds et al., 1996; Muir et al., 1998).

Η ύπαρξη αποτελεσματικής μεθόδου για την περιβαλλοντική επιτήρηση θεωρείται ως προαπαιτούμενο για την επιδημιολογική διερεύνηση των επιδημιών από εντεροϊούς, παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τα στελέχη των ιών που κυκλοφορούν στον υπό μελέτη πληθυσμό και συνιστά ένα αξιόπιστο σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης και πρόληψης (Parageorgiou et al., 2000).

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η ανάπτυξη ενός τέτοιου συστήματος επιτήρησης, με το σχεδιασμό και την εφαρμογή μιας απλής και αποτελεσματικής μεθόδου για την ανίχνευση και ταυτοποίηση λομογόνων εντεροϊών, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο VIRADEN (προσρόφηση σε μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης και άμεση καλλιέργεια σε κυτταρικές σειρές) και την τεχνική της RT-PCR. Οι εντεροϊοί, καθώς αναπτύσσονται πάνω στην μεμβράνη, σχηματίζουν πλάκες σε ένα μονόστιβο επιθήλιο. Αυτή είναι η μοναδική μέθοδος, με την οποία οι εντεροϊοί παράγουν πλάκες απευθείας από την μεμβράνη (την περιοχή προσρόφησης του ιού), χωρίς να χρειάζεται έκλουση. Για τη μέθοδο αυτή δεν απαιτείται ειδικός εξοπλισμός ή ειδικές διαδικασίες απολύμανσης, ενώ τα απομονωθέντα στελέχη από τα περιβαλλοντικά δείγματα μπορούν να ταυτοποιηθούν εντός ολίγων ημερών από τη στιγμή της δειγματοληψίας.

Η αξιοπιστία του συστήματος επιτήρησης μπορεί να αυξηθεί σημαντικά εάν χρησιμοποιηθούν και άλλες κυτταρικές σειρές εκτός από αυτή των BGM κυττάρων, για την απομόνωση των εντεροϊών πάνω στις μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης (Sedmak et al., 2003). Φαίνεται μάλιστα ότι κάθε κυτταρική σειρά είναι πιο ευαίσθητη για την απομόνωση συγκεκριμένων οροτύπων εντεροϊών. Έτσι, τα κύτταρα BGM είναι περισσότερο ευαίσθητα από τα κύτταρα που προέρχονται από ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα του κόλου (Human



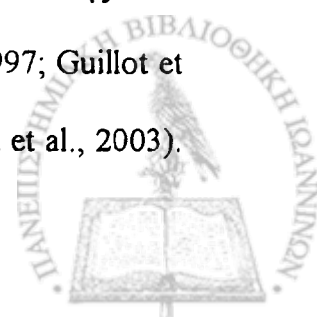
adenocarcinoma of the colon cells, Caco-2) για την ανίχνευση των ιών Coxsackie B (Sedmak et al., 2003), γεγονός το οποίο πιθανότατα εξηγεί και την αυξημένη συχνότητα ανίχνευσης στην παρούσα μελέτη στελεχών της συγκεκριμένης ομάδας. Αντίθετα, τα Caco-2 είναι πιο ευαίσθητα για την απομόνωση των ιών Echo (Sedmak et al., 2003). Κατά συνέπεια, η ταυτόχρονη χρησιμοποίηση δύο ή και περισσότερων κυτταρικών σειρών στην ίδια τεχνική, πιθανότατα θα οδηγήσει σε περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Επιπλέον, είναι δυνατό σε τέτοια φίλτρα να προσροφηθούν και άλλοι ιοί πλην των εντεροϊών. Με αυτόν τον τρόπο, η μέθοδος υπό παρουσίαση πιθανότατα μπορεί να εφαρμοσθεί για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό μεγάλου φάσματος ιών με τη χρήση διαφορετικών κυτταρικών σειρών.

Προγενέστερες μελέτες έχουν αναφέρει την ανίχνευση εντεροϊών με RT-PCR σε περιβαλλοντικά δείγματα με αρνητικές κυτταροκαλλιέργειες, υποδεικνύοντας ότι οι κυτταροπαθογόνοι ιοί αποτελούν ένα μόνο μικρό τμήμα του πληθυσμού των εντεροϊών που υπάρχουν στο υδατικό περιβάλλον (Puig et al., 1994; Shieh et al., 1997; Grabow et al., 1999). Ωστόσο, ο συνδυασμός ενίσχυσης με κυτταροκαλλιέργεια και ταυτοποίησης με RT-PCR παραμένει η πλέον ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση εντερικών ιών σε σχέση με κάθε μέθοδο χωριστά (Puig et al., 1994; Reynolds et al., 1996; Shieh et al., 1997). Οι κυτταροκαλλιέργειες έχουν επιπλέον το πλεονέκτημα της ενίσχυσης του χαμηλού συνήθως ιϊκού φορτίου των περιβαλλοντικών δειγμάτων και του περιορισμού της δράσης των ανασταλτικών για την RT-PCR παραγόντων. Επιπρόσθετα, πιστεύεται ότι παρόλο που ένα θετικό αποτέλεσμα της RT-PCR με αρνητική κυτταροκαλλιέργεια αναφέρεται στην ανίχνευση γενετικού υλικού προερχόμενου από το καψίδιο του ιού, αυτό που έχει πραγματικά σημασία από κλινική / επιδημιολογική άποψη είναι η ανίχνευση κυτταροπαθογόνων και κατ' επέκταση, λοιμογόνων και δυνητικά επικίνδυνων για τη δημόσια υγεία ιών.



Ο προσδιορισμός τμήματος της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την καψιδική πρωτεΐνη VP1, έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα όσον αφορά τον ορότυπο των απομονωθέντων στελεχών, αποδεικνύοντας πρώτα από όλα, την αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου συστήματος προσδιορισμού του οροτύπου. Σε δεύτερο επίπεδο, αποδείχθηκε ότι οι κυτταροκαλλιέργειες ήταν αμιγείς και κάθε μία περιείχε ένα μόνο κλώνο του ιού. Η φαινομενική ασυμφωνία ανάμεσα στο προφίλ περιορισμού με την περιοριστική ενδονουκλεάση HpaII, των απομονωθέντων στελεχών CBV5, και την γενετική υποομάδα στην οποία ο ορότυπος των CBV5 ανήκει (Siafakas et al., 2003), οφείλεται σε μία επιπλέον θέση περιορισμού. Αυτό πιθανότατα υπήρξε αποτέλεσμα σημειακής μετάλλαξης που συνέβη αποκλειστικά στην περιοχή 5'-UTR των στελεχών CBV5. Η γενετική ταξινόμηση σε υποομάδες με βάση το ένζυμο HpaII στην 5'-UTR του γενώματος των εντεροϊών έχει ελεγχθεί σε πολλά κλινικά δείγματα στο παρελθόν (Siafakas et al., 2001b; Siafakas et al., 2003), με αποτελέσματα 100% ακριβή όσον αφορά την ταξινόμηση. Αυτή ήταν η πρώτη φορά που στελέχη εντεροϊών του συγκεκριμένου οροτύπου δεν ακολουθούσαν το συγκεκριμένο σύστημα κατάταξης. Ωστόσο, το επιπλέον σημείο περιορισμού των στελεχών CBV5 που εντοπίστηκε δεν ήταν τυχαίο, με την έννοια ότι είναι χαρακτηριστικό της πρώτης γενετικής υποομάδας, που περιλαμβάνει 38 οροτύπους εντεροϊών (Πίνακας 5). Τόσο οι 38 αυτοί ορότυποι όσο και το “CBV5-ομοιάζον” στέλεχος ανήκουν στην ομάδα Human Enterovirus Species A και B, στην οποία δεν περιλαμβάνεται κανένας πολιοϊός.

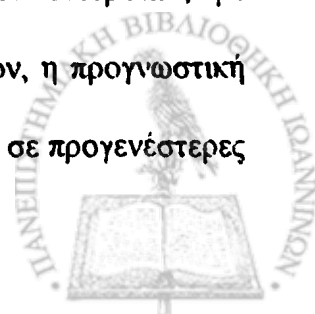
Με την παρουσιαζόμενη μέθοδο η διάκριση μεταξύ μη-πολιοϊών (“non-polio” enteroviruses) και πολιοϊών (“polio-like” enteroviruses) ήταν ακριβής, κάτι το οποίο είναι εξαιρετικά σημαντικό για την εκτίμηση της εκρίζωσης των ‘αγρίων’ στελεχών πολιοϊών από τον πληθυσμό και την επιδημιολογική παρακολούθηση περιπτώσεων παράλυσης που σχετίζονται με στελέχη του εμβολίου (Furione et al., 1993; Georgescu et al., 1997; Guillot et al., 2000b; Cuervo et al., 2001; Georgopoulou & Markoulatos, 2001; Blomqvist et al., 2003).



Οι Thoelen & συν. (Thoelen et al., 2004) έχουν περιγράψει ένα παρόμοιο σύστημα ταξινόμησης με βάση την 5'-UTR γενωμική περιοχή των εντεροϊών, προτείνοντας ότι η αξία της 5'-UTR για τον καθορισμό του οροτύπου και την επιδημιολογική διερεύνησή τους δεν πρέπει να υποτιμάται.

Ενδιαφέρον επίσης εύρημα της παρούσας μελέτης αποτελεί το γεγονός ότι τα στελέχη PV2, CBV5, CBV4 και σε μικρότερο βαθμό τα στελέχη CAV9 επιδεικνύουν υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας στο τμήμα της VP1 γενωμικής περιοχής με στελέχη εντεροϊών που έχουν απομονωθεί σε περιοχές της Ευρώπης, της Βορείου Αμερικής, της Μικράς Ασίας (Mulders et al., 2000; Thoelen et al., 2004), της Βορείου Αφρικής και της Μέσης Ανατολής (Yang et al., 2003) (Εικόνες 14, 15, 18 και 19), υποδεικνύοντας την πιθανή επιδημιολογική συσχέτιση όλων αυτών των στελεχών. Η περιοχή μας βρίσκεται γεωγραφικά στο σταυροδρόμι ανάμεσα στην Ευρώπη, τη Μέση Ανατολή και τη Βόρειο Αφρική και ήταν πράγματι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι η μοριακή ανάλυση των περιβαλλοντικής προέλευσης στελεχών της παρούσας μελέτης, έδωσε στοιχεία σχετικά με την πιθανή εισαγωγή των εντεροϊών αυτών μέσω ατόμων που ταξιδεύουν ανάμεσα σε αυτές τις περιοχές. Αυτή η πιθανή επιδημιολογική συσχέτιση επιβεβαιώνει την αξία της περιβαλλοντικής επιδημιολογικής επιτήρησης των εντεροϊών, κάτι στο οποίο συμβάλλει και η παρούσα μελέτη.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός των τεχνικών συγκέντρωσης εντεροϊών με προσρόφηση σε μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης και κυτταροκαλλιέργεια (VIRADEN), και της επακόλουθης ανίχνευσης με RT-PCR και προσδιορισμό του οροτύπου με εύρεση τμήματος της αλληλουχίας της VP1 γενωμικής περιοχής, αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την περιβαλλοντική επιτήρηση της κυκλοφορίας των εντεροϊών, με σημαντικές επιπτώσεις για την προστασία της Δημόσιας Υγείας. Επιπλέον, η προγνωστική αξία της απλής ανάλυσης με RFLP ανάλυση της 5'-UTR, σε αυτή όσο και σε προγενέστερες



μελέτες μπορεί να θεωρηθεί εξίσου σημαντική για την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών που απομονώνονται σε γενετικές υποομάδες.

Η εφαρμογή αποτελεσματικής περιβαλλοντικής επιτήρησης συμβάλλει στον εντοπισμό εν δυνάμει 'θυλάκων' εντός του πληθυσμού νέων ανασυνδυασμένων στελεχών εντεροϊών και στην ανίχνευση αναδυόμενων ή προηγουμένως αταυτοποίητων στελεχών.

Βέβαια, η ανίχνευση και ταυτοποίηση των κυκλοφορούντων στο περιβάλλον εντεροϊών δεν επιδρά σημαντικά στην κλινική πορεία των ασθενών. Όμως, μπορεί να συμβάλλει στην παρακολούθηση πιθανών επιδημιών και κατ' επέκταση, στην αποτελεσματική επιδημιολογική επιτήρηση του πληθυσμού με τον καθορισμό της πηγής της λοίμωξης, την συσχέτιση μεταξύ οροτύπων ή στελεχών και κλινικής εικόνας, τον χαρακτηρισμό ιδιαίτερα μολυσματικών στελεχών, τους πιθανούς τρόπους μετάδοσης και την εμφάνιση νέων στελεχών, ή την επανεμφάνιση παλαιότερων.

Ο ακριβής διαχωρισμός των εντεροϊών σε στελέχη πολιοϊών και μη-πολιοϊών είναι θεμελιώδης για τα προγράμματα Δημόσιας Υγείας για την επιτήρηση των πολιοϊών, τα οποία έχουν σαν στόχο την επιβεβαίωση της εκρίζωσης των 'αγρίων' στελεχών και την παρακολούθηση της κυκλοφορίας των στελεχών του εμβολίου.



Πίνακας 6. Αποτελέσματα εξετασθέντων δειγμάτων με την τεχνική VIRADEN για την συγκέντρωση και απομόνωση εντεροϊών στο περιβάλλον

ΜΗΝΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΛΕΜΕΣΟΣ	ΙΩΑΝΝΙΝΑ
Απρίλιος 2003	+	-	*
Μάιος 2003	+	+(2 ^α)	-
Ιούλιος 2003	-	-	-
Αύγουστος 2003	-	-	-
Σεπτέμβριος 2003	+	+	*
Οκτώβριος 2003	-	-	-
Δεκέμβριος 2003	+	+	*
Ιανουάριος 2004	+	+	+
Φεβρουάριος 2004	+	+	+
Μάρτιος 2004	-	-	-

+: δείγμα θετικό για εντεροϊούς

-: δείγμα αρνητικό για εντεροϊούς

***: δεν πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία**

#: λήψη δύο δειγμάτων



Πίνακας 7. Ταυτοποίηση απομονωθέντων εντεροϊών (Απρ.2003 – Μάρτ.2004)

(Παρουσιάζονται τα απομονωθέντα στελέχη, η HpaII γενετική υποομάδα, ο ορότυπος, η φυλογενετική σύγκριση σε επίπεδο ομοιότητας βάσεων και οι αριθμοί πρόσβασης στη διεθνή βάση δεδομένων GenBank)

Α/α.	Απομονωθέν στελέχος εντεροϊών	HpaII γενετική υποομάδα (Πίνακας 5)	Ταυτοποίηση ορότυπου με sequencing	% ποσοστό ομοιότητας βάσεων RNA	Αριθμοί πρόσβασης GenBank
1	A1	I	CAV9	90%	AY563382
2	A2	I	CAV9	91%	AY563351
3	A3	I	CAV9	90%	AY563352
4	A4	I	CAV9	91%	AY563353
5	A5	IV	SABIN 2	98%	AY563379
6	A6	I	CAV9	92%	AY563354
7	A7	I	CBV5	97%	AY563334
8	B1	I	CAV9	92%	AY563355
9	B2	I	CBV5	97%	AY563335
10	B3	I	CBV5	97%	AY563336
11	B4	I	CAV9	91%	AY563356
12	B5	I	CAV9	90%	AY563357
13	B6	I	CAV9	91%	AY563358
14	B7	I	CBV5	96%	AY563337
15	B8	I	CAV9	92%	AY563359
16	B9	I	CAV9	90%	AY563360
17	B10	I	CAV9	91%	AY563361
18	LR1	I	CBV5	96%	AY563338
19	LR2	I	CBV5	97%	AY563339
20	LR3	I	CBV5	96%	AY563340
21	LR4	I	CBV5	96%	AY563341
22	LR5	I	CBV5	96%	AY563342
23	LR6	I	CBV5	95%	AY563343
24	LR7	I	CBV5	96%	AY563344
25	LR8	I	CBV5	95%	AY563345
26	LR9	I	CBV5	95%	AY563346
27	LR10	I	CBV5	96%	AY563347
28	LR11	I	CBV5	96%	AY563348
29	LR12	I	CBV5	95%	AY563349
30	LR13	I	CBV5	96%	AY563350
31	LK1	I	CBV4	95%	AY563362
32	LK2	I	CBV4	94%	AY563363
33	LK5	I	CBV4	93%	AY563364
34	LK8	I	CBV4	93%	AY563365
35	LK11	I	CBV4	93%	AY563366
36	LK14	I	CBV4	93%	AY563367
37	L1	I	CBV2	87%	AY563380
38	L2	I	CBV2	87%	AY563381
39	L3	I	CBV1	83%	AY563326
40	L4	I	CBV2	87%	AY563329
41	L5	I	CBV2	87%	AY563330
42	L6	I	CBV2	86%	AY563331
43	L7	I	CBV4	93%	AY563368
44	L8	I	CBV4	94%	AY563369
45	L9	I	CBV2	87%	AY563332
46	L10	I	CBV2	87%	AY563333
47	LE1	I	CBV4	93%	AY563370
48	LE2	I	CBV4	95%	AY563371
49	LE3	I	CBV4	93%	AY563372
50	LE4	I	CBV4	93%	AY563373
51	LM1	I	CBV4	95%	AY563374
52	LM2	I	CBV4	94%	AY563375
53	LM3	I	CBV4	95%	AY563376
54	LM4	I	CBV4	96%	AY563377
55	LM5	I	CBV4	96%	AY563378
56	LM6	I	CBV1	82%	AY563328
57	LM7	I	CBV1	83%	AY563327



Πίνακας 7 (συνέχεια). Ταυτοποίηση απομονωθέντων εντεροϊών (Απρ.2003 – Μάρτ.2004)

(Παρουσιάζονται τα απομονωθέντα στελέχη, η HpaII γενετική υποομάδα, ο ορότυπος, η φυλογενετική σύγκριση σε επίπεδο ομοιότητας βάσεων και οι αριθμοί πρόσβασης στη διεθνή βάση δεδομένων GenBank)

Α/α (συν.)	Απομονωθέν στέλεχος εντεροϊών	HpaII γενετική υποομάδα (Πίνακας 5)	Ταυτοποίηση ορότυπου με sequencing	% ποσοστό ομοιότητας βάσεων RNA	Αριθμοί πρόσβασης GenBank
58	J1 ^{***}	I	CBV1	82%	AY634232
59	J2 ^{***}	I	CBV1	83%	AY634233
60	J3 ^{**}	I	CBV4	95%	AY634234
61	J4 ^{**}	I	CBV4	94%	AY634235
62	J5 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634236
63	J6 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634237
64	J7 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634238
65	J8 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634239
66	J9 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634240
67	J10 ^{**}	I	CBV4	95%	AY634241
68	J11 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634242
69	J12 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634243
70	J13 ^{***}	I	CBV4	95%	AY634244
71	J14 ^{**}	I	CBV4	94%	AY634245
72	J15 ^{**}	I	Echo7	82%	AY634246
73	J16 ^{**}	I	CBV4	96%	AY634247
74	J17 ^{***}	I	CBV4	96%	AY634248
75	J18 ^{***}	I	CBV4	93%	AY634249
76	J19 ^{**}	I	CBV4	95%	AY634250
77	J20 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634251
78	J21 ^{***}	I	CBV4	93%	AY634252
79	J22 ^{**}	I	CBV4	95%	AY634253
80	F1 ^{**}	I	CBV1	94%	AY634254
81	F2 ^{***}	I	CBV4	95%	AY634255
82	F3 ^{**}	I	CBV4	96%	AY634256
83	F5 ^{**}	I	CBV4	96%	AY634257
84	F6 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634258
85	F7 ^{**}	I	CBV1	95%	AY634259
86	F8 ^{***}	I	CBV4	93%	AY634260
87	F9 ^{**}	I	CBV1	83%	AY634261
88	F10 ^{**}	I	CBV4	95%	AY634262
89	F12 ^{***}	I	CBV4	94%	AY634263
90	F13 ^{**}	I	CBV4	95%	AY634264
91	F14 ^{**}	I	CBV4	96%	AY634265
92	F15 ^{**}	I	CBV4	96%	AY634266
93	F16 ^{***}	I	CBV1	84%	AY634267
94	F17 ^{**}	I	CBV1	83%	AY634268
95	F18 ^{**}	I	CBV4	94%	AY634269
96	F19 ^{**}	I	CBV1	82%	AY634270
97	F21 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634271
98	F22 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634272
99	F23 ^{**}	I	CBV4	93%	AY634273
100	LS1 ^{**}	I	CBV2	87%	AY566223
101	LS3 ^{**}	I	CBV2	86%	AY566224
102	LS4 ^{**}	I	CBV2	87%	AY566225
103	LS5 ^{**}	I	CBV2	87%	AY566226
104	LS6 ^{**}	I	CBV2	86%	AY566227

Επεξήγηση συμβόλων:

°: Λευκωσία, **: Λεμεσός, ***: Ιωάννινα

A1-7: Απρίλιος 2003, B1- B10, LR1-13 & LS: Μάιος 2003, LK & L: Σεπτέμβριος 2003

LE & LM: Δεκέμβριος 2003, J: Ιανουάριος 2004, F: Φεβρουάριος 2004

CAV: ιός Coxsackie A, CBV: ιός Coxsackie B, Echo: ιός Echovirus



SABIN: ιός πολιομυελίτιδας, στέλεχος εμβολίου

Πίνακας 8. Κωδικοί πρόσβασης (accession numbers) στη Γονιδιακή Τράπεζα GenBank γενετικών αλληλουχιών προτύπων και κλινικών στελεχών εντεροϊών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την φυλογενετική σύγκριση με τα στελέχη που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 7)

ΟΡΟΤΥΠΟΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΡΟΣΒΑΣΗΣ
PV2	LANSING	M12197
	SABIN	X00595
	W-2	D00625
	MEF-1	AY238473
	EGY88-074	AF448782
	EGY93-034	AF448783
	P2S/Mog65-3	AY278549
	P2S/Mog65-1	AY278550
	P2S/Mog66-4	AY278551
	P2S/Mog65-2	AY278552
	102050	AJ544513
	BeniSuef/98	AF551838
	Beheira/97	AF551837
	4623 1/ISR98	AJ288066
	Sahag/00	AF551841
	Alexandria/98	AF551840
	Giza/98	AF551839
	Aswan/95	AF551836
	4808 1/ISR98	AJ288075
	4774 1/ISR98	AJ288074
4625 1/ISR98	AJ288067	
4588 1/ISR98	AJ288064	
CAV9	GRIGGS	D00627
	03-171FCR2	AB167980
	03-144NPC3	AB167979
	03-132NPR2	AB167978
	BE01-2839	AY342746
	BE99-1823	AY342619
	BE01-5294	AY342745
	BE01-4075	AY342744
	BE99-5750	AY342623
	BE99-8726	AY342628
CBV1	JAPAN	M16560
	P-2264/CB1/Kanagawa/2003	AB162736
	P-2199/CB1/Kanagawa/2003	AB162733
	P-2240/CB1/Kanagawa/2003	AB162735
	04-29NGC1	AB167989
	P-2200/CB1/Kanagawa/2003	AB162734
	P-2346/CB1/Kanagawa/2003	AB162737
	10159	AY373092
10165	AY373098	



Πίνακας 8 (συνέχεια). Κωδικοί πρόσβασης (accession numbers) στη Γονιδιακή Τράπεζα GenBank γενετικών αλληλουχιών προτύπων και κλινικών στελεχών εντεροϊών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την φυλογενετική σύγκριση με τα στελέχη που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 7)

ΟΡΟΤΥΠΟΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΡΟΣΒΑΣΗΣ
CBV2	NANCY	AF081485
	10180	AY373113
	10179	AY373112
	10178	AY373111
	10177	AY373110
	10176	AY373109
	10175	AY373108
	10174	AY373107
	10173	AY373106
	10172	AY373105
	10171	AY373104
	10170	AY373103
	10169	AY373102
	10168	AY373101
CBV4	JVB	X05690
	P234pak92	AF160018
	Pk1pak92	AF160019
	BE00-117	AF521311
	48112fin98	AF160025
	9128net93	AF160021
	10199	AY373132
	10198	AY373131
	10197	AY373130
	10196	AY373129
	10195	AY373128
	10194	AY373127
	10193	AY373126
	10192	AY373125
	10191	AY373124
10190	AY373123	
ECV7	e7no	AF295462
	e7th	AY342733
	e7ho7	AY036578
	e7Bai	E7241447
	e7ob	AF081324
	E7Lin	AF465516



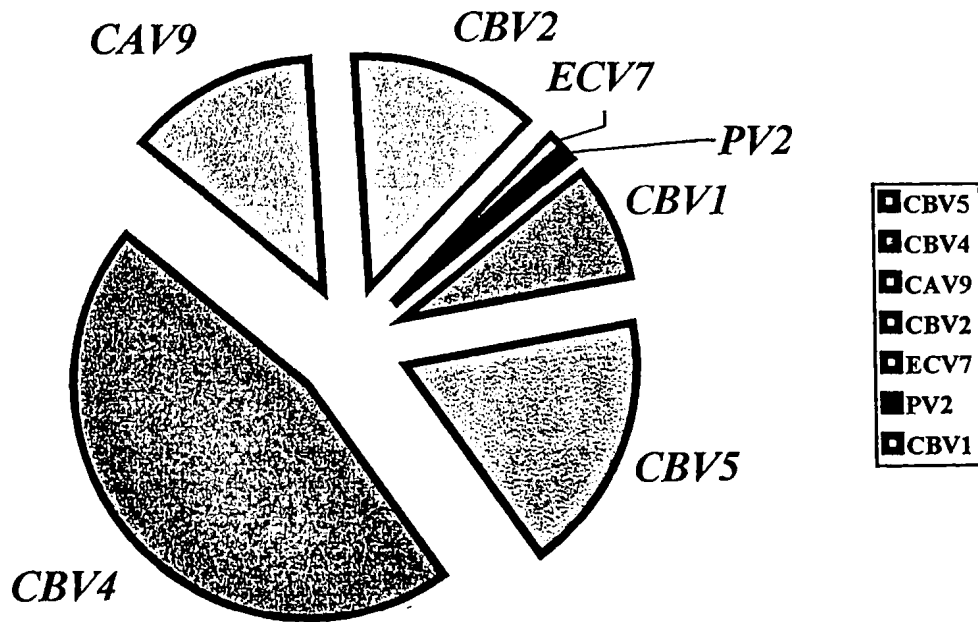
Πίνακας 8 (συνέχεια). Κωδικοί πρόσβασης (accession numbers) στη Γονιδιακή Τράπεζα GenBank γενετικών αλληλουχιών προτύπων και κλινικών στελεχών εντεροϊών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την φυλογενετική σύγκριση με τα στελέχη που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 7)

ΟΡΟΤΥΠΟΣ	ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΡΟΣΒΑΣΗΣ
CBV5	FAULKNER	AF114383
	1954/UK/85	X67706
	1603/Finland/82	AJ004643
	C15263-118/99	AY208112
	10211	AY373144
	10210	AY373143
	10209	AY373142
	10208	AY373141
	10207	AY373140
	10206	AY373139
	10205	AY373138
	10204	AY373137
	10203	AY373136
	10202	AY373135
	10201	AY373134
	10200	AY373133
	BE00-57	AF521323
	BE00-56	AF521322
	BE00-38	AF521320
	BE00-27	AF521316
	BE00-15	AF521313
	BE00-1	AF521312
	BE00-28	AF521317
	BE00-22	AF521314
	BE00-31	AF521319

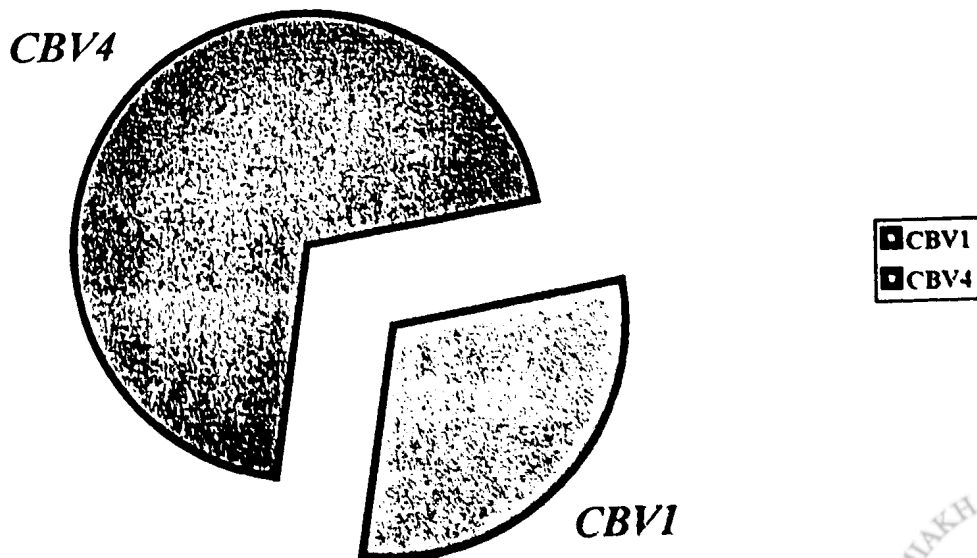


Εικόνα 12α. Συχνότητα των προσδιορισθέντων με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία οροτύπων εντεροϊών σε Λευκωσία-Λεμεσό (Α) και Ιωάννινα (Β).

A.

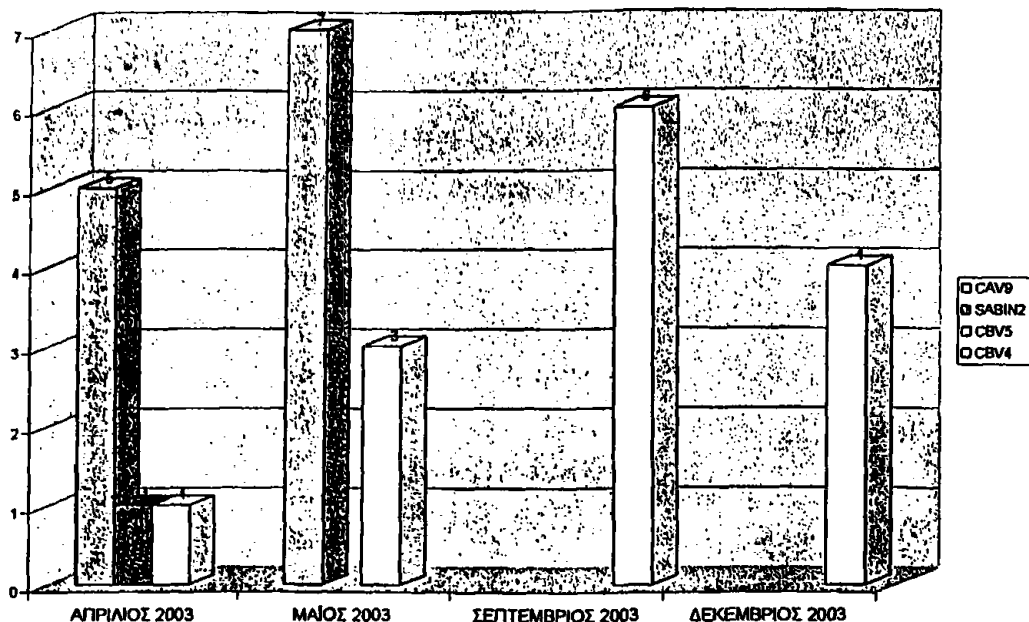


B.

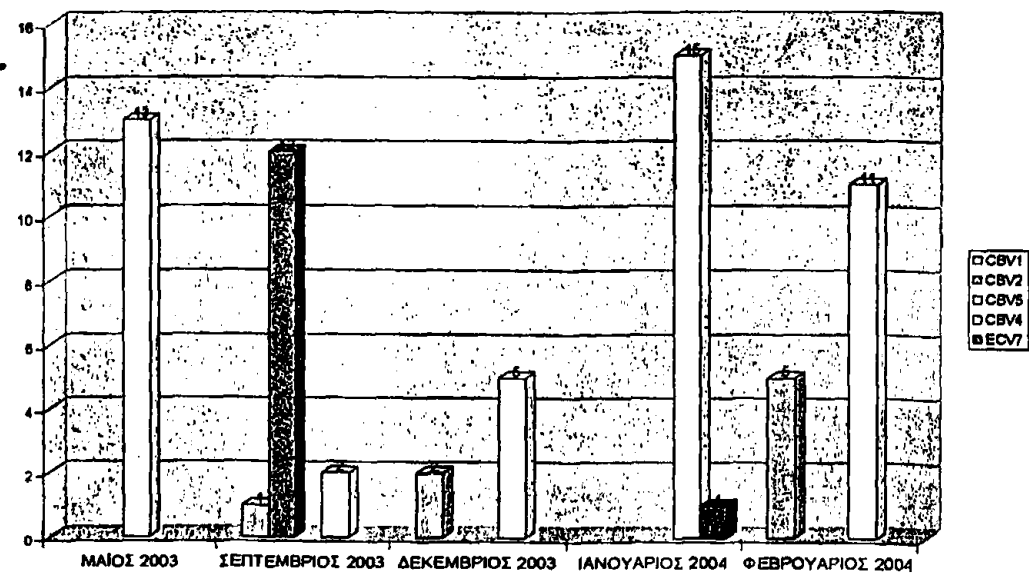


Εικόνα 12β. Χρονική κατανομή οροτύπων απομονωθέντων στελεχών ανά πόλη

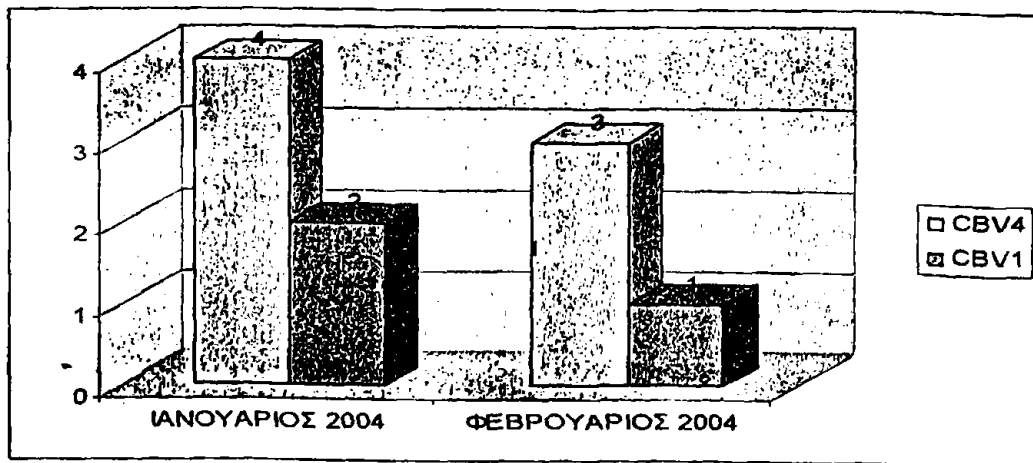
ΛΕΥΚΩΣΙΑ



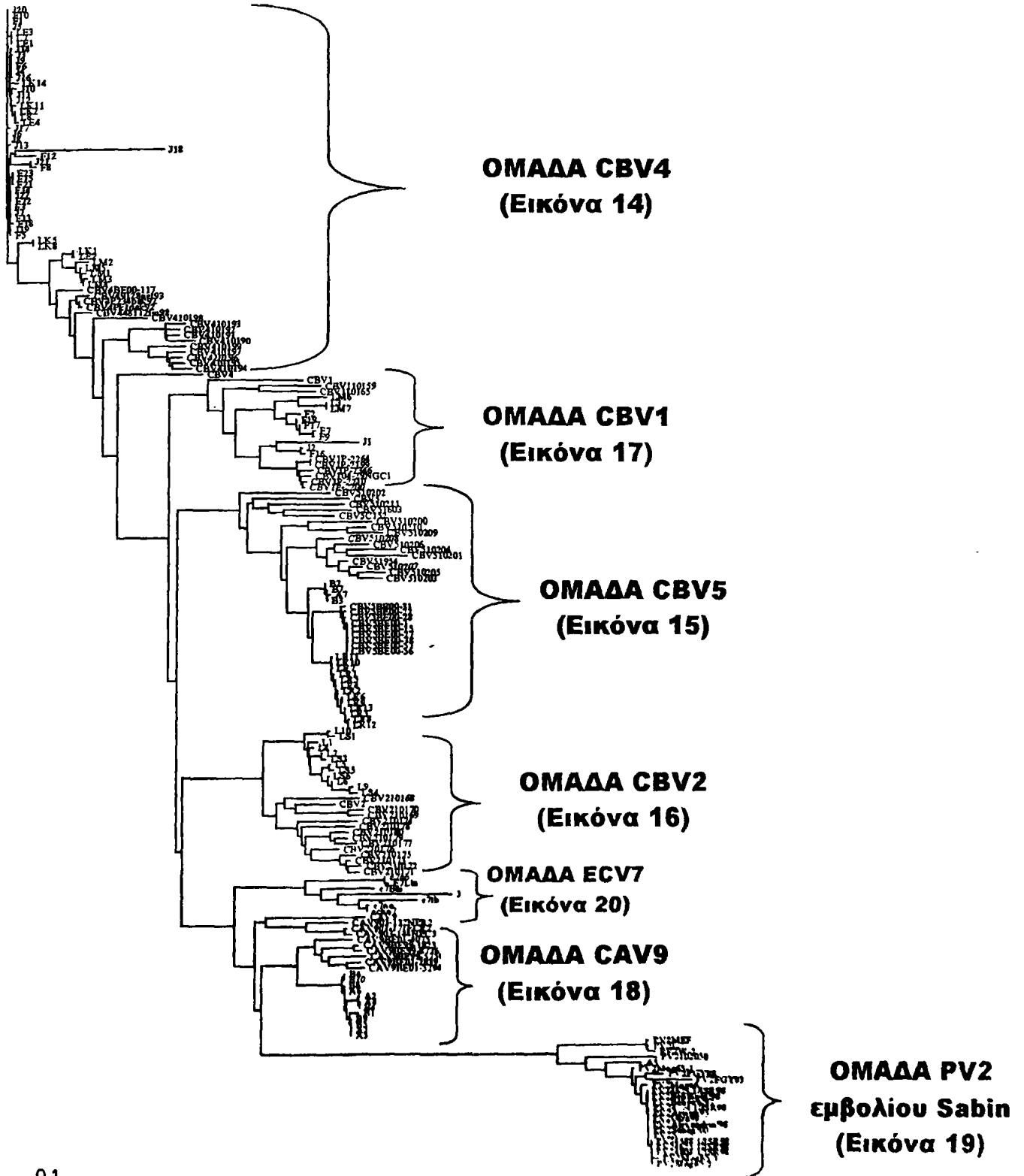
ΛΕΜΕΣΟΣ



ΙΩΑΝΝΙΝΑ



Εικόνα 13. Φυλογενετική ανάλυση συνόλου (104) απομονωθέντων στελεχών.

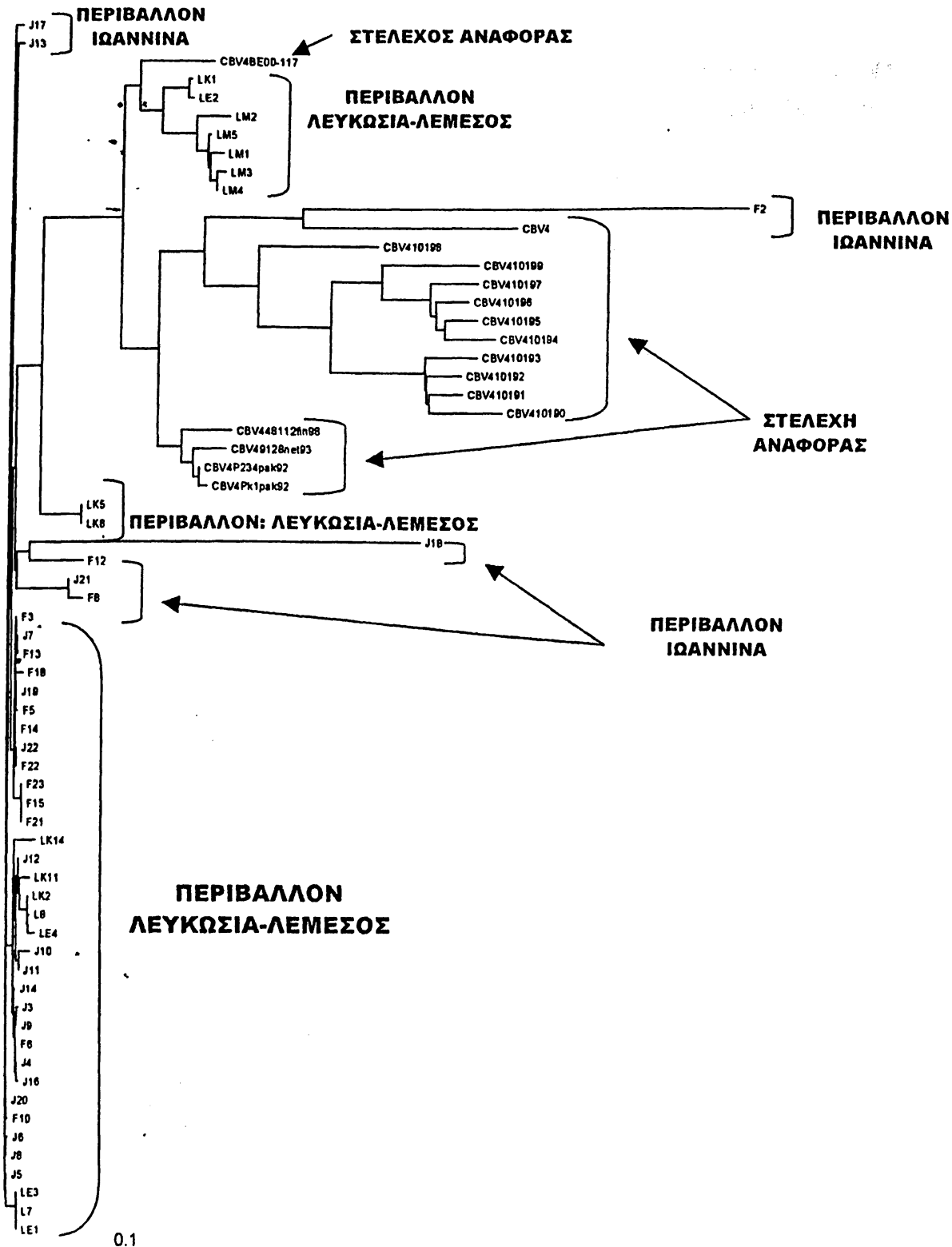


0.1
 Κλίμακα γενετικής συγγένειας (0.1=10R)
 (fractional genetic distance)

Επεξήγηση κωδικοποιημένων στελεχών στους Πίνακες 7 & 8



Εικόνα 14. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: CBV4

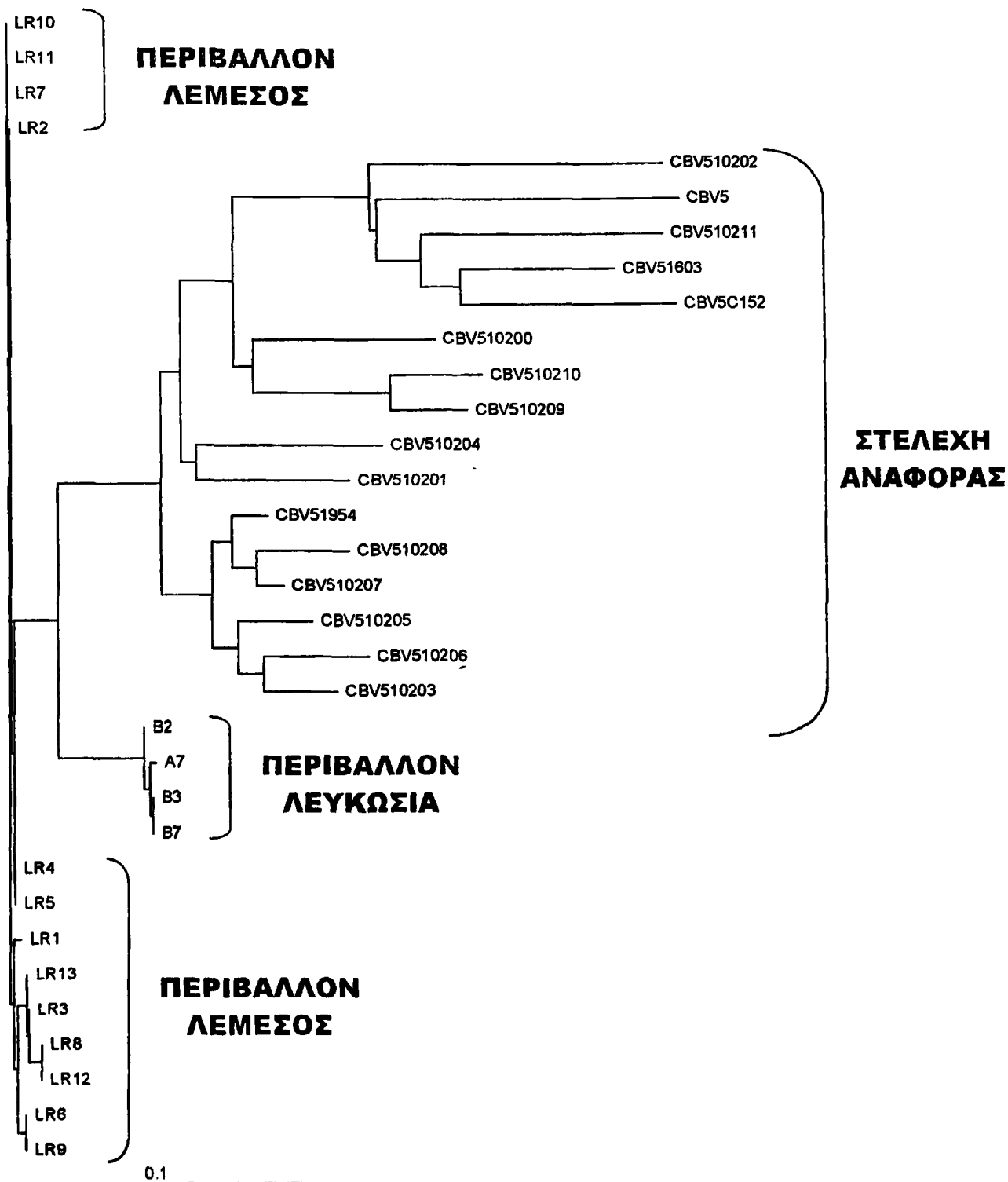


Κλίμακα γενετικής συγγένειας (0.1=10%)
{fractional genetic distance}

Επεξήγηση κωδικοποιημένων στελεχών στους Πίνακες 7 & 8



Εικόνα 15. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: CBV5

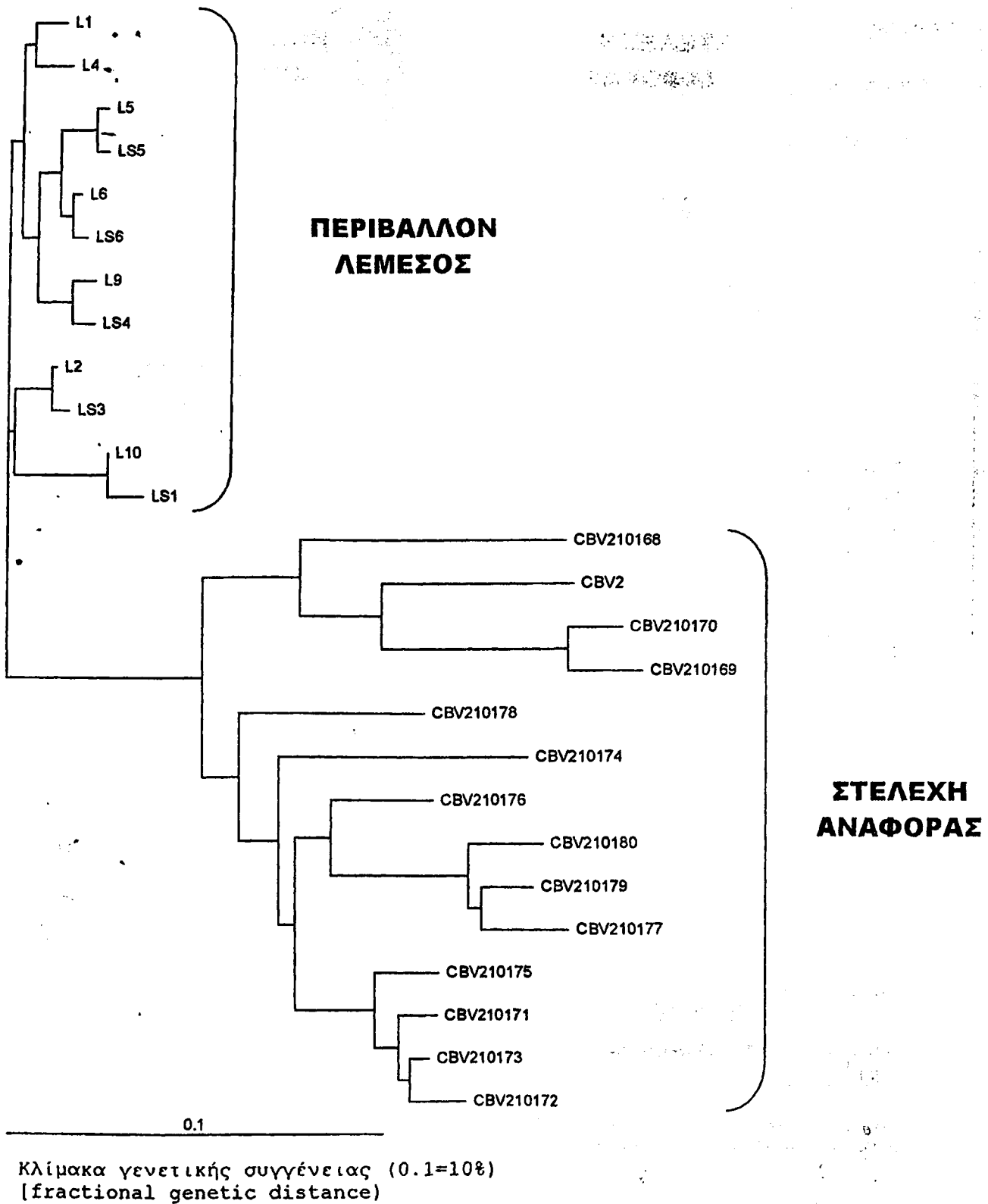


Κλίμακα γενετικής συγγένειας (0.1=10%)
[fractional genetic distance]

Επεξήγηση κωδικοποιημένων στελεχών στους Πίνακες 7 & 8



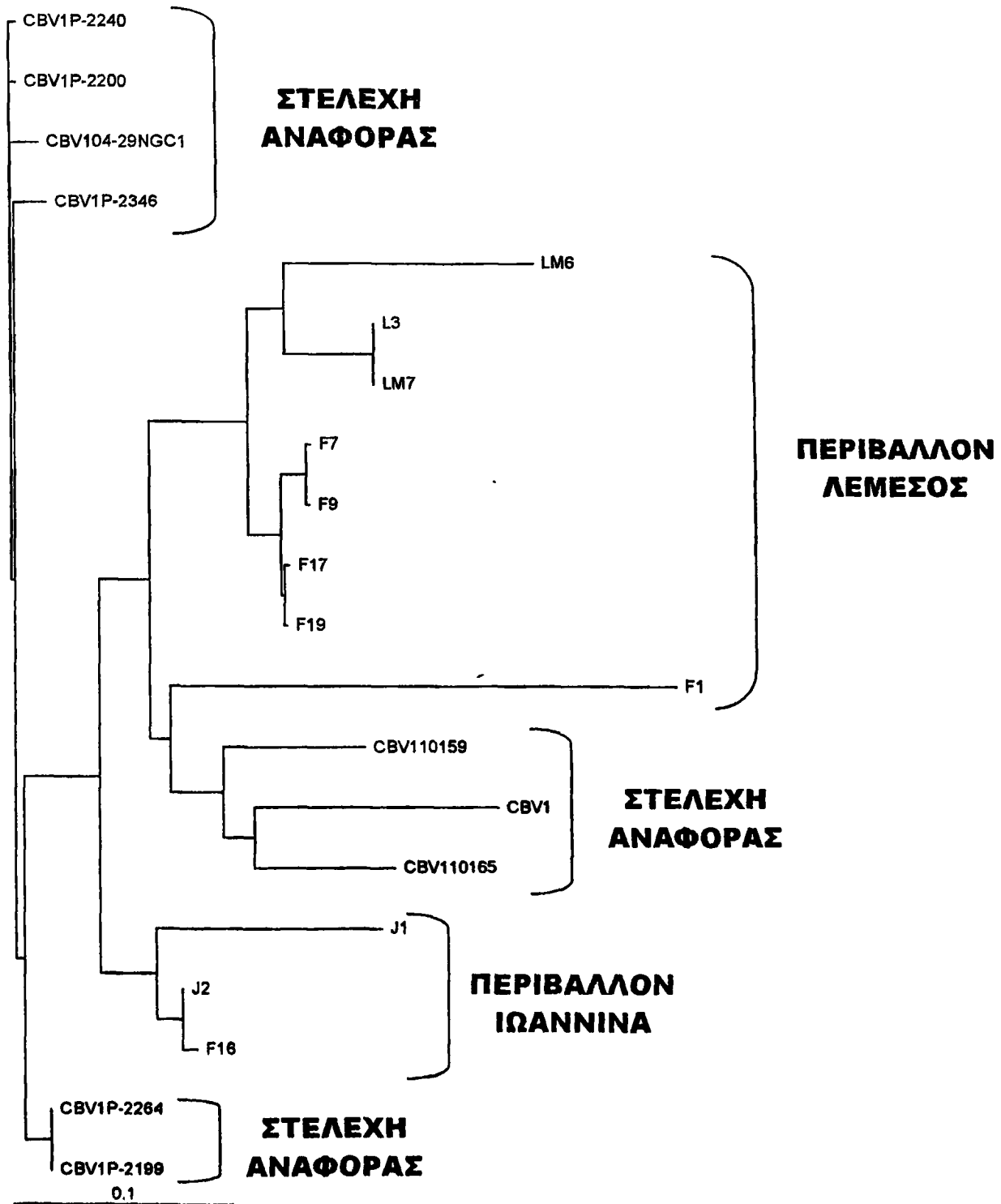
Εικόνα 16. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: CBV2



Επεξήγηση κωδικοποιημένων στελεχών στους Πίνακες 7 & 8



Εικόνα 17. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: CBV1

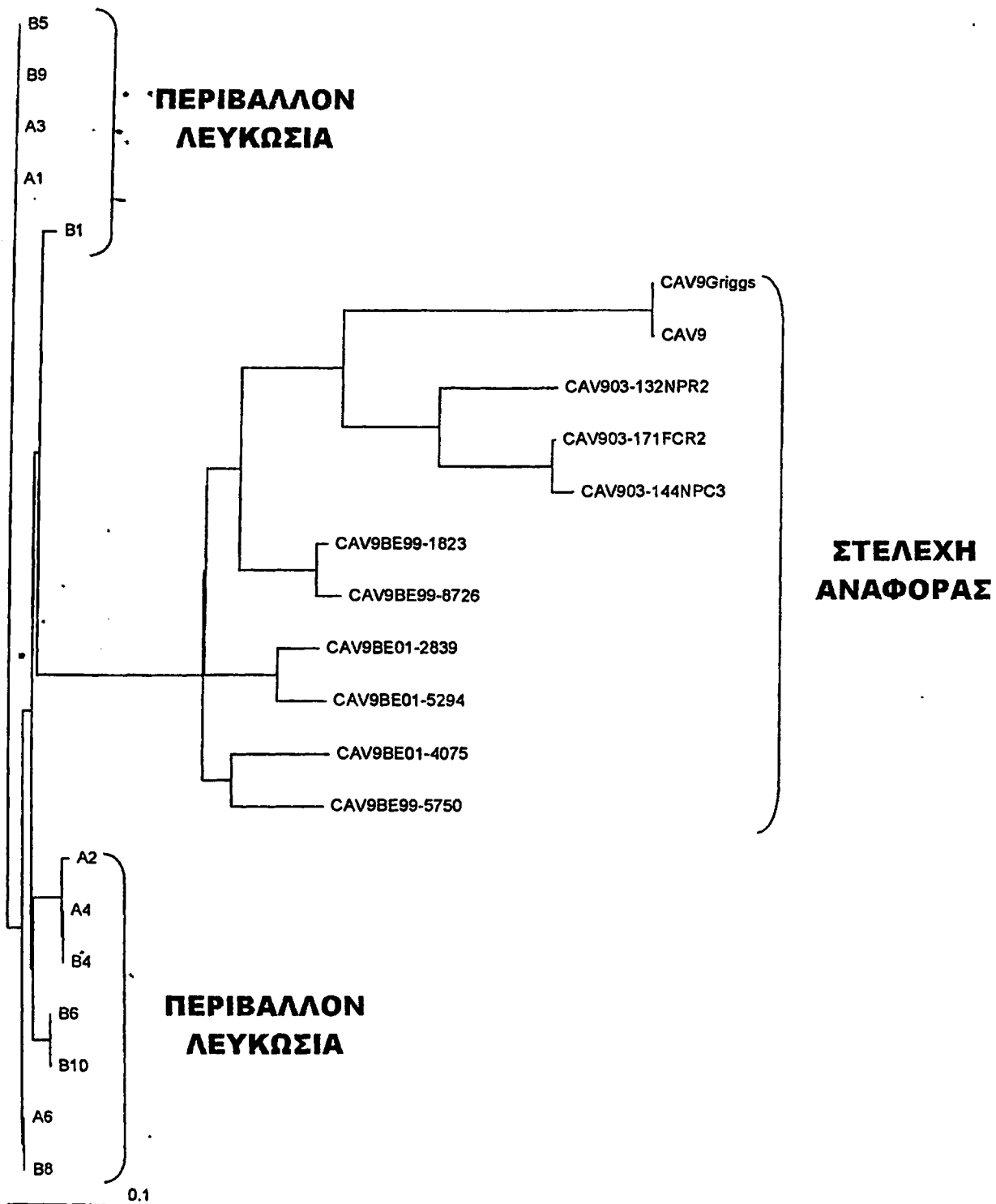


Κλίμακα γενετικής συγγένειας (0.1=10%)
[fractional genetic distance]

Επεξήγηση κωδικοποιημένων στελεχών στους Πίνακες 7 & 8



Εικόνα 18. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: CAV9

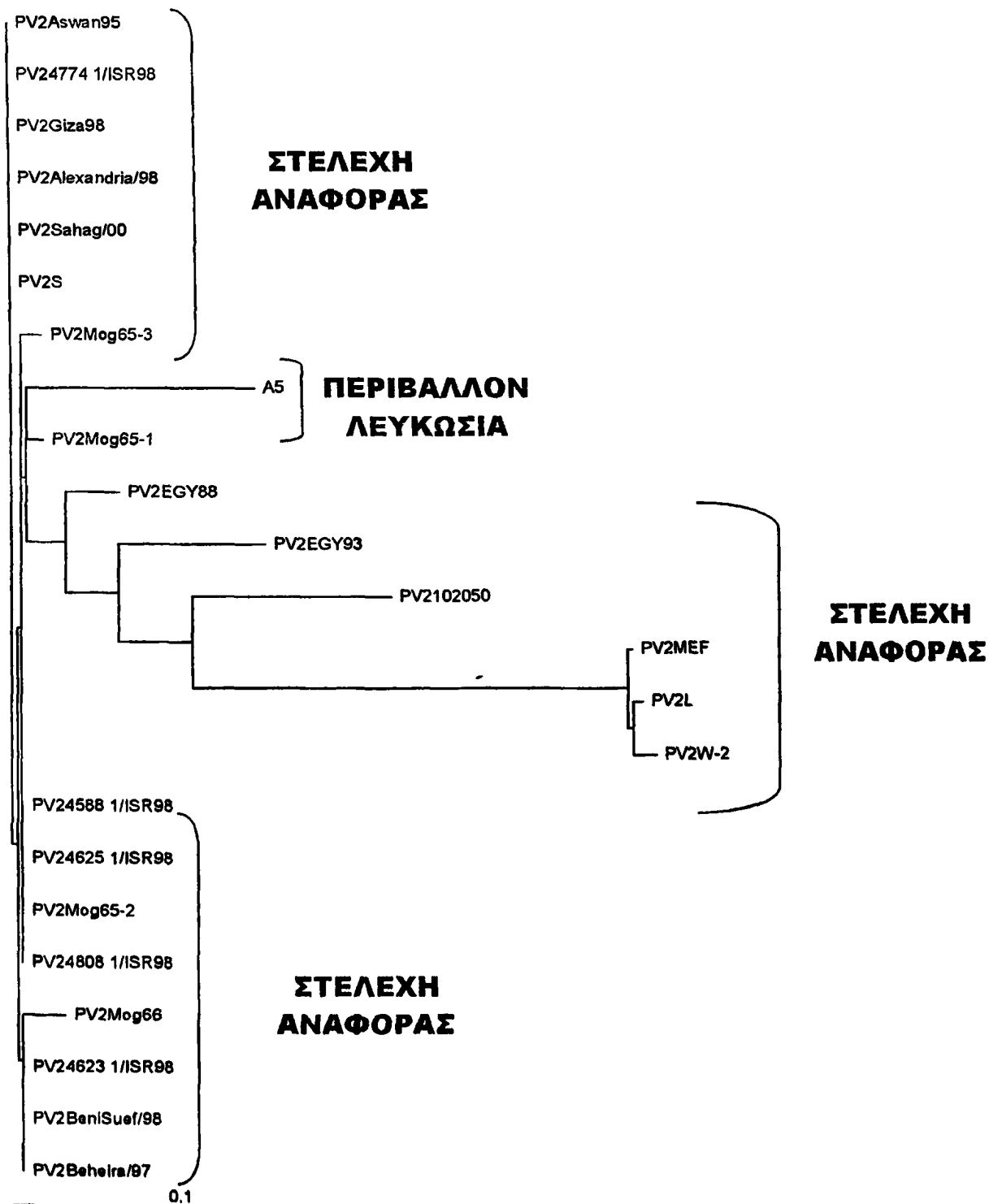


Κλίμακα γενετικής συγγένειας (0.1=10%)
[fractional genetic distance)

Επεξήγηση κωδικοποιημένων στελεχών στους Πίνακες 7 & 8



Εικόνα 19. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντων: PV2

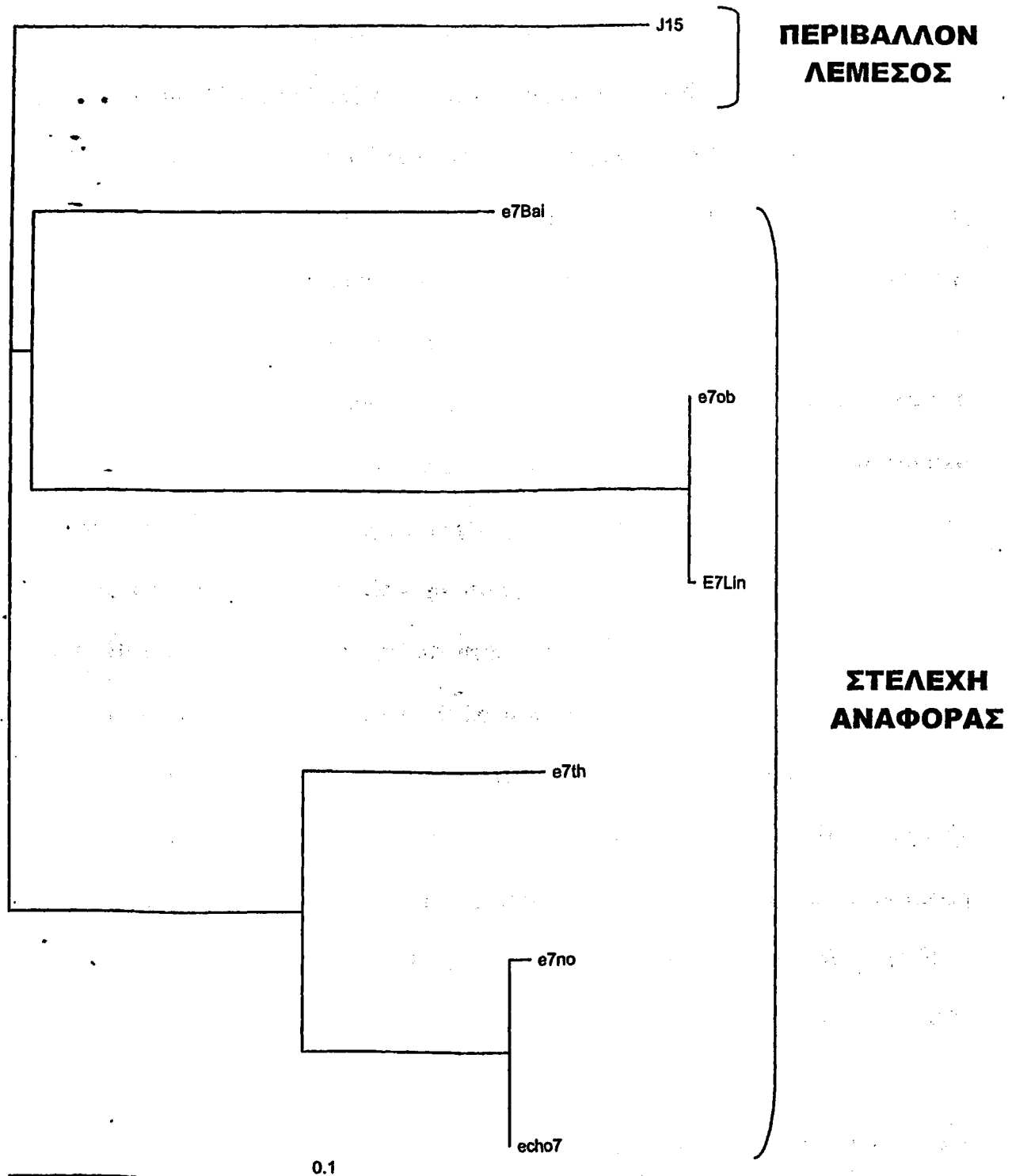


Κλίμακα γενετικής συγγένειας (0.1=10%)
(fractional genetic distance)

Επεξήγηση κωδικοποιημένων στελεχών στους Πίνακες 7 & 8



Εικόνα 20. Φυλογενετική ανάλυση στελεχών αναφοράς και απομονωθέντος: ECV7



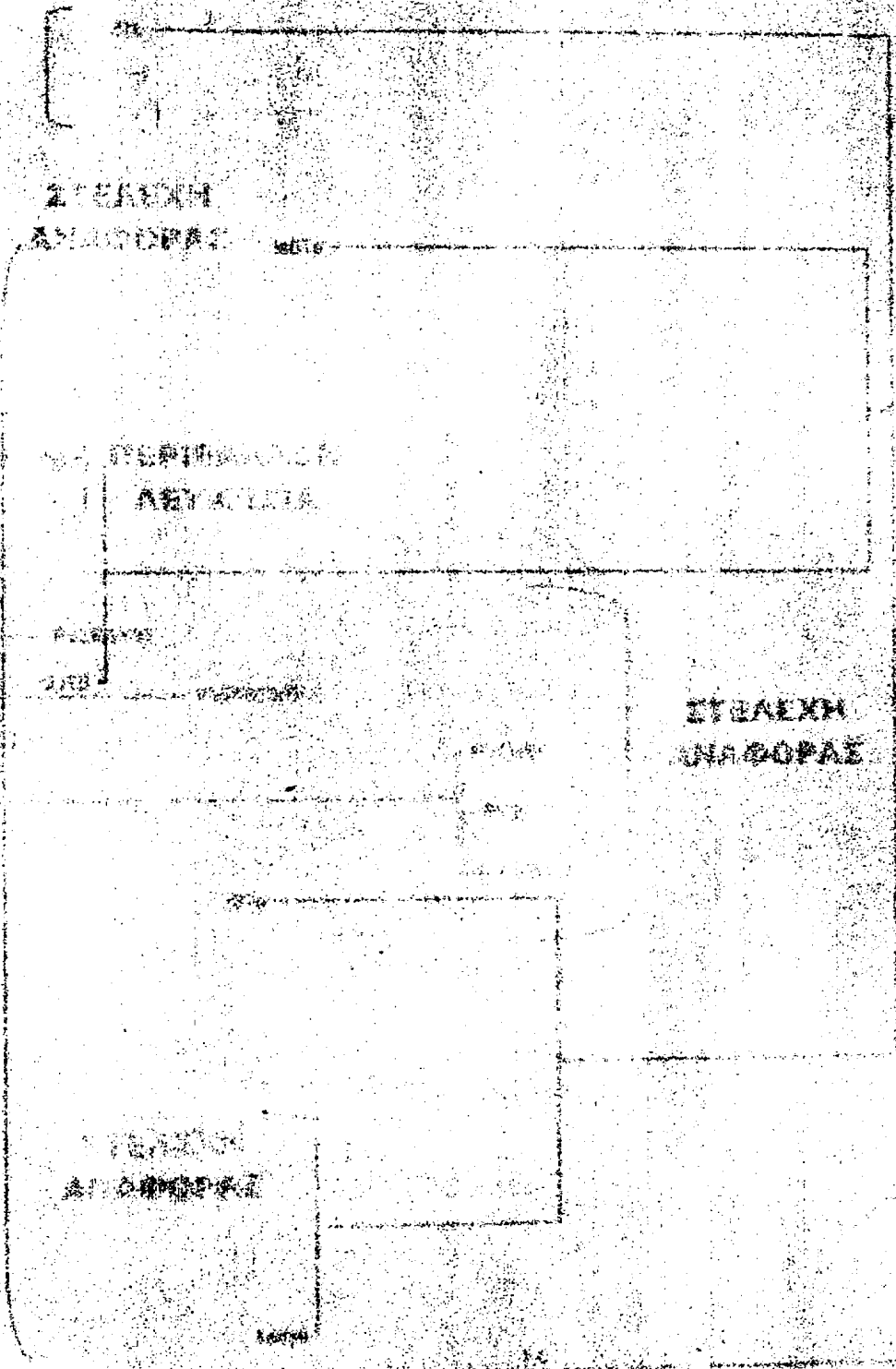
Κλίμακα γενετικής συγγένειας (0.1=10%)
[fractional genetic distance)

Επεξήγηση κωδικοποιημένων στελεχών στους Πίνακες 7 & 8



Судебный протокол осмотра места происшествия

Исследование
по делу



ИЗЪЕМ
ОБЪЕКТ

ИЗЪЕМ
ОБЪЕКТ

ОБЪЕКТ

Судебный протокол осмотра места происшествия

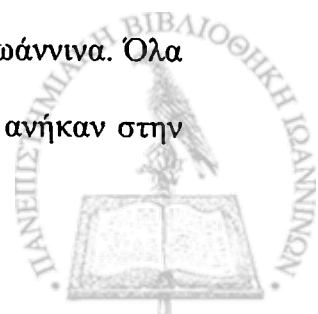


ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση και ταυτοποίηση εντεροϊών αφ' ενός μεν σε ασθενείς με AIDS, αφ' ετέρου δε στο περιβάλλον, καθώς και η αναζήτηση των πιθανών επιπτώσεων στη Δημόσια Υγεία από την εφαρμογή ενός τέτοιου συστήματος περιβαλλοντικής επιτήρησης. Η διερεύνηση αυτή βρισκόταν μέσα στα πλαίσια και τις κατευθυντήριες οδηγίες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ) για την εκρίζωση της πολιομυελίτιδας παγκοσμίως κατά το χρονικό διάστημα 2001 – 2005.

Συνολικά εξετάσθηκαν δείγματα κοπράνων 19 ασθενών με HIV λοίμωξη σε στάδιο νόσου και 12 θετικά για εντεροϊούς μη-επεξεργασμένα αστικά λύματα. Τα περιβαλλοντικά δείγματα συλλέχθηκαν από τους σταθμούς επεξεργασίας των πόλεων της Λευκωσίας και της Λεμεσού της Κύπρου και τον αντίστοιχο σταθμό του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η ανίχνευση των εντεροϊών στους ασθενείς με AIDS έγινε αρχικά με ενοφθαλμισμό σε κυτταρικές σειρές και ακολούθως με μοριακές τεχνικές (RNA εκχύλιση και Αντίστροφη Μεταγραφή / Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης, RT-PCR). Οι προερχόμενοι από το περιβάλλον εντεροϊοί, προσροφήθηκαν σε μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης, απομονώθηκαν με την τεχνική VIRADEN και ταυτοποιήθηκαν με Αντίστροφη Μεταγραφή- Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης, με ανάλυση πολυμορφισμού (RFLP) και προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Sequencing) τμήματος της VP1 γενωμικής περιοχής.

Όλα τα δείγματα που ελήφθησαν από τους ασθενείς με AIDS βρέθηκαν αρνητικά για εντεροϊούς. Δεν παρατηρήθηκε κυτταροπαθογόνος δράση σε καμία από τις ενοφθαλμισμένες κυτταρικές σειρές, γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε επίσης με RT-PCR. Αντίθετα, στα λύματα συγκεντρώθηκαν και απομονώθηκαν συνολικά 104 στελέχη εντεροϊών. Το 26% απομονώθηκαν από τη Λευκωσία, το 64% από τη Λεμεσό και το 10% από τα Ιωάννινα. Όλα τα απομονωθέντα στελέχη πλην ενός, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως PV2 Sabin, ανήκαν στην



ίδια γενετική υποομάδα των Human Enterovirus Species B. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, επικρατέστερος ορότυπος στην Κύπρο και στα Ιωάννινα βρέθηκε ο ιός CBV4. Παρατηρήθηκε ότι στελέχη του ίδιου οροτύπου παρουσίαζαν μεγάλη ομοιότητα βάσεων στην VP1 περιοχή. Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίαζαν εξελικτική συγγένεια με στελέχη που έχουν απομονωθεί στην Ευρώπη, στη Βόρειο Αφρική και στην Μέση Ανατολή, υποδεικνύοντας πιθανή επιδημιολογική συσχέτιση.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη υποδεικνύει, ότι οι ασθενείς με AIDS δεν παρουσιάζουν ευπάθεια σε λοιμώξεις από εντεροϊούς και δεν αποτελούν πιθανή 'δεξαμενή' εντεροϊών στο γενικό πληθυσμό στον Ελλαδικό χώρο. Ενώ η ανίχνευση εντεροϊών σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς είναι τεχνικά δύσκολη, η εφαρμογή αποτελεσματικής περιβαλλοντικής επιτήρησης, χωρίς να επιδρά σημαντικά στην κλινική πορεία των ασθενών, μπορεί να συμβάλλει στην διερεύνηση της ενδημικής ή επιδημικής κυκλοφορίας των ιών στον υπό μελέτη πληθυσμό. Η τεχνική που αναπτύχθηκε αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση προς αυτήν την κατεύθυνση και η άμεση εφαρμογή της είναι απαραίτητη για την προστασία της Δημόσιας Υγείας. Ειδικότερα, η RFLP ανάλυση με το ένζυμο HpaII είναι αποτελεσματική για την αρχική κατάταξη των απομονωθέντων στελεχών σε γενετικές υποομάδες, ενώ η τεχνική που περιλαμβάνει προσδιορισμό της αλληλουχίας τμήματος της VP1 είναι επαρκής για τον προσδιορισμό του οροτύπου.

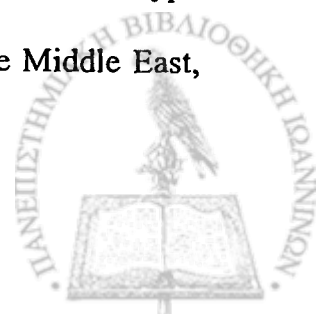


SUMMARY

The aim of this study was the detection and identification of infectious enteroviruses in patients with AIDS and in environmental samples. This investigation was set within the governing directives of Global Poliomyelitis Eradication Initiative Strategic Plan 2001 – 2005 proposed by the World Health Organisation (WHO) in year 2000.

Stool samples were examined from 19 patients with advanced HIV infection. In addition, 12 raw sewage samples found to be containing enteroviruses were also examined. Sewage samples were collected from the Nicosia and the Limassol Sewage Treatment Plants, Cyprus and from the University Hospital Plant in Ioannina, Greece. The detection of enteroviruses in AIDS patients was performed by inoculation in different cell lines. An enterovirus-specific reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was then applied. Environmental viruses were adsorbed to cellulose nitrate membrane filters, isolated from the membrane filter using the VIRADEN method and identified by RT-PCR, followed by 5'-UTR RFLP analysis and partial sequencing of the VP1 protein coding region.

Samples obtained from AIDS patients, were found negative for enterovirus detection of any serotype on all cell lines. No cytopathic effect was observed. Enterovirus-specific RT-PCR assays were also negative for the detection of enteroviral RNA. On the contrary, a total of 104 enteroviruses were isolated from sewage samples (Nicosia 26%, Limassol 64% and Ioannina 10%). All the isolated viruses, except one that was identified as a PV 2 Sabin virus, belonged to the same genetic subgroup of Human Enterovirus Species B. At the time of the study, the prevailing serotype in Cyprus and in Ioannina was found to be serotype CBV4. All isolates of the same serotype had highly similar VP1 sequences. Phylogenetic analysis revealed that identified environmental isolates correlated with strains of the same serotype isolated during the last four decades in Europe, Asia, Northern Africa and the Middle East, implying possible epidemiological relationship.



In conclusion, Greek AIDS patients seem not to be vulnerable to enteroviral infections and probably do not constitute a potential reservoir of poliovirus-prolonged excretion in Greece. On the other hand, the described methodology for the detection and identification of infectious enteroviruses in environmental samples is highly promising for environmental surveillance of enterovirus circulation and epidemiology. The 5'-UTR RFLP analysis with HpaII is useful for initial sub-classification, while partial VP1 sequencing is efficient for molecular serotyping.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abzug MJ (1995) Perinatal enterovirus infections. In *Human Enterovirus Infections*. Ed; HA Rotbart. ASM Press: Washington D.C., pp 221-238.
2. Abzug MJ (2001) Prognosis for neonates with enterovirus hepatitis and coagulopathy. *Pediatr Infect Dis J* 20: 758-763.
3. Abzug MJ, Levin MJ, Rotbart HA (1993) Profile of enterovirus disease in the first two weeks of life. *Pediatr Infect Dis J* 12: 820-824.
4. Acharya R, Fry E, Stuart D et al. (1989) The three dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Angstrom resolution. *Nature* 337:709-715.
5. Adler JL, Mostow SR, Mellin II, et al. (1970) Epidemiologic investigation of hand, foot, and mouth disease: Infection caused by coxsackievirus A16 in Baltimore, June through September 1968. *Am J Dis Child* 120:309.
6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, and DJ Lipman (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 251:403-410.
7. Altschul SF, Madden TL, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, and DJ Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
8. Alvira MM, Mendoza M (1975) Reye's syndrome: A viral myopathy? *N Engl J Med* 292:1297.
9. Andino R, Rieckhof GE, Achacoso PL, and Baltimore D (1993) Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNA complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J* 12: 3587-3598.
10. Anonymous (1996) *Polio lab network*, vol.2, no.1. World Health Organization, Geneva, Switzerland.



11. Anonymous (1997) *Manual for the virological investigation of poliomyelitis*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
12. Anonymous (1998) *Polio lab network*, vol. 4, no.4. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
13. Anonymous (1999) *Advocacy . A Practical Guide with Polio Eradication as a case study*. The Global Polio Eradication Initiative. World Health Organization, Geneva, Switzerland. (www.vaccines.who.int)
14. Anonymous (2000) *The Global Polio Eradication Initiative: Strategic Plan 2001-2005*. Department of Vaccines & Biologicals, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
15. Anonymous (2001). *Network strategy for detecting cVDPV is defined*. Polio Lab Network VII (4): 1-3.
16. Anonymous (2003) *Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation*. World Health Organization, Department of Vaccines and Biologicals, Geneva, Switzerland.
17. Arnesjo B, Eden T, Ihse I, et al. (1976) Enterovirus infections in acute pancreatitis-a possible etiologic connection. *Scand J Gastroenterol* 11:645.
18. Arnold E, Luo M, Vriend G, Rossmann MG, Palmenberg AC, Parks GD, Nicklin MJ, Wimmer E (1987) Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sciences* 84:21-25.
19. Aronson MD, Phillips CA (1975) Coxsackievirus B5 infections in acute oliguric renal failure. *J Infect Dis* 132:303.
20. Assaad F, Cockburn WC (1972) Four year study of WHO virus reports on enteroviruses other than poliovirus. *Bull WHO* 46:329.



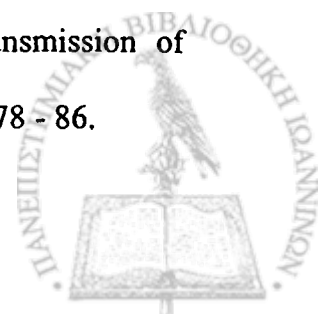
21. Atkinson PJ, Sharland M, Maguire H (1998) Predominant enteroviral serotypes causing meningitis. *Arch Dis Child*, 78: 373-374.
22. Auvinen P, Stanway G and Hyppia T (1989) Genetic diversity of enterovirus subgroups. *Arch Virol* 104:175-186.
23. Bahlke AM, Perkins JE (1945) Treatment of preparalytic poliomyelitis with gamma globulin. *JAMA* 129:1146.
24. Bain HW, McLean DM, Walker SJ (1961) Epidemic pleurodynia (Bornholm disease) due to coxsackie B-5 virus: The interrelationship of pleurodynia, benign pericarditis, and aseptic meningitis. *Pediatrics*. 27:889.
25. Baker DA, Phillips CA (1980) Maternal and neonatal infection with coxsackievirus. *Obstet Gynecol* 55:12S - 15S.
26. Barak Y, Schwartz JF (1988) Acute transverse myelitis associated with ECHO type 5 infection (Letter). *Am J Dis Child*. 142:128.
27. Bell EJ, Grist NR (1971) ECHO viruses, carditis, and acute pleurodynia. *Am Heart J* 82:133.
28. Bell EJ, Ross CAC, Grist NR (1975) Echo 9 infection in pregnant women with suspected rubella. *J Clin Pathol*. 28:267.
29. Bellmunt A, May G, Zell R et al. (1999) Evolution of Poliovirus Type 1 during 5.5 years of Prolonged Enteral Replication in an Immunodeficient Patient. *Virology* 265:178-184.
30. Bendig JW, Molyneaux P (1996) Sensitivity and specificity of mu-capture ELISA for detection of enterovirus IgM. *J Virol Methods* 59:23-32.
31. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-1323.



32. Bergelson JM, Shepley MP, Chan BM, Hemler ME, Finberg RW (1992) Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* 255:1718-1720.
33. Berlin LE, Rorabaugh ML, Heldrich F, et al. (1993) Aseptic meningitis in infants less than two years of age: Diagnosis and etiology. *J Infect Dis* 168:888 - 892.
34. Blomqvist S, Bruu AL, Stenvik M, and T Hovi (2003) Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J Gen Virol* 84:573-80.
35. Bodian D (1952) A reconsideration of the pathogenesis of poliomyelitis. *Am J Hyg* 55:414.
36. Bodian D, Nathanson N (1960) Inhibitory effect of passive antibody on virulent poliovirus excretion and on immune response in chimpanzees. *Bull Johns Hopkins Hosp* 107:143.
37. Bottinger M and E Herrstrom (1992) Isolation of polioviruses from sewage and their characteristics: experience over two decades in Sweden. *Scand J Infect Dis* 24:151-155.
38. Bowles NE, Dubowitz V, Sewry CA, et al. (1987) Dermatomyositis, polymyositis, and coxsackie-B-virus infection. *Lancet* 1:1004 - 1007.
39. Brunberg JA, Bell WE (1974) Reye syndrome. *Arch Neurol* 30:304.
40. Casas I, Powell L, Klapper PE, and GM Cleator (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 53:25-36.
41. Casas I, Tenorio A, Echevarria JM, Klapper PE, Cleator GM (1997) Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods* 66(1):39-50.



42. Centers for Disease Control and Prevention (1987) Poliomyelitis prevention: Enhanced-potency inactivated poliomyelitis vaccine-supplementary statement. *MMWR* 36:795 - 798.
43. Chalhub E, Devivo D, Siegel BA, et al. (1977) Coxsackie A9 focal encephalitis associated with acute infantile hemiplegia and porencephaly. *Neurology* 27:574.
44. Chambon M, Archimbaud C, Bailly JL, Henquell C, Regagnon C, Charbonne F, and Peigue-Lafeuille H (2001) Circulation of enteroviruses and persistence of meningitis cases in the winter of 1999-2000. *J Med Virol* 65:340-347.
45. Cherry JD, Jahn CL (1965) Herpangina. The etiologic spectrum. *Pediatrics* 36:632.
46. Cherry JD, Jahn CL (1966) Virologic studies of exanthems. *J Pediatr* 68:204.
47. Cherry JD, Lerner AM, Klein JO, et al. (1963) Coxsackie B5 infections with exanthems. *Pediatrics* 31:455.
48. Chow M, Newman JFE, Filman D et al. (1987) Myristilation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* 327:482-486.
49. Christopher S, Theogaraj S, Godbole S, et al. (1982) An epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis due to coxsackievirus A24. *J Infect Dis* 146:16 - 9.
50. Cochi SL, Hull HF, and NA Ward (1995) To conquer poliomyelitis forever. *Lancet* 345:1589-1590.
51. Cohen J (1998) Enteroviruses and Reoviruses In *Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th Edition*. Eds, Fauci A, Braunwald E, Isselbacher K et al. McGraw-Hill: New York, pp 1118-1122.
52. Couch RB, Cate TR, Gerone PJ, et al. (1965) Production of illness with a small particle aerosol of coxsackie A-21. *J Clin Invest* 44:535.
53. Couch RB, Douglas RG, Lindgren KM, et al. (1970) Airborne transmission of respiratory infection with coxsackievirus A type 21. *Am J Epidemiol*. 91:78 - 86.



54. Cuervo NS, Guillot S, Romanenkova N, Combiescu M, Aubert-Combiescu A, Seghier M, Caro V, Crainic R, and F Delpyroux (2001) Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J Virol* 75:5740-5751.
55. Dagan R & Menegus MA (1995) Nonpolio enteroviruses and the febrile young infant: epidemiologic, clinical and diagnostic aspects. *Pediatr Infect Dis J* 15:67-71.
56. Dagan R, Jenista JA, Menegus MA (1988) Association of clinical presentation, laboratory findings, and virus serotypes with the presence of meningitis in hospitalized infants with enterovirus infection. *J Pediatr* 113:975 - 978.
57. Dagan R, Jenista JA, Prather SL, et al. (1985) Viremia in hospitalized children with enterovirus infections. *J Pediatr* 106:397-401.
58. Dagan R, Menegus MA (1986) A combination of four cell types for rapid detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Med Virol* 19:219 - 28.
59. Dahling DR, Berg G, Berman D (1974) BGM, a continuous cell line more sensitive than primary Rhesus and African Green for recovery of viruses from water. *Health Lab Sci* 11(4):275-282.
60. Davis DC, Melnick JL (1957) Two additional examples of viremia in asymptomatic poliomyelitis infection. *Pediatrics* 20:975.
61. Dery P, Marks MI, Shapera R (1974) Clinical manifestations of coxsackievirus infections in children. *Am J Dis Child* 128:464.
62. Disney ME, Howard EM, Wood BSB (1953) Bornholm disease in children. *Br Med J* 1:1351.
63. Dowdle, W.R., and M.E. Birmingham (1997) The biological principles of poliovirus eradication. *J Infect. Dis* 175 (Suppl.1):286-292.



64. Drew JH (1973) Echo 11 virus outbreak in a nursery associated with myocarditis. *Aust J Pediatr.* 9:90.
65. Drew, WL (2001) Enteroviruses. In *Current: Diagnosis & Treatment in Infectious Diseases*. Eds, Wilson RW & Sande MA. McGraw-Hill: New York, pp. 371-376.
66. Duke GM, Osorio JE, and Palmenberg AC (1990) Attenuation of Mengo virus through genetic engineering of the 5'-non-coding poly (C) tract. *Nature* 343: 474-476.
67. Eckert HL, Portnoy B, Salvatore MA, et al. (1967) Group B coxsackie virus infection in infants with acute lower respiratory disease. *Pediatrics* 39:526.
68. Fauci A, Clifford HL (1998) Human Immunodeficiency virus (HIV) disease: AIDS and related disorders In *Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th Edition*. Eds, Fauci A, Braunwald E, Isselbacher K et al. McGraw-Hill: New York, pp.1802-1812.
69. Fox JP (1958) Epidemiology of poliomyelitis in populations before and after vaccination with inactivated viruses. In: *Poliomyelitis. Papers and Discussions Presented at the Fourth International Poliomyelitis Conference*. Philadelphia: JB Lippincott 136.
70. Froeschle JE, Feorino PM, Gelfand HM (1966) A continuing surveillance of enterovirus infection in healthy children in six United States cities. Surveillance enterovirus isolates 1960-1963 and comparison with enterovirus isolates from cases of acute central nervous system disease. *Am j Epidemiol* 83:455.
71. Frothingham TE (1958) ECHO virus type 9 associated with three cases simulating meningococemia. *N Engl J Med* 259:484.
72. Furione M, Guillot S, Otelea D, Balanant J, Candrea A, and R Crainic (1993) Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology* 196:199-208.



73. Galpine JF, Wilson WCM (1959) Occurrence of myocarditis in paralytic poliomyelitis. *Br Med J* 2:1379.
74. Gavrilin G, Cherkasova E, Lipskaya G et al. (2000) Evolution of circulating Wild Poliovirus and of Vaccine-Derived poliovirus in an Immunodeficient Patient: a Unifying Model. *J Virol* 74(16):7381-7390.
75. Gear JHS, Measroch V (1973) Coxsackievirus infections of the newborn. *Progr Med Virol* 15:42.
76. Georgescu MM, Balanant J, Macadam A, Otelea D, Combiescu M, Combiescu AA, Crainic R, and F Delpeyroux (1997) Evolution of the Sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 71:7758-7768.
77. Georgieff MJ, Johnson DE, Thompson TR, et al. (1987) Fulminant hepatic necrosis in an infant with perinatally acquired echovirus 21 infection. *Pediatr Infect Dis J* 6:71 - 73.
78. Georgopoulou A, Markoulatos P (2001) Sabin Type 2 Polioviruses with Intertypic Vaccine/Vaccine Recombinant Genomes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20:792-799.
79. Georgopoulou A, Markoulatos P, Spyrou N et al. (2000) Improved Genotyping Vaccine and Wild-Type Poliovirus Strains by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: Clinical Diagnostic Implications. *J Clin Microbiology* 38: 4337-4342.
80. Gillam GL, Stokes KB, McLellan J, et al. (1986) Fulminant hepatic failure with intractable ascites due to an echovirus 11 infection successfully managed with a peritoneo-venous (LeVeen) shunt. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 5:476 - 480.



81. Goodwin JF (1992) Cardiomyopathies and specific heart muscle diseases. Definitions, terminology, classifications and new and old approaches. *Postgrad Med J Suppl I* 68:S3-S6.
82. Gordon RB, Lennette EH, Sandrock RS (1959) The varied clinical manifestations of coxsackie virus infections. *AMA Arch Intern Med* 103:63.
83. Grabow WO, Botma KL, de Villiers JC, Clay CG, and B Erasmus (1999) Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. *Bull World Health Organ* 77:973-980.
84. Grandien M, Forsgren M, Ehrnst A (1995) Enteroviruses. In *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections*, 7th ed. Eds, EH Lennette, DA Lennette, ET Lennette. American Public Health Association pp. 279-297.
85. Grist NR, Bell EJ (1968) Coxsackie virus and heart diseases. *Br Med J* 3:556.
86. Grist NR, Bell EJ (1970) Enteroviral etiology of the paralytic poliomyelitis syndrome. *Arch Environ Health* 21:382.
87. Grist NR, Bell EJ, Assaad F (1978) Enteroviruses in human disease. *Prog Med Virol* 24:114-157.
88. Guillot S, Caro V, Cuervo N, Korotkova E, Combiescu M, Persu A, Aubert-Combiescu A, Delpeyroux F, and R Crainic (2000a) Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J Virol* 74:8434-8443.
89. Guillot S, Otelea D, Delpeyroux F, Crainic R (2000b) Natural Genetic Exchanges between Vaccine and Wild Poliovirus Strains in Humans. *J Virol* 74(18):8434-8443.
90. Guttman-Bass N (1987) Cell cultures and other host systems for detecting and quantifying viruses in the environment. In *Methods for recovering viruses from the environment*, Ed, G Berg. CRC Press, Inc., Boca RATON, Fla, pp. 195-228.



91. Hagg E, Ostrom L, Steen L (1978) Persistent hypothalamic-pituitary insufficiency following acute meningoencephalitis. *Acta Med Scand* 203:231.
92. Halfon N, Spector SA (1981) Final echovirus type 11 infections. *Am J Dis Child* 135:1017.
93. Hall CB, Cherry JD, Hatch MH, et al. (1977) The return of Boston exanthem: Echovirus 16 infections in 1974. *Am J Dis Child* 131:323.
94. Haller AA, and Semler BL (1992) Linker-scanning mutagenesis of the internal ribosome entry of poliovirus RNA. *J Virol* 66: 5075-5086.
95. Hammon WMcD, Coriell LI, Stokes J (1952) Evaluation of Red Cross gamma globulin as a prophylactic agent for poliomyelitis. I. Plan of controlled field tests and results of 1951 pilot study in Utah. *JAMA* 150:739 - 756.
96. Hatch MH, Marchetti GE, Nottay BK, et al. (1981) Strain characterization studies of poliovirus type 1 isolates from poliomyelitis cases in the United States in 1979. *Dev Biol Stand* 47:307-315.
97. Heinz BA, Vance LM (1995) The antiviral compound enviroxime targets the 3A coding region of rhinovirus and poliovirus. *J Virol* 69:4189-4197.
98. Helin M, Savola J, Lapinleimu K (1968) Cardiac manifestations during a coxsackie B5 epidemic. *Br Med J* 2:97.
99. Hellen CUT, and Wimmer E (1995) Enterovirus genetics. In *Human Enterovirus Infections*. Ed, HA Rotbart. Washington D.C. ASM Press, pp25-72.
100. Hierholzer JC, Hilliard KA, Esposito JJ (1975) Serosurvey for "acute hemorrhagic conjunctivitis" virus (enterovirus 70) antibodies in the southeastern United States, with review of the literature and some epidemiologic implications. *Am J Epidemiol* 102:533.



101. Horstmann DM, Emmons J, Gimpel L, et al. (1973) Enterovirus surveillance following a community-wide oral poliovirus vaccination program: A seven-year study. *Am J Epidemiol* 97:173.
102. Horstmann DM, McCollum RW (1953) Poliomyelitis virus in human blood during the "minor illness" and the asymptomatic infection. *Proc Soc Exp Biol Med.* 82:434.
103. Horstmann DM, Opton EM, Klemperer R, et al. (1964) Viremia in infants vaccinated with oral poliovirus vaccine (Sabin). *Am J Hyg* 79:47.
104. Horstmann DW (1949) Clinical aspects of acute poliomyelitis. *Am J Med* 6:592.
105. Huang CC, Liu CC, Chang YC, Chen CY, Wang ST, Yeh TF (1999) Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. *N Engl J Med* 341:936-942.
106. Hughes RO, Roberts C (1972) Hand, foot, mouth disease associated with coxsackie A9 virus. *Lancet* 2:751.
107. Jackson GG, Muidoon RL (1973) Viruses causing common respiratory infections in man: II. Enteroviruses and paramyxoviruses. *J Infect Dis* 128:387.
108. Jameson BA, Bonin J, Wimmer E, et al. (1985) Natural variants of the Sabin type 1 vaccine strains of poliovirus and correlation with a poliovirus neutralization site. *Virology* 143:337-341.
109. Jehn UW, Fink MK (1980) Myositis, myoglobinemia, and myoglobinuria associated with enterovirus echo 9 infection. *Arch Neurol* 33:457.
110. Jenista JA, Powell KR, Menegus MA (1984) Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr* 104:685-690.
111. Johnson KL, Sarnow P (1995) Viral RNA synthesis. In: *Human Enterovirus Infections*. Ed, HA Rotbart. Washington, D.C. ASM Press, pp 95-112.
112. Johnson KM, Bloom HH, Forsyth B, et al. (1963) The role of enteroviruses in respiratory disease. *Am Rev Respir Dis.* 88:240.



113. Kaplan MH, Klein SW, McPhee J, et al. (1983) Group B coxsackievirus infections in infants younger than three months of age: A serious childhood illness. *Rev Infect Dis* 5:1019 - 1032.
114. Katiyar BC, Misra S, Singh RB, et al. (1983) Adult polio-like syndrome following Enterovirus 70 conjunctivitis (natural history of the disease). *Acta Neurol Scand* 67:263 - 274.
115. Kaul A, Cohen ME, Broffman G, et al. (1979) Reye-like syndrome associated with coxsackie B2 virus infection. *J Pediatr* 94:67.
116. Kepfer PD, Hable KA, Smith TF (1974) Viral isolation rates during summer from children with acute upper respiratory tract disease and healthy children. *Am J Clin Pathol* 61:1 - 5.
117. Kew O, Sutter R, Nottay B et al.(1998) Prolonged Replication of a Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus in an Immunodeficient Patient. *J Clin Microbiol* 36(10):2893-2899.
118. Kew OM (1988) Applications of molecular epidemiology to the surveillance of poliomyelitis. Proceedings of the National Academy of Medicine, Institute of Medicine Conference "Poliomyelitis Vaccines: Re-evaluating Policy Options.". National Academy of Sciences, Washington D.C., USA.
119. Kew OM, Nottay BK (1985) Evolution of the oral poliovaccine strains in humans occurs by both mutation and intramolecular recombination. In *Modern Approaches to Vaccines*: Eds, Chanock R, Lerner R. Cold Spring Harbor Laboratory: New York, pp.357-362.
120. Kibrick S (1975) Current status of coxsackie and ECHO viruses in human disease. *Progr Med Virol.* 1964;6:27. 73. Grist N, Bell EJ, Reid D. The epidemiology of enteroviruses. *Scott Med J* 20:27.



121. Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM and Tracy S (2001) The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol* 11:355-368.
122. King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypiä T, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Palmenberg AC, Skern T, G. Stanway (2000). Picornaviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Eds, Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Calisher CH, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. Academic Press: New-York, San Diego. Pp. 657-673.
123. Kinney JS, McCray E, Kaplan JE, et al. (1986) Risk factors associated with echovirus 11 infection in a newborn nursery. *Pediatr Infect Dis J* 15:192 - 197.
124. Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emini EA, Hanecak R, Lee JJ, van der Werf S, Anderson CW, and Wimmer E (1981) Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 291:547-553.
125. Klatt E (2002) *Pathology of AIDS*, Version 12. Florida State University College of Medicine.
126. Klespies SL, Cebula DE, Kelley CL, Galehouse D, and Maurer CC (1996) Detection of enteroviruses from clinical specimens by spin amplification shell vial culture and monoclonal antibody assay. *J Clin Microbiol* 34:1465-1467.
127. Klingel K, Kandolf R (1996) Molecular in situ localisation techniques in diagnosis and pathogenicity studies of enteroviral heart disease. *Clin Diagn Virol* 5:157-166.
128. Kogon A, Spigland I, Frothingham TE, et al. (1969) The virus watch program: A continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families: VII. Observations on viral excretion, seroimmunity, intrafamilial spread and illness association in coxsackie and echovirus infections. *Am J Epidemiol* 89:51.



129. Koneman E, Allen S, Janda W et al. (1997) CHART 51: Neutralization Test. In *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth Edition*. Lippincott Williams & Wilkins, pp.1363.
130. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P and WC Winn, Jr (1997) Detection of Virus and Provisional Identification. In *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth Edition*. Lippincott Williams & Wilkins. pp.1238-1240 & Figure 21-15, p.1246.
131. Kono R, Uchida Y (1977) Acute hemorrhagic conjunctivitis. *Ophthalmol Dig* 39:14.
132. Kozak M (1989) The scanning model for translation: an update. *J Cell Biology* 71:2483-2501.
133. Krausslich HG, Nicklin MJH, Toyoda H et al. (1987) Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eukaryotic initiation factor 4F polypeptide p222. *J Virol* 61:2711-2718.
134. Krikelis V, Spyrou N, Markoulatos P (1988) Evaluation of enteric virus levels and serotypes recovered from wastewater and sea-water. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 32:153-158.
135. Lennette EH, Magoffin RL, Knouf EG. (1960) Viral central nervous system disease. *JAMA* 179:687.
136. Lepow ML, Carver DH, Wright HT Jr (1962) A clinical, epidemiologic and laboratory investigation of aseptic meningitis during the four-year period, 1955-1958. *N Engl J Med* 266:1181.
137. Lerner AM, Klein JO, Levin HS, et al. (1960) Infections due to coxsackie virus group A, type 9, in Boston, 1959, with special reference to exanthems and pneumonia. *N Engl J Med* 263:1265.
138. Lerner AM, Wilson FM (1973) Virus myocardiopathy. *Progr Med Virol* 15:63.



139. Li JP & Baltimore D (1988) Isolation of poliovirus 2 C mutants defective in RNA synthesis. *J Virol* 62:4016-4021.
140. Lin KH, Wang HL, Sheu MM, et al. (1993) Molecular epidemiology of a variant of coxsackievirus A24 in Taiwan: Two epidemics caused by phylogenetically distinct viruses from 1985 to 1989. *J Clin Microbiol* 31:1160-1166.
141. Lindenbaum JE, Van Dyck PC, Allen RG (1975) Hand, foot and mouth disease associated with coxsackievirus group B. *Scand J Infect Dis* 7:161.
142. Lomax NB & Yin FH (1989) Evidence for the role of the P2 protein of human rhinovirus in its host range change. *J Virol* 63:2396-2399.
143. Madhavan HN, Bedninth S, Chanraseker S (1977) A case of pleurodynia associated with coxsackie virus type A9. *J Assoc Physicians India* 25:491.
144. Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N, Plakokefalos E, Tzanakaki G, and J Kourea-Kremastinou (2001) Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 39:4426-4432.
145. Martin J, Dunn G, Hull R et al. (2000) Evolution of the Sabin Strain of Type 3 Poliovirus in an Immunodeficient Patient during the Entire 637-Day Period of Virus Excretion. *J Virol* 74(7):3001-3010.
146. Martin J, Dunn G, Hull R et al. (2000) Evolution of the Sabin Strain of Type 3 Poliovirus in an Immunodeficient Patient during the Entire 637-Day Period of Virus Excretion. *J Virol*,74:3001-3010.
147. McBean AM, Thoms ML, Albrecht P, et al. (1988) The serologic response to oral polio vaccine and enhanced potency inactivated polio vaccines. *Am J Epidemiol* 128:615 - 628.



148. McKinney RE, Katz SL, Wilfert SM (1987) Chronic Enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients. *Rev Infect Dis* 9:334-356.
149. Melnick JL (1996) Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In *Fields Virology, Third edition*. Eds, BN Fields, DM Knipe, PM Howley, et al. Lippincott – Raven: Philadelphia, pp. 655-712.
150. Melnick JL, Rennick V, Hampil B et al. (1973) Lyophilised combination pools of eenterovirus equine antisera : preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull WHO* 48:263-268.
151. Melnick JL, Schmidt NJ, Hampil B et al. (197) Lyophilised combination pools of eenterovirus equine antisera : preparation and test procedures for the identification of field strains of 19 group A coxsacievirus serotypes. *Inter Virology* 8:172-181.
152. Metcalf TG, Melnick JL, and MK Estes (1995) Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol* 49:461-487.
153. Meyer HM, Johnson RT, Crawford IP, et al. (1960) Central nervous system syndromes of viral etiology. A study of 713 cases. *Am J Med* 29:334.
154. Mims C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D and Williams R (1998) *Human Immunodeficiency virus infection*. In *Medical Microbiology, Second Edition*. Mosby: London, pp.245-246.
155. Minor PD (1992) The molecular biology of poliovaccines. *J Gen Virol* 73: 3065-3077.
156. Minor PD (2000) Eradication of Polio by Vaccination. *Virology* 268:231-232.
157. Minor PD, John A, Ferguson M, et al. (1986) Antigenic and molecular evolution of the vaccine strain of type 3 poliovirus during the period of excretion by a primary vaccinee. *J Gen Virol* 67:693-706.



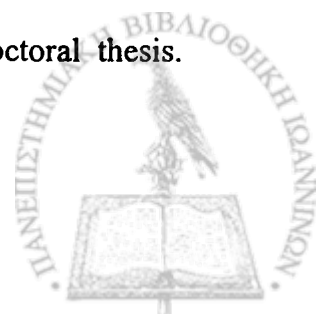
158. Miyamura K, Tanimura M, Takeda N, et al. (1986) Evolution of enterovirus 70 in nature: All isolates were recently derived from a common ancestor. *Arch Virol* 89:1-14.
159. Mocé-Llivina L, Jofre J, Méndez X, Akkelidou D, Lucena F, and GT Papageorgiou (2002) Counting cytopathogenic virus adsorbed to cellulose nitrate membrane filters as a simple method for counting viruses in raw sewage and sewage effluents. *J Virol Methods* 102:83-92.
160. Mocé-Llivina L, Jofre J, Muniesa M (2003) Comparison of polyvinylidene fluoride and polyether sulphonate membranes in filtering viral suspensions. *J Virol Methods* 109:99-101
161. Modlin JF (1980) Fatal echovirus 11 disease in premature neonates. *Pediatrics* 6:775.
162. Modlin JF (1986) Perinatal echovirus infection: Insights from a literature review of 61 cases of serious infection and 16 outbreaks in nurseries. *Rev Infect Dis* 8:918-926.
163. Modlin JF (2000a) Introduction to Picornaviridae. In *Principles and Practice of infectious diseases, 5th ed.* Eds, GL Mandell, Je Bennet, and R Dolin. Churchill Livingstone, pp. 1888-1895.
164. Modlin JF (2000b) Poliovirus. In *Principles and Practice of infectious diseases. 5th ed.* Eds, GL Mandell, Je Bennet, and R Dolin. Churchill Livingstone, pp. 1895-1903.
165. Modlin JF (2000c) Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In *Principles and Practice of infectious diseases.* Eds, GL Mandell, Je Bennet, and R Dolin. 5th ed. Churchill Livingstone, pp. 1904-1919.
166. Modlin JF, Dagan R, Berlin LE, et al. (1991) Focal encephalitis with enterovirus infections. *Pediatrics* 88:841 - 845.
167. Modlin JF, Polk BF, Horton P, et al. (1981) Perinatal echovirus infection: Risk of transmission during a community outbreak. *N Engl J Med* 305:368.



168. Moore M (1982) Enteroviral disease in the United States, 1970-1979. *J Infect Dis* 146:103.
169. Morens DM (1978) Enteroviral disease in early infancy. *J Pediatr* 92:374.
170. Morens DM, and Pallansch MA (1995) Epidemiology. In: *Human Enterovirus Infections*. Ed, HA Rotbart ASM Press, Washington, D.C., pp 3-23.
171. Moritsugu Y, Sawada K, Hinohara M, et al. (1968) An outbreak of type 25 echovirus infection with exanthem in an infant home near Tokyo. *Am J Epidemiol* 87:599.
172. Muir P, Kammerer U, Korn K, Mulders MN, Pöyry T, Weissbrich B, Kandolf R, Cleator GM and AM van Loon (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin Microbiol Rev* 11:202-227.
173. Muir P, van Loon AM (1997) Enterovirus infections of the central nervous system. *Inter Virology* 40:153-166.
174. Mulders MN, Salminen M, Kalkkinen N, and T Hovi (2000) Molecular epidemiology of coxsackievirus B4 and disclosure of the correct VP1/2A^{pro} cleavage site: evidence for high genomic diversity and long-term endemicity of distinct genotypes. *J Gen Virol* 81:803-812.
175. Neu HN (1958) Gastro-intestinal complications in poliomyelitis. In *Poliomyelitis: Papers and Discussions Presented at the Fourth International Poliomyelitis Conference*. Philadelphia: JB Lippincott 546.
176. Neva FA (1956) A second outbreak of Boston exanthem disease in Pittsburgh during 1954. *N Engl J Med* 254:838.
177. Neva FA, Femster RF, Gorbach IJ (1954) Clinical and epidemiological features of an unusual epidemic exanthem. *JAMA* 155:544.



178. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, and MA Pallansch (1999a) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 37:1288-1293.
179. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR and MA Pallansch (1999b) Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 73: 1941-1948.
180. Oberste MS, Nix WA, Maher K, and MA Pallansch (2003) Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol* 26:375-377.
181. Ogra PL, Karzon DT (1969) Distribution of poliovirus antibody in serum, nasopharynx, and alimentary tract following segmental immunization of lower alimentary tract with poliovaccine. *J Immunol* 102:1423.
182. Ogra PL, Karzon DT (1971) Formation and function of poliovirus antibody in different tissues. *Prog Med Virol.* 13:157.
183. Oregan S, Robitaille P, Mongeau JG, et al. (1980) The hemolytic-uremic syndrome associated with echo 22 infection. *Clin Pediatr* 19:125.
184. Pallin R, Wyn-Jones AP, Place BM, and NF Lightfoot (1997) The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 67:57-67.
185. Palmenberg AC (1987) Comparative organisation and genome structure in picorna viruses. In: *Positive Strand RNA Viruses*. Eds, MA Brinton & R Rueckert. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology* 54:25-34.
186. Papageorgiou GT (2000) Description of a simple method for the enumeration and identification of viruses absorbed to cellulose nitrate membranes. Doctoral thesis. University of Barcelona, barcelona, Spain.



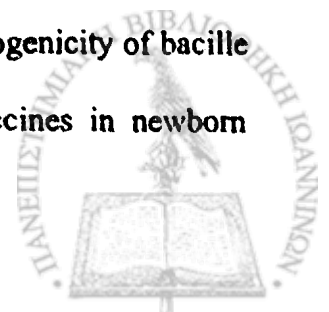
187. Papageorgiou GT, Moce-Llivina L, Christodoulou CG, Lucena F, Akkelidou D, Ioannou E, and J Jofre (2000) A simple methodological approach for counting and identifying cytopathogenic viruses adsorbed to cellulose nitrate membrane filters. *Appl Environ Microbiol* 66:194-198.
188. Parks WP, Queiroga LT, Melnick JL (1967) Studies of infantile diarrhea in Karachi, Pakistan. Multiple virus isolations from rectal swabs. *Am J Epidemiol* 85:469.
189. Patel JR, Daniel J, Mathan VI (1985) An epidemic of acute diarrhoea in rural southern India associated with echovirus type 11 infection. *J Hyg (Lond)* 95:483 - 492.
190. Patriarca PA (1994) Polio outbreaks: a tale of torment. *Lancet* 344:630-631.
191. Peters ACB, Vielvoye GJ, Verstey J, et al. (1979) Echo 25 focal encephalitis and subacute hemichorea. *Neurology* 29:676.
192. Pöyry T, Kinnunen L, Hyypiä T, Brown B, Horsnell C, Hovi T, and Stanway G (1996) Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *J Gen Virol* 77:1699-1717.
193. Prevots DR, Ciofi degli Atti ML, Sallaband A et al. (1998) Outbreak of paralytic poliomyelitis in Albania 1996: high attack rate among adults and apparent interruption of transmission following nationwide mass vaccination. *Clin Infect Dis* 26:412-425.
194. Price RA, Garcia JH, Rightsel WA (1970) Choriomeningitis and myocarditis in an adolescent with isolation of coxsackie B-5 virus. *Am J Clin Pathol* 53:825.
195. Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, and G Girones (1994) Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol* 60:2963-2970.



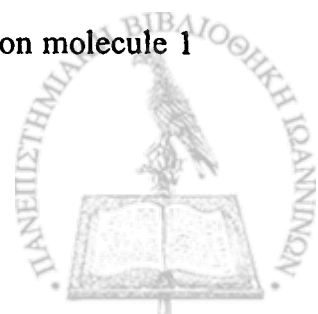
196. Racaniello VR (1995) Early events in infection: receptor binding and cell entry. In *Human Enterovirus Infections*. Ed, HA Rotbart. Asm Press: Washington, D.C. pp 73-93.
197. Rainsingh AI, Caggana M, and Ronstrom S (1995) Genetic mapping of the determinants of plaque morphology of coxsackievirus B4. *Arch Virol* 140: 215-222.
198. Ray CG, Tucker VL, Harris DJ, et al. (1970) Enteroviruses associated with the hemolytic-uremic syndrome. *Pediatrics* 46:378.
199. Ren R, Constantini F, Gorgacz Ej, et al. (1990) Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor : a new model for poliomyelitis. *Cell* 63: 353-362.
200. Reynolds KA, Gerba CP, and IL Pepper (1996) Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl Environ Microbiol* 62:1424-1427.
201. Roden VJ, Cantor HE, O'Connor DM, et al. (1975) Acute hemiplegia of childhood associated with coxsackie A9 viral infection. *J Pediatr* 86:56.
202. Roger-Zisman B, Allison AC (1973) The role of antibody and host cells in the resistance of mice against infection by coxsackie B-3 virus. *J Gen Virol* 19:329.
203. Roivainen M, Piirainen L, Hovi T, et al (1994) Entry of coxsackievirus A9 into host cells: specific interactions with $\alpha\beta 3$ integrin, the vitronectin receptor. *Virology* 203:357-365.
204. Romero JR, Rotbart HA (2003) Enteroviruses. In *Manual of Clinical Microbiology*. Eds, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Blackwell Publishing, pp 1427-1438.
205. Rorabaugh ML, Berlin LE, Heldrich F, et al. (1993) Aseptic meningitis among infants less than two years of age: Acute illness and neurologic complications. *Pediatrics* 92:206 -211.



206. Rose NR, Wolfgram LJ, Herskowitz A, et al. (1986) Postinfectious autoimmunity: Two distinct phases of coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Ann NY Acad Sci* 475:146 - 56.
207. Rossman MG & Johnson JE (1989) Icosahedral RNA virus structure. *Annu rev Biochem* 58:533-573.
208. Rossman MG, Arnold E, Erickson JW et al. (1985) Structure of the human cold virus (rhinovirus 14) and its functional relationship to other picornaviruses. *Nature* 317:145-153.
209. Rotbart HA (1995) Meningitis and encephalitis. In *Human Enterovirus Infections*. Ed, HA Rotbart. ASM Press: Washington D.C. pp 271-289.
210. Rotbart HA (1998) Enteroviruses. In *Krugman's Infectious Diseases of Children, 10th ed.* Eds, Katz SL, Gershon AA, Hotez PJ. Mosby, pp 91-97.
211. Rotbart HA (2002) Treatment of picornavirus infections. *Antiviral Research* 53:83-98.
212. Rueckert RR & Wimmer E (1984) Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J Virol* 50:957-959.
213. Rueckert RR (1996) Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields Virology, Third ed.* Eds, BN Fields, DM Knipe, PM Howley, et al. Philadelphia: Lippincott - Raven, pp 609-654.
214. Rusin P, Enriquez C, Johnson D, and C Gerba (2000) Enteric viruses. In *Environmental Microbiology, 1st ed.* Eds, Maier R, Pepper I, Gerba C. Academic Press: London, pp.472-484.
215. Russell SJM, Bell EJ (1970) Echoviruses and carditis. *Lancet* 1:784.
216. Ryder RW, Octoby MJ, Mvula M et al. (1993) Safety and immunogenicity of bacille Calmette-Guerin, diphtheria-tetanus-pertussis, and oral polio vaccines in newborn



- children in Zaire infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Pediatr* 122:697-702.
217. Sabin AB (1955) Behavior of chimpanzee-avirulent poliomyelitis viruses in experimentally infected human volunteers. *Am J Med Sci* 230:1.
218. Sabin AB (1956) Pathogenesis of poliomyelitis: Reappraisal in light of new data. *Science* 123:1151.
219. Sabin AB (1985) Oral poliovirus vaccine: History of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *J Infect Dis* 151:420 - 426.
220. Sabin AB, Krumbiegel ER, Wigand R (1958) ECHO type 9 virus disease. *AMA J Dis Child* 96:197.
221. Sainani GS, Krompotic E, Slodki SJ (1968) Adult heart disease due to the coxsackie virus B infection. *Medicine* 47:133.
222. Schurmann W, Eggers HJ (1985) An experimental study on the epidemiology of enteroviruses: Water and soap washing of poliovirus 1-contaminated hands, its effectiveness and kinetics. *Med Microbiol Immunol* 174:221 - 236.
223. Schweiger B, Schreier E, Bothig B et al. (1994) Differentiation of vaccine and wild-type polioviruses using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Arch Virol* 134:39-50.
224. Sedmak G, Bina D, MacDonald J (2003) Assessment of an Enterovirus Sewage Surveillance System by Comparison of clinical isolates from Milwaukee, Wisconsin, Collected August 1994 to December 2002. *Appl Environ Microbiol* 69:7181-7187.
225. Shafren DR, Dorahy DJ, Ingham RA, Burns GF, Barry RD (1997) Coxsackieviruses - A21 binds to decay-accelerating factor but requires intracellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J Virol* 71:4736-4743.



226. Shieh YS, Baric RS, and MD Sobsey (1997) Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage. *Appl Environ Microbiol* 63:4401-4407.
227. Shindarov LM, Chumakov MP, Voroshilova MK, et al. (1979) Epidemiological, clinical, and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis-like disease caused by enterovirus 71. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 23:284.
228. Siafakas N, Georgopoulou A, Markoulatos P, Spyrou N (2000) Isolation of Polioviruses and other Enteroviruses in South Greece Between 1994 and 1998. *J Clin Lab Analysis* 14:157-163 .
229. Siafakas N, Georgopoulou A, Markoulatos P, Spyrou N, and G Stanway (2001a) Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J Clin Lab Anal* 15:87-93.
230. Siafakas N, Markoulatos P, Stanway G, Tzanakaki G, and J Kourea-Kremastinou (2001b) A reliable RT-PCR/RFLP assay for the molecular classification of enterovirus reference and wild type strains to either of the two genetic clusters on the basis of the 5'-UTR. *Mol Cell Probes* 16:209-216.
231. Siafakas N, Markoulatos P, Vlachos C, Stanway G, Tzanakaki G, and J Kourea-Kremastinou (2003) Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Mol Cell Probes* 17:113-123.
232. Simoes EA, John TJ (1986) The antibody response of seronegative infants to inactivated poliovirus vaccine of enhanced potency. *J Biol Stand* 14:127 - 131.
233. Smith WG (1966) Adult heart disease due to the coxsackie virus group B. *Br Heart J* 28:204.
234. Smith WG (1970) Coxsackie B myopericarditis in adults. *Am Heart J* 80:34.



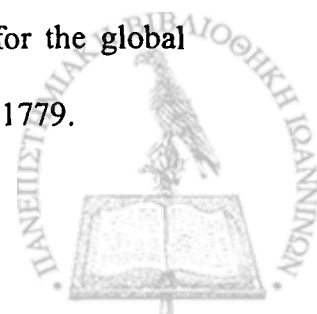
235. Sole MJ, and Piu P (1993) Viral myocarditis: a paradigm for understanding the pathogenesis and treatment of dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol Suppl A* 22:99A-105A.
236. Speer ME, Yawn DH (1984) Fatal hepatoadrenal necrosis in the neonate associated with echovirus types 11 and 12 presenting as a surgical emergency. *J Pediatr Surg* 19:591 - 593.
237. Spencer WA, Jackson RR, Vallbona C, et al. (1960) Circulatory disturbances in life-threatening poliomyelitis. *Am Heart J* 59:384.
238. Stanton GJ, Langford MP, Baron S (1977) Effect of interferon, elevated temperature, and cell type on replication of acute hemorrhagic conjunctivitis viruses. *Infect Immun* 18:370.
239. Stanway G (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol* 71:2483-2501.
240. Stanway G, Hughes PJ, Mountford RC et al. (1984) The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res* 11:5629-5643.
241. Steigman AJ, Lipton MM, Braspenickx H (1962) Acute lymphonodular pharyngitis: A newly described condition due to coxsackie A virus. *J Pediatr* 61:331.
242. Steinhoff MC (1978) Viruses and diarrhea-a review. *Am J Dis Child* 132:302.
243. Stevens KM (1959) Estimate of molecular equivalent of antibody required for prophylaxis and therapy of poliomyelitis. *J Hyg (Camb)* 57:198.
244. Strikas RA, Anderson LJ, Parker RA (1986) Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enteroviruses in the United States. *J Infect Dis* 153:346-351.
245. Sylvest E (1934) Epidemic Myalgia: Bornholm Disease. London: Oxford University Press 1 - 155.



246. Takeda N, Miyamura K, Ogino T, et al. (1984) Evolution of enterovirus type 70 : Oligonucleotide mapping analysis of RNA genome. *Virology* 134:375-388.
247. Tambini G, Andrus JK, Marques E, Boshell J, Pallansch M, de Quadros CA, and O Kew (1993) Direct detection of wild poliovirus circulation by stool surveys of healthy children and analysis of community wastewater. *J Infect Dis* 168:1510-1514.
248. Thoelen I, Moës E, Lemey P, Mostmans S, Wolants E, Lindberg AM, Vandamme AM, and M Van Ranst (2004) Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5' Noncoding region in an epidemiological survey of the human enterovirus B species. *J Clin Microbiol* 42:963-971.
249. Thompson JD, Higgins DG and TJ Gibson (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
250. Tolskaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, et al. (1983) Intertypic recombination in poliovirus: Genetic and biochemical studies. *Virology* 124:121-132.
251. Torfason EG, Reimer CB, Keyserling HL (1987) Subclass restriction of human enterovirus antibodies. *J Clin Microbiol* 25:1376 - 1379.
252. Toyoda H, Nicklin MJH, Murray MG et al. (1986) A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell* 45:761-770.
253. Van der Avoort HG, Reimerink JH, Ras A, Mulders MN, and AM Van Loon (1995) Isolation of epidemic poliovirus from sewage during the 1992-3 type 3 outbreak in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 114:481-491.
254. Wallach J (2000) Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). In *Interpretation of Diagnostic Tests- 7th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins, pp.828.



255. Warin JF, Davies JBM, Sanders FK, et al. (1953) Oxford epidemic of Bornholm disease, 1951. *Br Med J* 1:1345.
256. Warren RJ, Lepow ML, Bartsch GE, et al. (1964) The relationship of maternal antibody, breast feeding, and age to the susceptibility of newborn infants to infection with attenuated poliovirus. *Pediatrics* 34:4.
257. Weinstein L, Shelokov A, Seltser R, et al. (1952) A comparison of the clinical features of poliomyelitis in adults and in children. *N Engl J Med* 246:296.
258. Weller TH, Enders JF, Buckingham M, et al. (1950) Etiology of epidemic pleurodynia: Study of two viruses isolated from typical outbreak. *J Immunol* 65:337.
259. Welliver RC, Cherry JD (1978) Aseptic meningitis and orchitis associated with echovirus 6 infection. *J Pediatr* 92:239.
260. Whitley RJ, Soong S-J, Hirsch MS, et al. (1981) Herpes simplex encephalitis: Vidarabine therapy and diagnostic problems. *N Engl J Med* 304:313.
261. Wolf JL, Rubin DH, Finberg R, et al. (1981) Intestinal M cells: A pathway for entry of reovirus into the host. *Science* 212:471-472.
262. Woodruff JF (1979) Lack of correlation between neutralizing antibody production and suppression of coxsackie B-3 replication in target organs: Evidence for involvement of mononuclear inflammatory cells in host defense. *J Immunol* 123:31.
263. Woodruff JF (1980) Viral myocarditis. *Am J Pathol.* 101:427.
264. Woodruff JF, Woodruff JJ (1974) Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackievirus B3 heart disease. *J Immunol.* 113:1726.
265. Wreghitt TG, Gandy GM, King A, et al. (1984) Fatal neonatal echo 7 virus infection (Letter). *Lancet* 2:465.
266. Wright PF, Kim-Farley RJ, de Quadros CA, et al. (1991) Strategies for the global eradication of poliomyelitis by the year 2000. *N Engl J Med* 325:1774 - 1779.



267. Yang CF, De L, Holloway BP, et al. (1991) Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction. *Virus Res* 20:159-179.
268. Yang CF, Naguib T, Yang SJ, Nasr E, Jorba J, Ahmed N, Campagnoli R, van der Avoort H, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, Pallansch M, and O Kew (2003) Circulation of Endemic Type 2 Vaccine-Derived Poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J Virol* 77:8366-8377.
269. Yoshioka I, Horstmann DM (1960) Viremia in infection due to ECHO virus type 9. *N Engl J Med* 262:224.
270. Yousef GE, Bell EJ, Mann GF et al. (1988) Chronic enterovirus infection in patients with postviral fatigue. *Lancet* 1:146-150.
271. Ανώνυμος (2004). Επιδημιολογική επιτήρηση του HIV/AIDS στην Ελλάδα, έκδοση Κέντρου Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων (Κ.Ε.Ε.Λ.), τεύχος 19.
272. Τσότσος Αθ. (1992) Εντεροϊοί. Στο: *Ιατρική Ιολογία Γενική – Κλινική – Εργαστηριακή*, Εκδ. Λίτσας, Αθήνα, σελ.295-312.
273. Φραντζίδου – Αδαμοπούλου Φ (1999) Ιοί της οικογένειας *Picornaviridae*. Στο: *Ιατρική Μικροβιολογία* Εκδ, Α. Αντωνιάδης, Γρ. Αντωνιάδης, Ν. Λεγάκης, Ι. Τσελέντης. Τόμος ΙΙ, 2η έκδ. Πασχαλίδης, Αθήνα, σελ.322-334.
274. Χριστάκης ΓΒ, Λεγάκης ΝΙ (2002) *Λοιμώξεις από Εντεροϊούς*, σ.395. Εις: *Κλινική Μικροβιολογία και Λοιμώξεις*, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα.

