



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΠΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ

Αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας σε λύματα από αστικές περιοχές και δομές φιλοξενίας προσφύγων

Κωνσταντίνα Β. Κόλα

Επιβλέπων καθηγητής: Χατζηχριστοδούλου Χριστάκης

2023



*«Κόλα Κωνσταντίνα», «Αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας σε
λύματα από αστικές περιοχές και δομές φιλοξενίας προσφύγων»*

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Χατζηχριστοδούλου Χριστάκη καθώς και τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής κα Μουχτούρη Βαρβάρα και κ. Ραχιώτη Γεώργιο για τις συμβουλές τους.

Ευχαριστώ το προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας για την πολύτιμη βοήθεια.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ στον κ. Βόντα Αλέξανδρο για την καθοδήγηση και την αμέριστη στήριξη του.



*«Κόλα Κωνσταντίνα», «Αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας σε
λύματα από αστικές περιοχές και δομές φιλοξενίας προσφύγων»*

Τριμελής Επιτροπή

1. Χατζηχριστοδούλου Χριστάκης, καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
2. Μουχτούρη Βαρβάρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Υγιεινής και Επιδημιολογίας, τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
3. Ραχιώτης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Επιδημιολογίας & Επαγγελματικής Υγιεινής, τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.



Αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας σε λύματα από αστικές περιοχές και δομές φιλοξενίας προσφύγων

Περίληψη

Ο ιός της Πολιομυελίτιδας ανήκει στο γένος *Enterovirus C*, της οικογένειας *Picornaviridae*. Μεταδίδεται κυρίως μέσω της κοπρανοστοματικής οδού αλλά μπορεί να μεταδοθεί και μέσω σταγονιδίων. Χαρακτηριστικό της λοίμωξης από τον ιό είναι η οξεία χαλαρή παράλυση (AFP), μια κλινική εκδήλωση που παρουσιάζεται σε $\leq 1\%$ των λοιμώξεων. Ο ιός προσβάλλει κυρίως παιδιά < 5 ετών. Η πλειονότητα των λοιμώξεων είναι ασυμπτωματικές ή εμφανίζουν ήπια συμπτωματολογία. Η Πρωτοβουλία Παγκόσμιας Εξάλειψης του ιού της Πολιομυελίτιδας (GPEI), από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), ξεκίνησε το 1988, όπου ο ιός ενδημούσε σε 125 χώρες ενώ σήμερα ενδημεί σε 2 μόλις χώρες, το Πακιστάν και το Αφγανιστάν. Ο ιός της Πολιομυελίτιδας αποβάλλεται σε μεγάλες ποσότητες στα κόπρανα, οπότε η επιτήρηση των λυμάτων αποτελεί συμπληρωματικό μέτρο για την ανίχνευση κρουσμάτων του ιού στην κοινότητα.

Η Ελλάδα θεωρείται απαλλαγμένη από τον ιό της Πολιομυελίτιδας από το 2002. Το τελευταίο περιστατικό πολιομυελίτιδας στην χώρα ήταν το 1996. Τα τελευταία χρόνια, η Ελλάδα δέχεται αυξημένες μεταναστευτικές ροές από πληθώρα χωρών της Αφρικής και Νοτιοανατολικής Ασίας, συμπεριλαμβανομένου του Αφγανιστάν και του Πακιστάν όπου ο ιός ενδημεί.

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας σε συνολικά 311 δείγματα αστικών λυμάτων και βοθρολυμάτων, το διάστημα Μάρτιος-Αύγουστος 2023. Τα αστικά λύματα συλλέχθηκαν από τους βιολογικούς καθαρισμούς της Αλεξανδρούπολης, Ξάνθης, Λάρισας και του Βόλου, ενώ τα βοθρολύματα συλλέχθηκαν από τη δομή φιλοξενίας προσφύγων στο Κουτσόχερο, Λάρισας. Όγκος 40ml επεξεργάστηκε και συμπυκνώθηκε με στήλες κατακράτησης και ακολούθησε εκχύλιση γενετικού υλικού. Ο μοριακός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με realtime RT-PCR και εκκινητές που στοχεύουν στην συντηρημένη περιοχή VP1. Μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, δεν βρέθηκε γενετικό υλικό του ιού της Πολιομυελίτιδας.

Η αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας στα αστικά λύματα αλλά και βοθρολύματα των δομών φιλοξενίας προσφύγων και μεταναστών μπορεί να βοηθήσει στον έγκαιρο εντοπισμό εισερχόμενων κρουσμάτων ώστε να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα για την προάσπιση της δημόσιας υγείας.

Λέξεις κλειδιά: Πολιομυελίτιδα, επιδημιολογία, επιτήρηση λυμάτων



Detection of Poliovirus in wastewater from urban areas and refugee shelters

Abstract

Poliovirus belongs to the *Enterovirus C* genus and the *Picornaviridae* family. It is mainly transmitted by the fecal-oral route but it can also be transmitted via droplets and less frequently by infected surfaces. A hallmark of the viral infection caused is Acute Flaccid Paralysis (AFP), a clinical manifestation that occurs in $\leq 1\%$ of infections. The virus predominantly affects children under 5 years of age. The majority of infections are asymptomatic or they present with mild symptoms, similar to those of the common cold. In 1988, the Global Polio Eradication Initiative (GPEI) was launched by the World Health Organization (WHO). Back then, the virus was endemic in a total of 125 countries and as of right now it is endemic in just two, Pakistan and Afghanistan. *Poliovirus* is excreted in large quantities through feces, even if the carriers are asymptomatic. Wastewater surveillance is a complementary measure of monitoring the presence of virus outbreaks and its circulation in the community.

In the present study, a search for *Poliovirus* was carried out in 311 samples of urban wastewater and latrines from March until August 2023. The urban wastewater samples were collected from the cities of Larissa, Xanthi, Alexandroupoli and Volos, while the samples from the latrines were collected from the refugee shelter in Koutsochero, Larissa. Volume of 40ml was concentrated using retention columns followed by RNA extraction. Real-time RT-PCR was utilised for the detection of Poliovirus in the genetic material extracted and primers targeting the conserved VP1 region were used. All samples were found to be negative for Poliovirus.

Greece has been considered to be a polio-free country since 2002. The country receives and hosts a great number of migrants and refugees, both from neighbouring countries and from countries neighbouring countries that are endemic in the *Poliovirus*. Incoming outbreaks can be detected early through wastewater surveillance. Therefore, it is possible to take the necessary measures in time in order to prevent transmission to the population.

Key words: poliovirus, epidemiology, environmental surveillance



Περιεχόμενα

Περίληψη.....	i
Abstract	ii
Κατάλογος πινάκων	v
Κατάλογος εικόνων.....	vi
Συντομογραφίες/Ακρωνύμια	vii
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. Εισαγωγή.....	2
1.1 Γενικές πληροφορίες για τον ιό.....	2
1.2 <i>Picornaviridae</i>	6
2. Ιστορική αναδρομή.....	7
3. Ο ιός της Πολιομυελίτιδας.....	9
3.1 Δομή του ιού	9
3.1.1. Γονιδίωμα του ιού της Πολιομυελίτιδας	11
3.1.3 Χαρακτηριστικά του ιού της Πολιομυελίτιδας.....	17
3.1.4 Στελέχη του ιού της Πολιομυελίτιδας	18
4. Μετάδοση του ιού της Πολιομυελίτιδας	21
5. Παθογένεια	23
6. Κλινικά συμπτώματα.....	27
7. Εμβόλια	29
7.1. Εμβόλιο με εξασθενημένο ιό	29
7.2. Εμβόλιο με αδρανοποιημένο ιό.....	32
7.2.1 IPV και άλλα εμβόλια.....	33
7.3 Παρενέργειες των εμβολίων	35
8. Επιδημιολογία.....	36
8.1 Πρωτοβουλία για την παγκόσμια εκρίζωση του ιού της Πολιομυελίτιδας (GPEI).....	36
8.2 Επιτήρηση λυμάτων	46
9. Μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης	53
9.1 Κλασικές μέθοδοι.....	55
9.2 Μοριακές μέθοδοι	57
10. Εξέλιξη των ιών της Πολιομυελίτιδας.....	60



10.1 Μεταλλαξιγένεση	60
10.2 Μηχανισμοί ανασυνδυασμού	61
10.2.1 Μηχανισμός αλλαγής μήτρας	61
10.2.2 Μηχανισμός ρήξης-επανένωσης	62
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	64
Στόχος εργασίας.....	65
Μέθοδοι και υλικά	66
Συλλογή δειγμάτων	66
Επεξεργασία λυμάτων	67
Μέθοδος κατακρήμνισης με την χρήση PEG/NaCl και απομόνωση γενετικού υλικού	67
Στήλες κατακράτησης	69
Ενίσχυση γονιδιακών στόχων με realtime RT-PCR	71
Αποτελέσματα	75
Συζήτηση	77
Βιβλιογραφία	80
Παράρτημα Α: Μέθοδος κατακρήμνισης με την χρήση PEG/NaCl	90
Παράρτημα Β: Μέθοδος κατακράτησης με στήλες	92
Παράρτημα Γ: Απομόνωση γενετικού υλικού	94
Παράρτημα Δ: Μέθοδος realtime RT-PCR	96



Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1 Αριθμός AFP και επίπτωση NPAFP περιστατικών τα τελευταία 10 χρόνια (WHO, 2023b)	37
Πίνακας 2 Σύνολο καταγεγραμμένων περιστατικών AFP 2019-2023	42
Πίνακας 3 Δειγματοληψίες λυμάτων τα έτη 2019-2023, Παγκόσμια δεδομένα	49
Πίνακας 4 Όγκοι αντιδραστηρίων για παρασκευή μίγματος MasterMix σύμφωνα με το Invitrogen™ SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (ThermoFisher Scientific, 2023b)	72
Πίνακας 5 Συνθήκες realtime RT-PCR	73
Πίνακας 6 Οι rapEV και MS2 εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην realtime RT-PCR	73
Πίνακας 7 Οι rapPV εκκινητές.....	73
Πίνακας 8 Οι WPV, Sabin και VDPV εκκινητές.....	74
Πίνακας 9 Τα δείγματα που συλλέχθηκαν ανά πόλη και μήνα το διάστημα Μάρτιος-Αύγουστος 2023.....	75
Πίνακας 10 Ποσοστιαία αναλογία των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ανά περιοχή	76
Πίνακας 11 Οι κορυφαίες εθνικότητες νόμιμων μεταναστών στην Ελλάδα για το 2023 (Υπουργείο Μετανάστευσης & Ασύλου, 2020)	77
Πίνακας 12 Οι κορυφαίες εθνικότητες προσφύγων στην Ελλάδα για το 2023 (Υπουργείο Μετανάστευσης & Ασύλου, 2020)	78



Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1 Σχηματική απεικόνιση του καψιδίου του ιού της Πολιομυελίτιδας (Blondel κ.ά., 1998)	9
Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος του ιού της Πολιομυελίτιδας (S. D. Gupta & Banerjee, 2019)	11
Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση του υποδοχέα CD155 (Pfister κ.ά., 1999)	24
Εικόνα 4 Ο κύκλος ζωής του ιού της Πολιομυελίτιδας (Pfister κ.ά., 1999).....	26
Εικόνα 5 Τα δηλωμένα περιστατικά παραλυτικής νόσου από cVDPVs στελέχη το διάστημα 2016-2021 (WHO, 2023b).....	30
Εικόνα 6 Η πορεία του ιού της Πολιομυελίτιδας στον κόσμο από την έναρξη του GPEI (Bahl κ.ά., 2018).....	40
Εικόνα 7 Τα κρούσματα από WP1 και cVDPVs στον κόσμο του τελευταίους 12 μήνες (κόκκινο:WPV1, κίτρινο:cVDPV1, πράσινο: cVDPV2) (GPEI, 2023f).....	43
Εικόνα 8 Η εμβολιαστική κάλυψη των βρεφών ενός έτους, είτε με OPV είτε με IPV από το 1980 έως το 2021 (WHO, 2023i).....	44
Εικόνα 9 Αξιολόγηση της επικινδυνότητας σχετικά με τον ιό της Πολιομυελίτιδας (GPEI, 2022a).....	45
Εικόνα 10 Χρονοδιάγραμμα της εξέλιξης της επιτήρησης των λυμάτων (Ya'el Courtney, 2023)	47
Εικόνα 11 Παγκόσμια κατανομή της επιτήρησης λυμάτων για τον ιό της Πολιομυελίτιδας (GPEI, 2022a).....	52
Εικόνα 12 Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού αλλαγής μήτρας (Romanova κ.ά., 1986)	62
Εικόνα 13 Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού ρήξης-επανένωσης (Gmyl κ.ά., 1999)....	63
Εικόνα 14 Ενδεικτική εικόνα θετικού αποτελέσματος σε realtime RT-PCR (ThermoFisher Scientific, 2023a).....	71



Συντομογραφίες/Ακρωνύμια

3'UTR	3' untranslated region
5'UTR	5' untranslated region
ACIP	Advisory Committee on Immunization Practices
AFP	Acute Flaccid Paralysis
ARCC	African Regional Certification Commision
aVDPVs	ambiguous VDPVs
bOPV	bivalent OPV
CPE	Cytopathic Effect
CRE	Cis Regulatory Element
cVDPVs	circulating VDPVs
EV	Enterovirus
GPEI	Global Polio Eradication Initiative
hPVR	human Poliovirus Receptor
IRES	Internal Ribosome Entry Site
iVDPVs	immunodeficient VDPVs
LPV	Live Poliovirus
mOPV	monovalent OPV
NCC	National Certification Commision
NPEV	Nonpolio Enterovirus
OPV	Oral Poliovirus Vaccine
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene glycol
PESEP	Polio Environmental Surveillance Expansion Plan
PPS	Post-Polio Syndrome
PV	Poliovirus
PV1,2,3	Poliovirus type 1, 2, 3
RCT	Reproductive Capacity Temperature
RdRp	RNA dependent RNA polymerase
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
tOPV	trivalent OPV
VDPV	Vaccine-derived Poliovirus
VPg	Virion Protein, genome linked
WHO	World Health Organization
WPV	Wild Poliovirus

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. Εισαγωγή

1.1 Γενικές πληροφορίες για του ιούς

Οι ιοί είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια παράσιτα. Ο ξενιστής είναι απαραίτητος για την αναπαραγωγή τους. Η πλειονότητα των ιών συμβιώνει με τους ξενιστές, ωστόσο κάποιοι προκαλούν ασθένειες. (Leppard, K., 2007)

Το ερώτημα σχετικά με την προέλευση των ιών αποτελεί θέμα συζήτησης καθώς οι πληροφορίες είναι ελάχιστες. Υπάρχουν δύο βασικές θεωρίες. Σύμφωνα με την πρώτη, οι ιοί είναι εκφυλισμένα κύτταρα που προήλθαν από προκαρυωτικά ή ευκαριωτικά κύτταρα που έχασαν πολλές από τις κυτταρικές τους λειτουργίες. Σύμφωνα με τη δεύτερη θεωρία, οι ιοί είναι γονίδια που αποσπάστηκαν από τον αρχικό τους οργανισμό, μεταφέρθηκαν με κάποιο τρόπο σε άλλον οργανισμό, π.χ. μέσω κάποιας ασυνέχειας του δέρματος, και αντί να εκφυλιστούν, όπως συμβαίνει συνήθως, κατάφεραν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν. Παρόλο που αυτές οι θεωρίες έχουν διατυπωθεί εδώ και πολλές δεκαετίες, δεν υπάρχουν βάσιμες ενδείξεις ότι κάποια από τις δύο είναι σωστή. (Leppard, K., 2007)

Παλαιότερα, η ταξινόμηση των ιών γινόταν λαμβάνοντας υπόψη την παθογένεια των ιών, τον τρόπο μετάδοσης, την ενδοκυττάρια εντόπιση και την επιδημιολογία τους. Ωστόσο ένας ιός δεν προσβάλλει μόνο ένα όργανο, γεγονός που οδηγεί πολλούς ιούς να βρίσκονται σε πολλές διαφορετικές κατηγορίες. (Παπαπαναγιώτου & Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2008) (Greenwood κ.ά., 2007)

Το 1966, στο διεθνές συνέδριο Μικροβιολογίας στη Μόσχα, έλαβε χώρα η Διεθνής Σύνοδος για την ονοματολογία των ιών ICNV (International Committee on Nomenclature of Viruses), η οποία αργότερα ονομάστηκε ICTV (International Committee of Taxonomy of Viruses). Το σχήμα ταξινόμησης των Lwoff-Horne-Tournier έγινε δεκτό τότε και έτσι οι ιοί διαιρέθηκαν σε οικογένειες, γένη και είδη βάσει των συνολικών τους χαρακτηριστικών. Μερικά από τα χαρακτηριστικά των ιών που χρησιμοποιούνται στην ταξινόμησή τους είναι το μέγεθος, το σχήμα, η συμμετρία, η παρουσία ή μη ελύτρου, το γενετικό υλικό τους (DNA ή RNA), μονή/διπλή, γραμμική/κυκλική, θετικής/αρνητικής πολικότητας έλικα κ.α. (Greenwood κ.ά., 2007) (Tortora κ.ά., 2016)

Οι τάξεις έχουν ως δεύτερο συνθετικό το –virales και περιλαμβάνουν οικογένειες που μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά στο γονιδίωμά τους. Οι οικογένειες έχουν ως δεύτερο συνθετικό το –viridae. Ο γενωμικός τύπος, η χαρακτηριστική μορφολογία και δομή των βίριων, οι κύκλοι αναπαραγωγής και η κοινή εξελικτική αρχή είναι τα χαρακτηριστικά που λαμβάνονται υπόψη για την ταξινόμηση των ιών στην ίδια



οικογένεια. Η ποικιλία των παραπάνω χαρακτηριστικών οδήγησε στην θέσπιση των υποοικογενειών οι οποίες έχουν ως δεύτερο συνθετικό το –virinae. Τα γένη έχουν ως δεύτερο συνθετικό το –virus. Ιοί που ανήκουν στο ίδιο γένος μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Έτσι είναι δύσκολος ο διαχωρισμός τους σε υποείδη και τα κριτήρια διαφέρουν από γένος σε γένος. (Παπαπαναγιώτου & Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2008) (Tortora κ.ά., 2016)

Οι ιοί έχουν πολύ μικρό μέγεθος και μπορούν να παρατηρηθούν με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Οι περισσότεροι ιοί είναι πολύ μικρότεροι από τα βακτήρια. Οι μεγαλύτεροι ιοί έχουν συνήθως το μέγεθος πολύ μικρών βακτηρίων. Το μέγεθος των ιών κυμαίνεται μεταξύ 20-400nm. (Greenwood κ.ά., 2007) (Tortora κ.ά., 2016)

Το βασικό ιϊκό μολυσματικό σωματίο ονομάζεται βίριο. Η απλούστερη μορφή του ιού περιλαμβάνει το γενετικό υλικό του, DNA ή RNA, και το καψίδιο. Κάποιοι ιοί περιβάλλονται από μια επιπλέον μεμβράνη, το έλυτρο ή φάκελο. (Παπαπαναγιώτου & Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2008)

Το καψίδιο είναι πρωτεϊνικό περίβλημα το οποίο περιλαμβάνει ή εσωκλείει το γενετικό υλικό του ιού. Αποτελείται από καψομερίδια τα οποία αποτελούνται από δομικές πρωτεϊνικές υπομονάδες, τα πρωτομερή. Ανάλογα με την διάταξη τους, οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να έχουν σφαιρικό, κυλινδρικό ή δακτυλιοειδές σχήμα. Η διάταξη των καψομεριδίων γύρω από το γενετικό υλικό είναι υπεύθυνη για την συμμετρία του βιρίου. Η συμμετρία μπορεί να είναι ελικοειδής, όπου τα καψομερίδια εφάπτονται στην έλικα του νουκλεϊκού οξέος και σχηματίζεται μια σπειροειδής δομή με κενό σωλήνα. Η διάμετρος αυτής της δομής εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των πρωτομερών ενώ το μήκος της από το μήκος του νουκλεϊκού οξέος του ιού. Το άλλο είδος συμμετρίας είναι η εικοσαεδρική, στην οποία τα καψομερίδια διατάσσονται με τρόπο που μοιάζει σα να βρίσκονται πάνω σε εικοσάεδρο με 20 τριγωνικές έδρες και 12 κορυφές. Το σχήμα και οι διαστάσεις εξαρτώνται από τα πρωτομερή. (Παπαπαναγιώτου & Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2008) (Tortora κ.ά., 2016) (Greenwood κ.ά., 2007)

Ο φάκελος ή έλυτρο περιβάλλει τα καψίδια μερικών ιών. Η δομή του αποτελείται από μια στιβάδα φωσφολιπιδίων στην οποία ενσωματώνονται πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες των ιών. Το έλυτρο διασπάται και αδρανοποιείται με την χρήση αιθέρα ή άλλων λιποδιαλυτών, καταστρέφεται με την ξηρασία, τα οξέα και τα απορρυπαντικά. Καταστροφή του ελύτρου σημαίνει και απώλεια της μολυσματικότητας του ιού. Ιοί χωρίς φάκελο παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στους παραπάνω παράγοντες. (Greenwood κ.ά., 2007) (Tortora κ.ά., 2016)

Το γενετικό υλικό ενός ιού μπορεί να είναι DNA ή RNA, μονόκλωνο ή δίκλωνο,



γραμμικό ή κυκλικό, θετικής ή αρνητικής πολικότητας. Το μέγεθος του γενετικού υλικού ποικίλει, για το DNA από 5 kb έως 280 kb, για το RNA από 7 kb έως 27 kb. (Greenwood κ.ά., 2007)
(Παπαπαναγιώτου & Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2008)

Οι περισσότεροι ιοί μπορούν να μολύνουν συγκεκριμένες κατηγορίες κυττάρων, ένα είδος ξενιστή, αν και σε σπάνιες περιπτώσεις μπορούν να διευρύνουν τη μολυσματικότητα τους και σε άλλα είδη ξενιστών. Οι ιοί που μολύνουν τα βακτήρια ονομάζονται βακτηριοφάγοι. Το εύρος των ξενιστών που μπορεί να μολύνει ένας ιός εξαρτάται από τις ιδιότητες του να προσκολλάται σε κύτταρα και την διαθεσιμότητα των κυτταρικών παραγόντων που χρειάζονται για τον πολλαπλασιασμό του. Η μόλυνση ενός κυττάρου από ιό απαιτεί την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών της εξωτερικής επιφάνειας του ιού με συγκεκριμένους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου. (Tortora κ.ά., 2016)

Το γενετικό υλικό του ιού έχει ελάχιστα από τα γονίδια που χρειάζονται για τον πολλαπλασιασμό του. Το γονίδια που διαθέτει κωδικοποιούν κυρίως δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου και λίγα ένζυμα που αφορούν τον κύκλο ζωής του, τα οποία είναι λειτουργικά μόνο όταν ο ιός βρεθεί μέσα στο κύτταρο ξενιστή. Τα ιικά ένζυμα αφορούν κυρίως την αντιγραφή του. Το κύτταρο ξενιστής διαθέτει όλα τα ένζυμα που απαιτούνται για την πρωτεϊνοσύνθεση, τα ριβοσώματα, το tRNA και την παραγωγή ενέργειας για τις απαραίτητες διεργασίες του ιού. Άρα, ο ιός πρέπει να εισέλθει σε ένα κύτταρο ξενιστή και να εκμεταλλευτεί τις μεταβολικές λειτουργίες του κυττάρου προκειμένου να πολλαπλασιαστεί. Από ένα βίριο, με τον πολλαπλασιασμό, μπορούν να προκύψουν εκατοντάδες ή χιλιάδες αντίγραφα του. Η διαδικασία αυτή προκαλεί συνήθως τον θάνατο των κυττάρων ξενιστών. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα κύτταρα επιβιώνουν και παράγουν ιούς ασταμάτητα. (Tortora κ.ά., 2016) (Greenwood κ.ά., 2007) (Παπαπαναγιώτου & Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2008)

Ο βασικός μηχανισμός πολλαπλασιασμού των ζωικών ιών ξεκινάει με την προσκόλληση τους με συγκεκριμένους υποδοχείς, πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή και συνήθως έχουν το σχήμα ακίδας. Μετά την προσκόλληση, ακολουθεί η διείσδυση του ιού στο κύτταρο. Ο ιός εισέρχεται στο ευκαριωτικό κύτταρο μέσω της πινοκυττάρωσης. Πρόκειται για μια κυτταρική διαδικασία με την οποία μεταφέρονται θρεπτικές ουσίες και άλλα μόρια στο εσωτερικό του κυττάρου. Αν ένα ιικό σωματίο συνδεθεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή τότε το κύτταρο τυλίγει το σωματίο, τραβώντας το προς το εσωτερικό του, σχηματίζοντας μια κύστη. Στην περίπτωση των ιών που αποτελούνται από έλυτρο, ο ιός διεισδύει στο κύτταρο με την σύντηξη. Το έλυτρο του ιού συνδέεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και απελευθερώνει το καψίδιο στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Στην συνέχεια ακολουθεί η απέκδυση. Σε αυτό το στάδιο, το γενετικό υλικό του ιού



διαχωρίζεται από το πρωτεϊνικό του κάλυμμα αφού εγκλωβιστεί σε κύστη. Το καψίδιο διαλύεται με τη δράση λυσοσωμικών ενζύμων. Μετά πραγματοποιείται η σύνθεση των συστατικών του ιού. Πρέπει να υπάρχει ένα λειτουργικό μόριο mRNA έτσι ώστε να συντεθούν πολυπεπτίδια με τους φυσιολογικούς κυτταρικούς συνδυασμούς, ανεξαρτήτως από τα χαρακτηριστικά του γενετικού υλικού του ιού. Οι DNA ιοί που πολλαπλασιάζονται στον πυρήνα μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ένζυμα της μεταγραφής και μετάφρασης. Οι υπόλοιποι τύποι ιών συνθέτουν το mRNA με διαφορετικούς τρόπους. (Παπαπαναγιώτου & Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2008) (Greenwood κ.ά., 2007) (Tortora κ.ά., 2016)



1.2 Picornaviridae

Οι ιοί της Πολιομυελίτιδας ανήκουν στην οικογένεια των *Picornaviridae*. Η ονομασία προέρχεται από την λατινική λέξη *pico* που σημαίνει μικρός, γιατί όλοι οι ιοί αυτής της οικογένειας είναι μικροί, και την λέξη *RNA*, που είναι το γενετικό υλικό των ιών αυτής της οικογένειας. Η οικογένεια των *Picornaviridae* αποτελείται από μικρούς ιούς, εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το γενετικό τους υλικό είναι μονόκλωνο, θετικής πολικότητας *RNA*. Τα ιϊκά σωμάτια των Πικορναϊών αποτελούνται από πρωτεϊνικό καψίδιο, χωρίς περίβλημα. Η διάμετρός τους κυμαίνεται μεταξύ 30-32 nm. Το πρωτεϊνικό καψίδιο αποτελείται από 60 πρωτομερή, καθένα από τα οποία απαρτίζεται από 4 πολυπεπτίδια (VP1, VP2, VP3, VP4), τα οποία προέρχονται από μία πρόδρομη πρωτεΐνη, την P1 που είναι το αρχικό πρωτομερές. (Zell κ.ά., 2017)

Στην οικογένεια των *Picornaviridae* υπάρχουν 230 ορότυποι που διακρίνονται σε 9 γένη: *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Heparnavirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* και *Teschovirus*. Η ομαδοποίηση των ορότυπων στα γένη βασίζεται στην διαφοροποίηση των αντιγονικών χαρακτηριστικών τους, τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους καθώς και τα είδη των ξενιστών και τα όργανα που προσβάλλουν. (Zell κ.ά., 2017)

Το γένος των *Enterovirus*, στο οποίο ανήκουν οι ιοί της Πολιομυελίτιδας, αποτελείται από 80 ορότυπους που ομαδοποιούνται σε 8 είδη, 4 από τα οποία προσβάλλουν τον άνθρωπο και είναι οι ανθρώπινοι εντεροϊοί A, οι ανθρώπινοι εντεροϊοί B, οι ανθρώπινοι εντεροϊοί C και οι ανθρώπινοι εντεροϊοί D. Οι ιοί της Πολιομυελίτιδας ανήκουν στο είδος των εντεροϊών C, λόγω της μεγάλης ομοιότητας που παρουσιάζουν. (Zell κ.ά., 2017)



2. Ιστορική αναδρομή

Ενδείξεις παρουσίας του ιού της Πολιομυελίτιδας υπάρχουν από την αρχαιότητα. Το 1350 π.Χ. βρέθηκε σε μια αιγυπτιακή στήλη ένας νεαρός άντρας με ατροφία στο ένα πόδι και χαρακτηριστική ασύμμετρη χαλαρή παράλυση. Τα στοιχεία αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι μάλλον επρόκειτο για Πολιομυελίτιδα και αποτελεί ίσως την πιο παλιά περιγραφή περιστατικού Πολιομυελίτιδας. Η στήλη φιλοξενείται στο μουσείο Carlsberg στην Κοπεγχάγη. Ο Michael Underwood ήταν ο πρώτος που περιέγραψε αδυναμία των κάτω άκρων σε παιδιά η οποία αναγνωρίστηκε ως Πολιομυελίτιδα, το 1789 στην Αγγλία. Αναφορές υπάρχουν και για τον 17^ο και 18^ο αιώνα. Η Βιομηχανική Επανάσταση έφερε πολλές αλλαγές στον τρόπο ζωής των ανθρώπων της Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής, ταυτόχρονα φαίνεται ότι αυξήθηκαν και τα κρούσματα της Πολιομυελίτιδας. Επιδημίες Πολιομυελίτιδας παρατηρήθηκαν από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Ανεπτυγμένες χώρες του βόρειου ημισφαιρίου είχαν επιδημίες Πολιομυελίτιδας κάθε καλοκαίρι και φθινόπωρο κατά το πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα. Από τα τέλη του 1800 μέχρι και το πρώτο μισό του εικοστού αιώνα η Πολιομυελίτιδα αποτελούσε μείζον ζήτημα δημόσιας υγείας. (Javier, 2016) (WHO, 2004) (CDC, 2023a) (Knipe & Howley, 2013)

Οι πρώτες περιγραφές κλινικών συμπτωμάτων έγιναν τη δεκαετία του 1800 με αναφορές πυρετού σε ασθενείς με παράλυση από τον Άγγλο γιατρό Michael Underwood. Το 1840, ο Γερμανός γιατρός Jacob Heine περιέγραψε πιο συγκεκριμένα τα συμπτώματα και αναγνωρίστηκε επισήμως ως ασθένεια. Οι πρώτες περιγραφές των νευρολογικών επιπλοκών που προκαλεί ο ιός της Πολιομυελίτιδας έγιναν από τον Karl Oskar Medin, στην Σουηδία, το 1890. Η παραλυτική Πολιομυελίτιδα αναφερόταν ως νόσος Heine-Medin λόγω της συνεισφοράς τους. Οι Charcot και Joffroy περιέγραψαν τις παθολογικές αλλαγές στο πρόσθιο κέρας των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού. (Knipe & Howley, 2013) (WHO, 2023f)

Την δεκαετία 1900, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν βοήθησαν στην καλύτερη κατανόηση της λοιμογόνου δράσης της νόσου. Ο Wickman και συνεργάτες αναγνώρισαν την μεταδοτικότητα της νόσου, την σημασία των ασυμπτωματικών ατόμων στην μετάδοση του ιού και τον ρόλο της λοίμωξης του εντέρου στην παθογένεια της ασθένειας. Οι Trask και συνεργάτες αναγνώρισαν ότι ο γαστρεντερικός σωλήνας συμβάλει στην εξάπλωση του ιού. (Javier, 2016) (WHO, 2004)

Το 1909, οι Landsteiner και Popper κατάφεραν να μεταδώσουν τον ιό σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε ορόσημο στην ιστορία του ιού της Πολιομυελίτιδας καθώς επέτρεψε την έρευνα του σε άλλα είδη, συλλέγοντας πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο μόλυνσης και την παθοφυσιολογία του



ιού. Οι Enders, Weller και Robbins, το 1949, χρησιμοποιώντας αυτές τις πληροφορίες, κατάφεραν να καλλιεργήσουν τον ιό *in vitro* σε καλλιέργειες από μη νευρικά ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα. (Knipe & Howley, 2013) (Javier, 2016) (WHO, 2004) (WHO, 2023f)

Παρόλη την πρόοδο που είχε σημειωθεί, υπήρχαν ακόμα παρανοήσεις σχετικά με τον ιό της Πολιομυελίτιδας. Υπήρχε η άποψη ότι ο ιός επηρεάζει αποκλειστικά το ΚΝΣ, ότι ο ρινοφάρυγγας αποτελεί πύλη εισόδου του ιού στο ΚΝΣ και ότι ο ιός εξαπλώνεται στο ΚΝΣ πριν την ιαμμία και μέσω του οσφρητικού νεύρου. Αυτές οι λανθασμένες απόψεις σε συνδυασμό με κάποιες αποτυχημένες απόπειρες εμβολιασμού οδήγησαν ακόμα και τους επιστήμονες που μελετούσαν την Πολιομυελίτιδα σε απόγνωση σχετικά με το αν ο ιός της Πολιομυελίτιδας θα μπορέσει να περιοριστεί. (Knipe & Howley, 2013)

Βασισμένος σε προηγούμενες έρευνες, ο Enders και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ο ιός μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε καλλιέργεια μη νευρικού ιστού. Η μελέτη αυτή αποτέλεσε ορόσημο καθώς τα ευρήματα της έδειξαν ότι ο ιός μπορεί να αναπτυχθεί σε διάφορους ιστούς και ότι έχει συγκεκριμένη κυτταροπαθογόνο δράση. Δοκιμές εξουδετέρωσης οδήγησαν στην ανακάλυψη ότι ο ιός της Πολιομυελίτιδας έχει 3 ορότυπους. Ορολογικές δοκιμές απέδειξαν ότι οι περισσότεροι άνθρωποι που μολύνονται από τον ιό της Πολιομυελίτιδας δεν εμφανίζουν συμπτώματα. Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με τον επιτυχημένο πολλαπλασιασμό του ιού σε άλλους ξενιστές έθεσαν τις βάσεις για την ανάπτυξη των εμβολίων κατά του ιού. (Knipe & Howley, 2013) (WHO, 2004)

Παρασκευάστηκαν δύο είδη εμβολίων. Το 1954 οι Salk Jonas και Younger Julius έφτιαξαν το εμβόλιο κατά του ιού της Πολιομυελίτιδας αδρανοποιώντας τον ιό, που είχαν καλλιεργήσει σε καλλιέργειες ιστών, με την χρήση φορμαλδεΰδης. Το εμβόλιο χορηγείται ενδομυϊκά και προστατεύει από τον ιό της Πολιομυελίτιδας, προκαλώντας την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού απέναντι του, χωρίς όμως να είναι μολυσματικός. Το 1961 κυκλοφόρησε και ένα άλλο είδος εμβολίου, από τον Sabin Albert. Το εμβόλιο αυτό περιέχει ζωντανό εξασθενημένο ιό και χορηγείται από το στόμα. Ύστερα από την κυκλοφορία των εμβολίων, ξεκίνησαν οι εκστρατείες εμβολιασμού σε πολλές χώρες. (Knipe & Howley, 2013) (WHO, 2004)

Ο ιός της Πολιομυελίτιδας είναι ο πρώτος ιός ζώων που κλωνοποιήθηκε πλήρως και έγινε αλληλούχισή του, ο πρώτος RNA ιός ζώων για τον οποίο κατασκευάστηκε μολυσματικός κλώνος και ο πρώτος ανθρώπινος ιός του οποίου η τρισδιάστατη δομή προσδιορίστηκε με την χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων X. Το 1989, ο Mendelsohn και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν τον CD155 ως τον υποδοχέα του ιού της Πολιομυελίτιδας. Ύστερα από αυτή την ανακάλυψη παράχθηκαν ποντίκια που έφεραν τον CD155 ως διαγονίδιο. (Knipe & Howley, 2013)

3. Ο ιός της Πολιομυελίτιδας

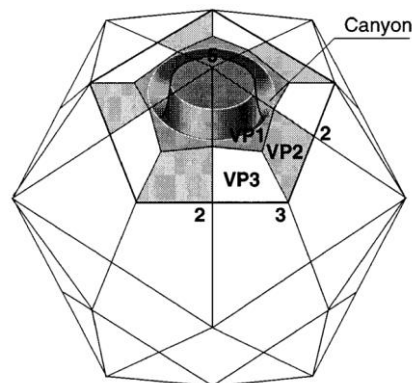
3.1 Δομή του ιού

Το γενετικό υλικό των ιών της Πολιομυελίτιδας περιβάλλεται από μη ελκτροφόρο πρωτεϊνικό καψίδιο με εικοσαεδρική συμμετρία και μήκος περίπου 28nm. Αποτελείται από 60 αντίγραφα των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών VP1-VP4, οι οποίες σχηματίζονται μετά την πρωτεόλυση της πρόδρομης πολυπρωτεΐνης P1. (Granoff & Webster, 1999) (Stanway, 1990) (WHO, 2004)

Αρχικά η P1 διασπάται στα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3 και VP1 τα οποία σχηματίζουν τα πρωτομερή. Στην συνέχεια, ενώνονται δημιουργώντας πενταμερή [(VP0,VP3,VP1)₅]. Δώδεκα από αυτά τα πενταμερή [(VP0,VP3,VP1)₅]₁₂ δημιουργούν το προκαψίδιο. Τέλος, η VP0 διασπάται πρωτεολυτικά στις πρωτεΐνες VP2 και VP4, έχοντας έτσι την ώριμη πια δομή του καψιδίου. (Granoff & Webster, 1999) (Stanway, 1990)

Τα πενταμερή συνδέονται με ασθενείς ομοιοπολικούς δεσμούς. Αυτό πιθανώς συμβαίνει για την ευκολότερη αποδιάταξη του καψιδίου και την απελευθέρωση του γενετικού υλικού των ιών της Πολιομυελίτιδας στο κύτταρο ξενιστή. Στο εσωτερικό κάθε πενταμερούς βρίσκεται ο άξονας 5x, ενώ μεταξύ των πενταμερών είναι οι άξονες 3x και 2x. (Knipe & Howley, 2013) (Granoff & Webster, 1999) (Rohll κ.ά., 1995)

Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του ορότυπου 1 του ιού της Πολιομυελίτιδας (PV1) πραγματοποιήθηκε το 1955 με την χρήση κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X και βοήθησε σημαντικά στην κατανόηση της δομής του. (WHO, 2004) (Hogle κ.ά., 1985)



Εικόνα 1 Σχηματική απεικόνιση του καψιδίου του ιού της Πολιομυελίτιδας (Blondel κ.ά., 1998)



Οι VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και έχουν παρόμοια τριτοταγή δομή, αν και διαφέρουν στην αλληλουχία των αμινοξέων τους. Αποτελούνται από ένα αντιπαράλληλο β-βαρέλι οκτώ κλώνων. Αυτοί οι κλώνοι συνδέονται μεταξύ τους με αμινοξικές θηλιές (loops) οι οποίες προεξέχουν από την επιφάνεια του καψιδίου και είναι χαρακτηριστικές για καθεμία από τις τρεις δομικές πρωτεΐνες. Οι θηλιές αυτές αποτελούν και τις αντιγονικές θέσεις του ιού. Έχουν αναγνωριστεί τέσσερις αντιγονικές θέσεις για τους ιούς της Πολιομυελίτιδας (N-AgI, N-AgII, AgIIIa, N-AgIIIb). (WHO, 2004) (Stanway, 1990)

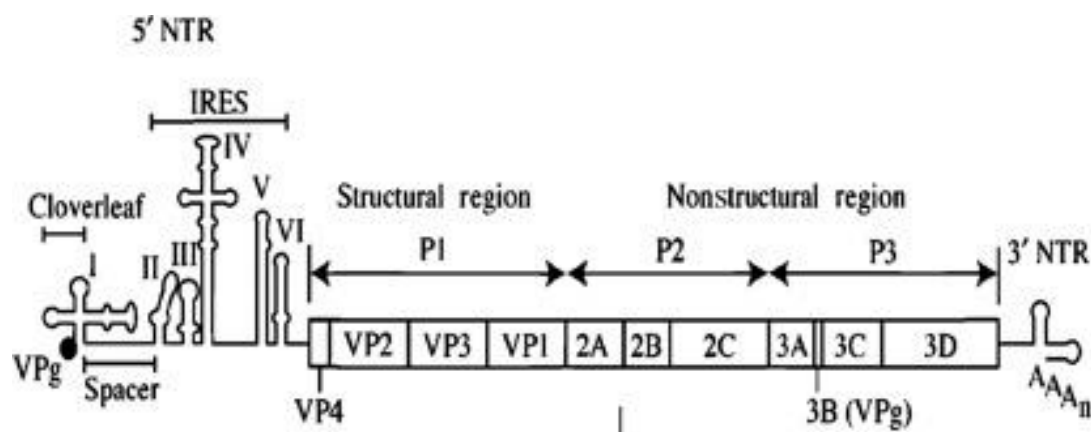
Η VP4 είναι η μικρότερη δομική πρωτεΐνη και βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, κάτω από τις υπόλοιπες τρεις. Η τρισδιάστατη διαμόρφωση της φαίνεται ότι είναι πιο χαλαρά καθορισμένη, συγκριτικά με τις άλλες δομικές πρωτεΐνες του ιού. Πιστεύεται ότι συμμετέχει στην σταθεροποίηση του καψιδίου του ιού λόγω της αλληλεπίδρασης του αμινοτελικού άκρου της με τις υπόλοιπες δομικές πρωτεΐνες ή με άλλους παράγοντες, όπως το μυριστικό οξύ. Συμβάλλει στην πρόσδεση του ιού με τον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή καθώς και στην απελευθέρωση του γενετικού του υλικού στον ξενιστή. (Stanway, 1990) (Hogle κ.ά., 1985)

Γύρω από τον άξονα 5x σχηματίζονται αυλακώσεις. Μεγάλης σημασίας είναι η βαθιά αυλάκωση (canyon) που παρατηρείται στο σημείο σύνδεσης των VP1 και VP3. Η αυλάκωση αυτή έχει πολύ μικρές διαστάσεις, έτσι δεν μπορεί να αναγνωριστεί από τα αντισώματα. Υποστηρίζεται ότι εκεί βρίσκεται η θέση πρόσδεσης του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα CD155. Επίσης, διαθέτει κατάλληλες περιοχές οι οποίες μπορούν να συνδεθούν με προεξοχές του υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή, επιτρέποντας έτσι την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Οι περιοχές αυτές παραμένουν φυλογενετικά αμετάβλητες, λόγω της εξειδικευμένης αλληλεπίδρασης τους με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Οι γενετικές περιοχές που δεν παρουσιάζουν λειτουργική σημασία για τον ιό υπόκεινται σε μεταλλάξεις στην περιφέρεια της αυλάκωσης, αποφεύγοντας έτσι την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή. (Stanway, 1990) (Filman κ.ά., 1989)

Επίσης, στο εσωτερικό της αυλάκωσης έχει βρεθεί υδρόφοβη εσοχή μέσα στην οποία υπάρχει η σφιγγοσίνη, μόριο που πιθανόν συμβάλλει στην πιο εύκολη απελευθέρωση του ιϊκού RNA στο ενδοκυττάριο περιβάλλον του ξενιστή με την ικανότητά του να ελέγχει τις δομικές αλλαγές του καψιδίου του ιού. (Filman κ.ά., 1989) (Hogle κ.ά., 1985)

3.1.1. Γονιδίωμα του ιού της Πολιομυελίτιδας

Το γενετικό υλικό των ιών της Πολιομυελίτιδας είναι μονόκλωνο RNA, θετικής πολικότητας και μήκους περίπου 7500 νουκλεοτιδίων. Το γονιδίωμα τους περιλαμβάνει τρεις κύριες περιοχές: την 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR), το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) και την 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR). Το 3'-άκρο του είναι πολυαδενυλιωμένο και το 5'-άκρο του συνδέεται ομοιοπολικά με την πρωτεΐνη VPg, η οποία φαίνεται ότι συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό του γενετικού υλικού του ιού και την συγκρότηση των ιικών σωματιδίων. Επίσης, οι συντηρημένες αυτές περιοχές έχουν χρησιμοποιηθεί ως στόχος για την δημιουργία εκκινητών για την μέθοδο ανίχνευσης αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). (Knipe & Howley, 2013)



Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος του ιού της Πολιομυελίτιδας (Gupta & Banerjee, 2019)

Η 5'μη κωδική περιοχή (5'UTR)

Η 5'UTR αποτελείται από 742 νουκλεοτίδια, εκπροσωπώντας το 8-12% του γενώματος του ιού της Πολιομυελίτιδας. Περιέχει πλήρως ή μερικώς συντηρημένα τμήματα δευτεροταγών δομών μεταξύ των 3 ορότυπων του ιού. Άρα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μετάφραση και αντιγραφή του ιού. Η 5'UTR αποτελείται από 7 δομικά στοιχεία (domain I-VII) και χωρίζεται σε 3 τμήματα: στη δομή σχήματος τριφυλλίου (cloverleaf, domain I), το IRES (domain II-VI) και το τμήμα που περιέχει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (AUG). (Siafakas κ.ά., 2000) (S P Tucker, 1993)

Το τμήμα cloverleaf, λόγω του σχήματος τριφυλλίου, συμβάλλει σημαντικά στην σταθερότητα του RNA και την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας. Αποτελείται από 88 νουκλεοτίδια που σχηματίζουν 4 δομές μίσχου-θηλιάς, A, B, C και D. (Knipe & Howley, 2013) (Herold & Andino, 2001) (Amero κ.ά., 2008)



Το IRES (Internal Ribosome Entry Site) αποτελείται από τα 5 δομικά στοιχεία II-VI της 5'UTR και έχει μήκος 400 νουκλεοτιδίων. Αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για την έναρξη της μετάφρασης και κατ'έκταση για την παθογένεια του ιού. Η μετάφραση διεγείρεται διότι στο εσωτερικό του IRES προσδένονται ριβοσώματα, παράγοντες της μετάφρασης και κυτταρικές πρωτεΐνες και μετακινούνται μέχρι το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. (Knipe & Howley, 2013) (Sharma κ.ά., 2004) (Kauder & Racaniello, 2004)

Σχετικά με το τελευταίο τμήμα της 5'UTR δεν είναι ακόμα γνωστή η ακριβής λειτουργία του, αλλά αποτελείται από πολλές τριπλέτες AUG πριν το σημείο έναρξης της μετάφρασης και περιέχει και το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. (Witwer κ.ά., 2001)

Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)

Το ιϊκό RNA κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη (P1) 247 kDa, η οποία αποτελείται από την δομική και την λειτουργική περιοχή. Η πολυπρωτεΐνη διασπάται πρωτεολιτικά και προκύπτουν 4 ώριμα πολυπεπτίδια, VP1 – VP4, 7 λειτουργικές πρωτεΐνες, 2A-2C και 3A-3D, καθώς και ενδιάμεσες πρωτεΐνες, VPO, 2BC, 3AB και 3CD. (Knipe & Howley, 2013)

Δομικές πρωτεΐνες

Το ιϊκό σωματίδιο είναι στρογγυλό και μικρό, περίπου 30 nm, αποτελείται από 60 πρωτομερή, οργανωμένα σε εικοσαεδρική συμμετρία, και το καθένα περιέχει ένα αντίγραφο για καθεμία από τις τέσσερις καψιδιακές πρωτεΐνες του (VP1 έως VP4). Σύμφωνα με την τρισδιάστατη δομή του ιού, η VP1 βρίσκεται εξ ολοκλήρου στην επιφάνεια του ιού, οι VP2 και VP3 βρίσκονται εν μέρει εκτεθειμένες στην επιφάνεια, ενώ η VP4 βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του ιού. (WHO, 2004) (Oberste κ.ά., 1999)

Η αλληλουχία της P1 σχετίζεται άμεσα με τον ορότυπο του ιού. Αυτό ισχύει ακόμα και για την αλληλουχία καθεμιάς από της δομικές πρωτεΐνες ξεχωριστά, με εξαίρεση την VP4. Μελέτες σε μοριακό επίπεδο έδειξαν ότι η αλληλουχία της VP1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των ορότυπων του ιού της Πολιομυελίτιδας. (Oberste κ.ά., 1999)

Λειτουργικές και ενδιάμεσες πρωτεΐνες

Οι λειτουργικές πρωτεΐνες καθώς και οι ενδιάμεσες λειτουργικές πρωτεΐνες συμβάλλουν στην αντιγραφή του ιού, στην επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης, στην αναστολή των κυτταρικών λειτουργιών, στη δημιουργία κυστιδίων και στη διαμόρφωση των κυτταρικών μεμβρανών. (Toyoda κ.ά., 1986)



Η πρωτεΐνη 2A (2A^{pro}) είναι πρωτεάση της κυστεΐνης. Υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς ανάμεσα στην τυροσίνη και τη γλυκίνη. Πραγματοποιεί το πρωταρχικό ρήγμα στην πολυπρωτεΐνη και έτσι διαχωρίζει τις δομικές από τις μη δομικές πρωτεΐνες. Σημαντικός είναι και ο ρόλος της στην αντιγραφή του ιού καθώς διεγείρει την έναρξη της σύνθεσης της αρνητικής αλυσίδας, αλλά δεν επιδρά καθόλου στην θετική αλυσίδα. Η 2A^{pro} προκαλεί αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου ξενιστή οδηγώντας εν τέλει στην ενεργοποίηση του μονοπατιού απόπτωσης μέσω της κασπάσης 3. Επίσης, βοηθάει στην σταθεροποίηση του ιϊκού RNA μέσα στο κύτταρο. Τροποποιεί πρωτεολυτικά μια κυτταρική πρωτεΐνη η οποία προσδένεται στο cloveleaf του RNA του ιού και αποτρέπει τις ριβονουκλεάσες να αποδομήσουν το RNA. (W G Dougherty, 1993) (Ivan Ventoso, 1998) (Calandria κ.ά., 2004)

Η πρωτεΐνη 2B είναι μικρή σε μέγεθος και διαθέτει μια υδρόφοβη περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της. Έτσι μπορεί να συνδέεται με κυτταρικές μεμβράνες του συμπλέγματος Golgi και του ενδοκυτταρικού δικτύου. Η 2B πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να αυξάνει την διαπερατότητα των μεμβρανών αυξάνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του Ca²⁺ και άλλων δισθενών ιόντων, οδηγώντας το κύτταρο στην απόπτωση. Άρα είναι πρωτεΐνη που συμβάλλει σημαντικά στην αντιγραφή του ιού. (Cuconati κ.ά., 1998) (Madan κ.ά., 2008)

Η πρωτεΐνη 2C είναι συντηρημένη σε μεγάλο βαθμό. Διαθέτει περιοχές πρόσδεσης του RNA σε μεμβράνες, γεγονός που εξυπηρετεί τη δημιουργία του συμπλόκου αντιγραφής και την σταθεροποίηση του RNA στις μεμβράνες του κυττάρου ξενιστή, όπου και πραγματοποιείται ο πολλαπλασιασμός του ιού. Η πρωτεΐνη 2C συμμετέχει στην έναρξη της αντιγραφής της αλυσίδας με αρνητική πολικότητα. Παρουσιάζει ιδιότητες ATPασης και GTPασης και έτσι συμμετέχει και στον σχηματισμό του κασιδίου. (Barton & Flanagan, 1997) (Pfister & Wimmer, 1999)

Η ενδιάμεση πρωτεΐνη 2BC είναι πρόδρομο μόριο των πρωτεϊνών 2B και 2C. Εντοπίζεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και αυξάνει τη διαπερατότητα των μεμβρανών. Προκαλεί την αναδιάταξη των μεμβρανών και τη δημιουργία κυστιδίων, μέσα στα οποία πραγματοποιείται η αντιγραφή του ιού. (Rust κ.ά., 2001)

Η πρωτεΐνη 3A αποτελεί μέρος του συμπλόκου αντιγραφής. Διαθέτει μία υδρόφοβη περιοχή και έτσι έχει την ικανότητα σύνδεσης με μεμβράνες και συμμετέχει στην σύνθεση της αλυσίδας θετικής πολικότητας. Επίσης, προκαλεί αλλαγές στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και δημιουργεί κυστίδια για την αντιγραφή του. (Kondratova κ.ά., 2005)

Η ενδιάμεση πρωτεΐνη 3AB αποτελεί μέλος του συμπλόκου αντιγραφής. Διεγείρει τη δράση της ιϊκής πολυμεράσης και την αυτοκατάλυση της πρόδρομης πρωτεΐνης 3CD



σε 3C και 3D. Σημαντικός είναι ο ρόλος της ως μόριο συνοδός (chaperone). Συγκεκριμένα, η 3AB διπλώνει το RNA του ιού στην ευνοϊκότερη, θερμοδυναμικά, διάταξη και ξεδιπλώνει σύνθετες δευτεροταγείς δομές RNA. Έτσι μπορεί να προσδεθεί η ιϊκή πολυμεράση και να διαχωρίσει τις αλυσίδες θετικής και αρνητικής πολικότητας κατά τη δημιουργία του αντιγραφικού ενδιαμέσου. (Richards & Ehrenfeld, 1998) (Marcotte κ.ά., 2007) (DeStefano & Titilope, 2006)

Η πρωτεΐνη 3B, ή αλλιώς VPg, είναι μικρή πρωτεΐνη που αποτελείται από 22 αμινοξέα. Βρίσκεται συνδεδεμένη ομοιοπολικά με το 5'-άκρο του ιϊκού RNA. Στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων εμφανίζεται με τη μορφή VPgpUpU, που χρησιμεύει ως εκκινητικό μόριο για την αντιγραφή του ιού. Η VPg συμμετέχει και στη δημιουργία του καψιδίου του ιού. (Murray κ.ά., 2004) (Aniko κ.ά., 1998) (Lyle κ.ά., 2002)

Η πρωτεΐνη 3C είναι πρωτεάση κυστεΐνης που υδρολύει τους πεπτιδικούς δεσμούς ανάμεσα στη γλουταμίνη και τη γλυκίνη. Αναστέλλει την κυτταρική μεταγραφή και μετάφραση. (Clark & Dasgupta, 1990)

Η ενδιαμέση πρωτεΐνη 3CD είναι πολύ δραστική πρωτεάση, αλλά δεν παρουσιάζει δραστικότητα πολυμεράσης. Σημαντική είναι η συμμετοχή της στην αντιγραφή του ιού. Οι ενέργειες της αφορούν τη δημιουργία κυστιδίων στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, την πρόσδεση στο cloveleaf και το CRE, διεγείροντας έτσι την αντιγραφή και ουριδιλίωση της VPg, αντίστοιχα, και τον τερματισμό της ιϊκής μετάφρασης σηματοδοτώντας έτσι την έναρξη της αντιγραφής του ιού. Η πρόδρομη 3CD εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου όπου και αυτοκαταλύεται στις πρωτεΐνες 3C και 3D. (Belon κ.ά., 2007) (Perera κ.ά., 2007)

Η πρωτεΐνη 3D (3D^{pol}) είναι RNA εξαρτώμενη πολυμεράση (RdRp) και αποτελεί το βασικό ένζυμο για την αντιγραφή του ιού. Χρησιμοποιεί την VPg ως εκκινητικό μόριο για να συνθέσει θετικής και αρνητικής πολικότητας RNA. Η 3D^{pol} παρουσιάζει δραστικότητα ελικάσης. Αυτό σημαίνει ότι έχει την ικανότητα να ξεδιπλώνει το RNA στα σημεία που έχει δημιουργηθεί διπλή έλικά κατά το στάδιο της επιμήκυνσης. Τέλος, προσθέτει την αδενυλιωμένη ουρά στο 3'-άκρο του RNA, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην ολοκλήρωση της σύνθεσης του RNA κλώνου θετικής πολικότητας. (Granoff & Webster, 1999)

Η 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR)

Η 3'UTR αποτελείται από 65 νουκλεοτίδια τα οποία σχηματίζουν δύο δευτεροταγείς δομικές περιοχές, τύπου μίσχος-θηλιά. Στο τέλος της 3'UTR υπάρχει μια πολυαδενυλική (poly(A)) ουρά, μήκους 60 νουκλεοτιδίων, και παίζει σημαντικό ρόλο



στην αντιγραφή του ιού. Επίσης, η 3'UTR αλληλεπιδρά με το IRES, γεγονός που φαίνεται ότι συμβάλλει στην ρύθμιση της ιϊκής μετάφρασης. (Rohll κ.ά., 1995)

3.1.2.1. Αντιγραφή του ιού

Το RNA του ιού αντιγράφεται σε μεμβρανώδη κυστίδια που δημιουργούνται στην επιφάνεια διάφορων οργανιδίων του κυττάρου ξενιστή. Η αντιγραφή του RNA πραγματοποιείται με την βοήθεια της πολυμεράσης 3D^{pol}. Ωστόσο συμμετέχουν και άλλες μη δομικές πρωτεΐνες καθώς και κυτταρικοί παράγοντες. Η αντιγραφή ξεκινάει με την σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας RNA, αρνητικής πολικότητας, η οποία χρησιμεύει ως εκμαγείο για την σύνθεση των νέων αλυσίδων RNA θετικής πολικότητας. (Blondel κ.ά., 2005)

Ο σχηματισμός των ιϊκών σωματιδίων συνδέεται με την σύνθεση του RNA. Οι VP0, VP1 και VP3 συσσωματώνονται για να σχηματίσουν μία πρόδρομη μορφή του ιϊκού σωματιδίου (provirion). Στην συνέχεια, τα ιοσωμάτια συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων με τη μορφή κρυσταλλικών εγκλεισμάτων. Αυτά απελευθερώνονται με την ρήξη κενοτοπίων στην κυτταρική επιφάνεια. Μαζική απελευθέρωση νεοσυντιθέμενων ιϊκών σωματιδίων πραγματοποιείται με την κυτταρική λύση. (Blondel κ.ά., 2005)

3.1.2.2. Μετάφραση του ιού

Με την είσοδο του γενετικού υλικού του ιού στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή ξεκινάει και η μετάφραση του. Αρχικά απομακρύνεται η πρωτεΐνη VPg από το 5'-άκρο από μία κυτταρική φωσφοδιεστεράση. Έτσι ξεκινάει η μετάφραση του ιϊκού RNA από τα ριβοσώματα του κυττάρου ξενιστή. Στην μετάφραση συμμετέχει το τμήμα IRES του ιού, το οποίο είναι απαραίτητο για την σωστή σύνδεση των ριβοσωμάτων. Το RNA του ιού της Πολιομυελίτιδας δεν διαθέτει καλύπτρα (cap). Άρα στην μετάφρασή του συμμετέχουν όλοι οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (eIFs) πλην του eIF4E ο οποίος μένει ανενεργός, αφού η δράση του αφορά την πρόσδεση στην καλύπτρα των ευκαριωτικών mRNAs. Στο 3'-άκρο του IRES βρίσκεται ένα συντηρημένο μοτίβο, το Y_n-X_m-AUG (όπου Y=πυριμιδίνη, n=6-8, X οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο και m=18-20), το οποίο παίζει καθοριστικό ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης. Η τριπλέτα AUG που υπάρχει στο μοτίβο δεν αποτελεί το πραγματικό κωδικόνιο έναρξης, βρίσκεται 100 περίπου βάσεις αριστερά από το πραγματικό και είναι σιωπηλό, οπότε βοηθάει το ριβόσωμα να αναγνωρίσει το πραγματικό κωδικόνιο έναρξης. (Gulevich κ.ά., 2001) (Prévôt κ.ά., 2003)



Ο παράγοντας eIFGI προσδένεται στο ιϊκό RNA θετικής πολικότητας, έτσι ώστε να διαμορφωθεί το σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης, eIF4. Οι παράγοντες eIF4A και eIF4B αλληλεπιδρούν με παράγοντες προσκολλημένους στη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος και αποτελούν μέρος του συμπλόκου. Έτσι δημιουργείται το 48S ριβοσωμικό σύμπλοκο. Κινείται με κατεύθυνση 5'→3' μέχρι να συναντήσει το πραγματικό κωδικόνιο έναρξης AUG. (Prénôt κ.ά., 2003) (Granoff & Webster, 1999)

Με τη μετάφραση του ιού παράγεται η μεγάλη πολυπρωτεΐνη, η οποία επεξεργάζεται τόσο κατά την μετάφραση όσο και ύστερα από την μετάφραση από τις πρωτεάσες 3C, 3CD και 2A. Έτσι απελευθερώνονται οι δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις πρωτεολυτικές διαδικασίες, την σύνθεση του RNA, τις βιοχημικές και δομικές αλλαγές που πραγματοποιούνται στο κύτταρο που έχει μολυνθεί. (Blondel κ.ά., 2005)



3.1.3 Χαρακτηριστικά του ιού της Πολιομυελίτιδας

Η λοίμωξη από τον ιό της Πολιομυελίτιδας χαρακτηρίζεται από ήπια συμπτωματολογία, ωστόσο μπορεί να προκαλέσει από ήπιο πυρετό μέχρι και σοβαρές καταστάσεις σε διάφορα όργανα, όπως η καρδιά, το συκώτι και το κεντρικό νευρικό σύστημα. (Knipe & Howley, 2013) (Javier, 2016) (WHO, 2004)

Η πυκνότητα άνωσης των ιϊκών σωματιδίων είναι 1,34 g/ml σε χλωριούχο καΐσιο, ενώ ο συντελεστής καθίζησης είναι περίπου 156S. Τα μολυσματικά ιϊκά σωματίδια παρουσιάζουν σχετική ανθεκτικότητα στην θερμότητα, όταν σταθεροποιούνται από κατιόντα μαγνησίου, παραμένουν σταθερά για εβδομάδες στους 4°C και για μερικές μέρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ανθεκτικά φαίνεται ότι είναι σε πολλά κοινά απορρυπαντικά και απολυμαντικά, όπως το κοινό σαπούνι, το χλωροφόρμιο, η ισοπροπανόλη, 70% αιθανόλη κτλ, καθώς και στο όξινο pH (pH 3-5 για 3 ώρες). Ωστόσο, η ξήρανση, υπεριώδης ακτινοβολία, φορμαλδεΰδη, το ελεύθερο χλώριο και οι υψηλές θερμοκρασίες προκαλούν αδρανοποίηση του ιού. Η σχετική ευαισθησία του ιού στις υψηλές θερμοκρασίες κάνει δυνατή την χρήση παστερίωσης σε πολλά βιολογικά ενεργά παρασκευάσματα. Η αποτελεσματικότητα της ξήρανσης εξαρτάται από το πορώδες της επιφάνειας και από την παρουσία οργανικών ενώσεων. (Knipe & Howley, 2013) (Zell κ.ά., 2017) (WHO, 2004)

Οι ιοί της Πολιομυελίτιδας και οι εντεροϊοί διακρίνονται από τους υπόλοιπους ιούς λόγω των φυσικών ιδιοτήτων τους, όπως η πυκνότητα άνωσης σε χλωριούχο καΐσιο και η σταθερότητα σε ασθενές οξύ. Η παθολογία που σχετίζεται με τον εντερικό σωλήνα, η μετάδοση καθώς και η επιδημιολογία συνδέονται άμεσα με τις βιοφυσικές ιδιότητες και τον κυτταρολυτικό κύκλο ζωής του ιού. (Javier, 2016) (WHO, 2004) (Brown κ.ά., 2003)

Οι 3 ορότυποι του ιού της Πολιομυελίτιδας διακρίνονται από τους άλλους ιούς του γένους *Enterovirus* με την εξουδετέρωση με ειδικούς, για κάθε ορότυπο, αντιορούς και την τάση να προκαλέσουν παραλυτική νόσο. Το στέλεχος Mahoney αποτελεί τον ορότυπο 1 του ιού της Πολιομυελίτιδας. Είναι ένας από τους περισσότερο μελετημένους και καλύτερα χαρακτηρισμένους παράγοντες που σχετίζονται με νόσο του ανθρώπου. Το γονιδιώμά του ήταν το πρώτο της οικογένειας *Picornaviridae* του οποίου η αλληλουχία προσδιορίστηκε πλήρως. (Javier, 2016) (WHO, 2004)



3.1.4 Στελέχη του ιού της Πολιομυελίτιδας

Υπάρχουν 3 ορότυποι του ιού, PV1, PV2, PV3, καθένας από του οποίους χωρίζεται σε 3 ακόμα κατηγορίες ανάλογα με την διαφοροποίηση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VP1. Η σύγκριση γίνεται με βάση την αλληλουχία των εμβολιακών στελεχών. Άρα οι περαιτέρω κατηγορίες είναι οι εξής:

- i. Ιοί τύπου OPV ή Sabin (OPV-like or Sabin-like viruses): απόκλιση <1% για τους ορότυπους 1 και 3, <0,6% για τον ορότυπο 2
- ii. Ιοί που προέρχονται από εμβόλια (Vaccine Derived PVs – VDPVs): απόκλιση 1-15% για τους ορότυπους 1 και 3, 0,6-15% για τον ορότυπο 2
- iii. Άγρια στελέχη του ιού (Wild PVs – WPVs): απόκλιση >15% (Javier, 2016) (Njile κ.ά., 2019)

Ο ορότυπος 2 του αρχικού στελέχους έχει εξαλειφθεί από τον Σεπτέμβριο του 2015, με τελευταία ανίχνευση του στην Ινδία το 1999. Ο ορότυπος 3 του αρχικού στελέχους έχει εξαλειφθεί από τον Οκτώβριο του 2019, με τελευταία παρουσία του το 2012. Ο ορότυπος 1 του αρχικού στελέχους, ή αλλιώς Mahoney, εξακολουθεί να κυκλοφορεί. (CDC, 2023b)

Εμβολιακά στελέχη του ιού της Πολιομυελίτιδας

Τα στελέχη που περιέχονται στο εμβόλιο OPV παρουσιάζουν γενετικές διαφοροποιήσεις, συγκριτικά με τα αρχικά στελέχη, που αφορούν την εξασθένηση της μολυσματικότητας στο ΚΝΣ. Τα εμβολιακά αυτά στελέχη μπορούν να μεταλλαχθούν κατά τον πολλαπλασιασμό τους στον εντερικό σωλήνα. Οι μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν στην ανάκτηση της ικανότητας για υψηλή μολυσματικότητα στο ΚΝΣ. Αποτέλεσμα μπορεί να είναι η παραλυτική Πολιομυελίτιδα που σχετίζεται με το εμβόλιο (Vaccine-Associated Paralytic Poliomyelitis-VAPP). Βέβαια πρόκειται για ένα σπάνιο φαινόμενο που παρατηρείται περίπου σε 1 στα 2.500.000 εμβολιασμένους. (WHO, 2004)

Τα περισσότερα στελέχη που απομονώνονται από εμβολιασμένα άτομα με OPV δεν παρουσιάζουν παραλυτικά φαινόμενα. Κατά κανόνα, όλα τα στελέχη που απομονώνονται από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα και σχετίζονται με το εμβόλιο OPV χαρακτηρίζονται ως στελέχη προερχόμενα από εμβολιακά στελέχη (VDPVs). Ωστόσο χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. (WHO, 2004)

- OPV-like viruses

Τα περισσότερα στελέχη που απομονώνονται και σχετίζονται με το OPV εμβόλιο ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία. Η ομοιότητα τους με το αρχικό στέλεχος του



εμβολίου ξεπερνάει το 99%. Η ομοιότητα αφορά την αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VP1. Άτομα με φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα αποβάλλουν τον ιό για περίπου 3-4 εβδομάδες. (WHO, 2004)

- Vaccine-derived Polioviruses (VDPVs)

Αυτά τα στελέχη παρουσιάζουν ομοιότητα στην αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VP1 85-99% με την αλληλουχία του πρότυπου στελέχους του εμβολίου ενώ παρουσιάζουν και παρατεταμένες περιόδους πολλαπλασιασμού. Τα στελέχη αυτής της κατηγορίας χωρίζονται σε 3 υποκατηγορίες. (WHO, 2023f)

- Σχετιζόμενα με ανοσοανεπάρκεια VDPVs (iVDPVs)

Έχει παρατηρηθεί παρατεταμένη αντιγραφή των εμβολιακών στελεχών σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια των B κυττάρων. Τα πρώτα στελέχη iVDPVs απομονώθηκαν από ασθενείς είτε με κοινή μεταβλητή ανοσοανεπάρκεια (common variable immunodeficiency) είτε με X-συνδεδεμένη αγαμμασφαιριναιμία (X-linked agammaglobulinemia). Κάποια στελέχη αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν περίπου 90% ομοιότητα στην αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VP1 με αυτή του αρχικού στελέχους του εμβολίου OPV, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει η πιθανότητα χρόνιας λοίμωξης για 10 ή και περισσότερα χρόνια. Η έλλειψη προσυμπτωματικού ελέγχου σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια μπορεί να ευθύνεται για την αδυναμία ανίχνευσης και άλλων τέτοιων περιστατικών. Το φαινόμενο των iVDPVs είναι πολύ σπάνιο και συχνά η λοίμωξη μπορεί να οδηγήσει σε παράλυση ή και θάνατο. Έχουν σημειωθεί μόνο 149 περιστατικά από το 1961 και τα περισσότερα καταγράφηκαν στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου, ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις μετάδοσης αυτών των στελεχών από χρόνια μολυσμένα άτομα στην κοινότητα. (GPEI, 2023g) (WHO, 2004) (Macklin, 2020)

- Κυκλοφορούντα VDPVs (cVDPVs)

Την περίοδο 2000-2001 υπήρξαν 21 επιβεβαιωμένα κρούσματα, εκ των οποίων και 2 θάνατοι, που σχετίζονταν με cVDPV τύπου 1 στο νησί Ισπανιόλα της Καραϊβικής. Τα δύο πρώτα στελέχη που απομονώθηκαν είχαν ομοιότητα αλληλουχίας του γονιδίου της VP1 πρωτεΐνης 97-98% με την αντίστοιχη του αρχικού στελέχους του εμβολίου OPV. Το στοιχείο αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι η μετάδοση των VDPVs είναι πιθανή. Λιγότερα κρούσματα ανιχνεύτηκαν στις Φιλιππίνες (cVDPV1) το 2001 και στη Μαδαγασκάρη (cVDPV2) το 2002. Μεταγενέστερα ευρήματα έδειξαν ότι υπήρχαν κρούσματα από στελέχη VDPVs τύπου 2 στην Αίγυπτο την δεκαετία του 1980 μέχρι τις αρχές του 1990. Η χαμηλή εμβολιαστική κάλυψη με το OPV εμβόλιο και η απουσία κυκλοφορίας του αντίστοιχου άγριου στελέχους του ιού της Πολιομυελίτιδας φαίνεται ότι σχετίζεται με την παρουσία κρουσμάτων. Άλλοι



παράγοντες που αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης κρουσμάτων αυτής της κατηγορίας είναι ο συγχρωτισμός, οι κακές συνθήκες υγιεινής, τα υψηλά επίπεδα γεννήσεων και το τροπικό κλίμα, όπως και στα άγρια στελέχη. (WHO, 2004)

Στελέχη απομονώθηκαν από τις εξάρσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω και βρέθηκε ότι όλα ήταν ανασυνδυασμένα με άλλα είδη *Enterovirus C*. Η παρατήρηση αυτή δεν σημαίνει ότι ο ανασυνδυασμός είναι απαραίτητος για την φαινοτυπική αλλαγή του OPV. Ο ανασυνδυασμός του ιού της Πολιομυελίτιδας με άλλους εντεροϊούς είναι αποτέλεσμα συνλοιμώξεων. Οι ιοί της Πολιομυελίτιδας που κυκλοφορούν στην κοινότητα θα ανασυνδυαστούν κάποια στιγμή με άλλους εντεροϊούς του ίδιου είδους. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη κυκλοφορίας του ιού και όχι αυξημένη ικανότητα μετάδοσης του από άτομο σε άτομο. (WHO, 2004)

- Ασαφή VDPVs (aVDPVs)

Πρόκειται για περιστατικά Πολιομυελίτιδας των οποίων η πηγή είναι άγνωστη. Στελέχη που απομονώνονται από άτομα χωρίς κάποια ανοσοανεπάρκεια και δεν υπάρχει απόδειξη κυκλοφορίας τους στην κοινότητα ή στα λύματα δεν μπορούν να συσχετιστούν γενετικά με κάποιο άλλο στέλεχος VDPV, οπότε χαρακτηρίζονται ως ασαφή VDPVs. (WHO, 2004) (Macklin, 2020)



4. Μετάδοση του ιού της Πολιομυελίτιδας

Ο ιός της Πολιομυελίτιδας μεταδίδεται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού, μέσω μολυσμένων φαγητών, νερού και αντικειμένων. Ο πολλαπλασιασμός του ιού πραγματοποιείται στον στοματοφάρυγγα και στα τοιχώματα του εντέρου και αποβάλλεται από τα κόπρανα για μεγάλο χρονικό διάστημα, 4-6 εβδομάδες. Ο ιός μπορεί επίσης να βρεθεί σε δείγματα σιέλου και ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα. (Njile κ.ά., 2019) (Louten, 2016)

Οι κακές συνθήκες υγιεινής και απολύμανσης αυξάνουν τις πιθανότητες μετάδοσης και μόλυνσης, καθώς και οι πολυπληθείς χώροι. Η μετάδοση του ιού μέσω σταγονιδίων είναι πιο πιθανή στις ανεπτυγμένες χώρες, όπου οι συνθήκες υγιεινής είναι καλύτερες. Το 99% των λοιμώξεων από τον ιό είναι ασυμπτωματικές, ενώ μόνο το 1% εμφανίζουν συμπτώματα. Τα άτομα που έχουν μολυνθεί από τον ιό της Πολιομυελίτιδας είναι πιο μεταδοτικά τις ημέρες ακριβώς πριν και μετά από την έναρξη των συμπτωμάτων. (Njile κ.ά., 2019) (Louten, 2016) (CDC, 2023a)

Ο άνθρωπος είναι ο μόνος φυσικός ξενιστής του ιού. Ωστόσο, μπορεί να μεταφερθεί σε μαϊμούδες άμα ενοφθαλμιστεί απευθείας στο ΚΝΣ. Η ειδικότητα αυτή του ιού στο είδος οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο μόριο της επιφάνειας του κυττάρου που χρησιμεύει ως υποδοχέας του ιού (Poliovirus Receptor-PVR). Διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν το γονίδιο για τον υποδοχέα PVR, CD155, παρουσιάζουν ευαισθησία στην μόλυνση από τον ιό της Πολιομυελίτιδας, αν και τα ποντίκια δεν είναι ευαίσθητα στον ιό. (Freistadt & Racaniello, 1991) (WHO, 2004)

Η κοπρανο-στοματική οδός αποτελεί την κύρια πηγή μετάδοσης του ιού της Πολιομυελίτιδας. Ο ιός πολλαπλασιάζεται στον εντερικό σωλήνα απ' όπου αποβάλλεται τυπικά για 2-4 εβδομάδες αλλά μπορεί να διαρκέσει και περισσότερο. Η διάρκεια απέκκρισης καθώς και η ποσότητα του ιού που αποβάλλεται επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η ανοσολογική κατάσταση του ατόμου. Προηγούμενη νόσηση με άγριο στέλεχος και ο εμβολιασμός με το OPV μειώνει σημαντικά και τη διάρκεια και την ποσότητα απέκκρισης του ιού από τα κόπρανα. Αυτήν την επίδραση, σε λιγότερο βαθμό βέβαια, φαίνεται ότι έχει και ο εμβολιασμός με το ενισχυμένο IPV καθώς και οι ανταγωνιστικές εντερικές λοιμώξεις. (WHO, 2004)

Ο συγχρωτισμός, οι συνθήκες υγιεινής, η ποιότητα του νερού και οι εγκαταστάσεις διαχείρισης λυμάτων αποτελούν παράγοντες που συμβάλουν στην μετάδοση του PV. Ο ιός πολλαπλασιάζεται και στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα. Αυτό σημαίνει ότι ο ιός μπορεί να μεταδοθεί και μέσω των αερολυμάτων. Στα αρχικά στάδια της λοίμωξης ο ιός μπορεί να βρεθεί σε επιχρίσματα από τον φάρυγγα καθώς και από



πλύσεις. Άρα η μετάδοση του ιού από άτομο σε άτομο, μέσω αερολυμάτων είναι πιθανή. (WHO, 2004)

Η κυκλοφορία των άγριων στελεχών του ιού της Πολιομυελίτιδας παρουσιάζει εποχική διακύμανση που σχετίζεται με την γεωγραφική περιοχή. Σε τροπικές και ημιτροπικές περιοχές η κυκλοφορία του παρατηρείται καθόλη τη διάρκεια του χρόνου και συχνά συσχετίζεται με τις περιόδους των βροχοπτώσεων. Στις εύκρατες ζώνες, πριν την έναρξη των εμβολιασμών, ο ιός κυκλοφορούσε περισσότερο το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, αν και κρούσματα παρατηρούνταν όλο τον χρόνο. (WHO, 2004)

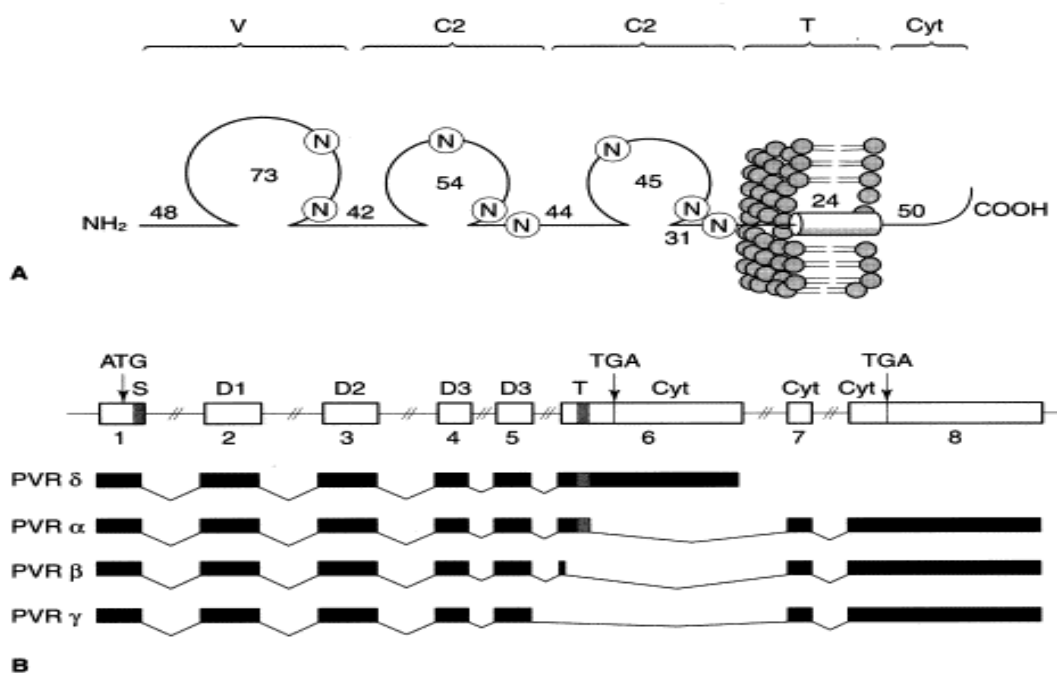


5. Παθογένεια

Ο κύκλος ζωής του ιού της Πολιομυελίτιδας στο κύτταρο ξενιστή ξεκινάει με την πρόσδεση του ιϊκού σωματιδίου στον υποδοχέα. Ο CD155, ή αλλιώς human Poliovirus Receptor (hPVR), είναι ο υποδοχέας όλων των ορότυπων του ιού της Πολιομυελίτιδας. Εκφράζεται στην επιφάνεια του εντερικού επιθηλίου και στα Μ κύτταρα των πλακών του Peyer, γεγονός που μπορεί να διευκολύνει την είσοδο του ιού στις πλάκες του Peyer με επακόλουθο τη λοίμωξη του εντερικού επιθηλίου. (Freistadt & Racaniello, 1991) (Selinka κ.ά., 1991) (Racaniello, 1996) (Mendelsohn κ.ά., 1989)

Πρόκειται για μια γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 80 KDa που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Το πολυπεπτίδιο του CD155 αποτελείται από μία N-τελική αλληλουχία, τρεις εξωκυτταρικές περιοχές με δομή ανοσοσφαιρίνης, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική ουρά. Οι εξωκυτταρικές περιοχές είναι η D1, D2 και D3. Η D1 αποτελεί την θέση πρόσδεσης των ιών της Πολιομυελίτιδας και η δομή της μοιάζει με τη μεταβλητή περιοχή των ανοσοσφαιρινών. Οι D2 και D3 δρουν ενισχυτικά στην αλληλεπίδραση της D1 με τον ιό και η δομή του μοιάζει με την σταθερή δομή των ανοσοσφαιρινών. (Freistadt & Racaniello, 1991) (Selinka κ.ά., 1991) (Racaniello, 1996) (Mendelsohn κ.ά., 1989)

Το γονίδιο του CD155 κωδικοποιεί τέσσερεις ισομορφές του υποδοχέα. Οι CD155α και CD155δ βρίσκονται προσκολλημένες στη μεμβράνη του κυττάρου και αποτελούν τους υποδοχείς του ιού, ενώ οι άλλες δύο, CD155β και CD155γ, θεωρούνται υδρόφιλες και θερμοδυναμικά σταθερές εκκρινόμενες μορφές. (Freistadt & Racaniello, 1991) (Selinka κ.ά., 1991) (Racaniello, 1996)



Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση του υποδοχέα CD155 (Pfister κ.ά., 1999)

Ο ιός της Πολιομυελίτιδας προσδένεται στον CD155 με την βοήθεια της αύλακας, που βρίσκεται στο καψίδιο. Συγκεκριμένα η αύλακα περιέχει την σφιγγοσίνη, μόριο υπεύθυνο για την αποσταθεροποίηση του καψιδίου του ιού. Η πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα αλλάζει την στερεοδιάταξη του καψιδίου του ιού. Τα ιϊκά σωμάτια που προκύπτουν λέγονται σωμάτια A και έχουν συντελεστή καθίζησης 135S, ενώ το αρχικό ιϊκό σωμάτιο έχει συντελεστή καθίζησης 160S. Τα ιϊκά σωμάτια A στερούνται της VP4 πρωτεΐνης και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε πρωτεάσες. (Granoff & Webster, 1999) (Harber κ.ά., 1995) (Fricks & Hogle, 1990) (Bubeck κ.ά., 2005)

Με την πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα η VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 κινούνται από το εσωτερικό του ιού προς την εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, κάνοντας το έτσι υδρόφοβο. Στην συνέχεια, το N-τελικό άκρο της VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 προσδένονται στις λιποσωμικές μεμβράνες των κυττάρων ξενιστών, δημιουργώντας πόρους-κανάλια, μέσω των οποίων εισέρχεται το γενετικό υλικό του ιού στο κύτταρο. Το εναπομείναν καψίδιο, μετά την απελευθέρωση του RNA, έχει συντελεστή καθίζησης 80S. (Granoff & Webster, 1999) (Harber κ.ά., 1995) (Fricks & Hogle, 1990) (Bubeck κ.ά., 2005)

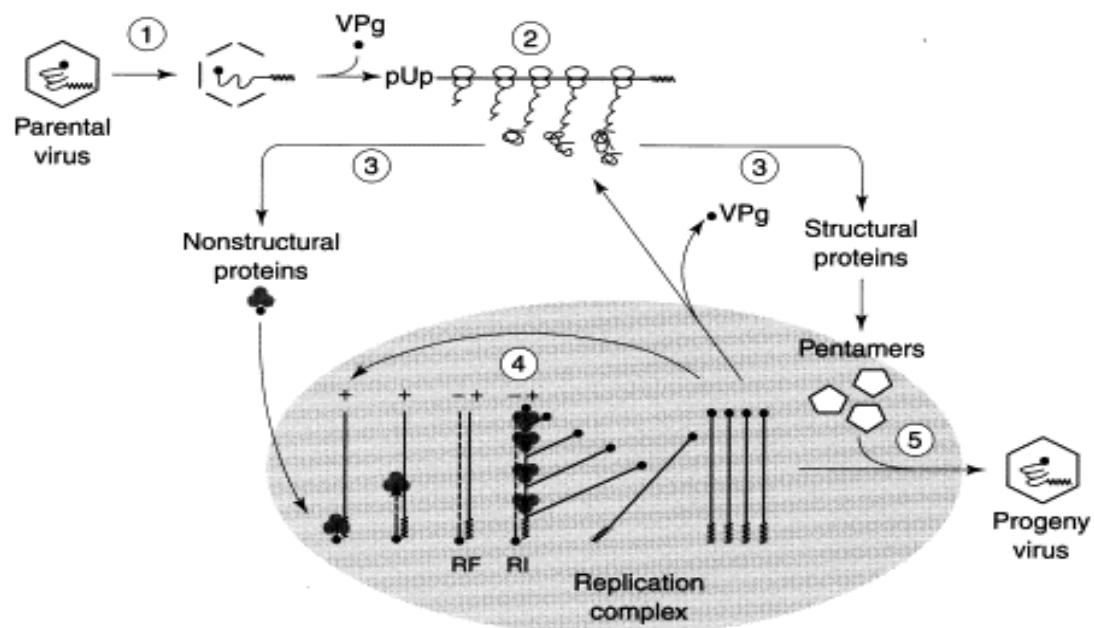


Ο υποδοχέας CD155 εκφράζεται από όλους τους κυτταρικούς τύπους του ανθρώπου. Ωστόσο, εξαιτίας του τροπισμού του, ο ιός της Πολιομυελίτιδας δεν μπορεί να μολύνει όλους τους ιστούς. (Granoff & Webster, 1999)

Ο ιός εισέρχεται μέσω του στόματος και πολλαπλασιάζεται στον στοματοφάρυγγα και στο βλεννογόνο του εντέρου, τις πλάκες Peyer και τις αμυγδαλές. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστό σε ποια κύτταρα πραγματοποιείται ο αρχικός πολλαπλασιασμός. Ο ιός, στην συνέχεια, εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω των υποτιθέμενων φραγμών που διασχίζουν πιο αποτελεσματικά τα μολυσματικά στελέχη του ιού της Πολιομυελίτιδας, απ' ό,τι τα εξασθενημένα. Στο στάδιο αυτό παρατηρείται παραγωγή αντισωμάτων, ειδικών για τον αντίστοιχο ορότυπο του ιού. Λόγω της αιμίας, ο ιός μπορεί να εισβάλει στο ΚΝΣ και να πολλαπλασιαστεί στους κινητικούς νευρώνες. Υπάρχουν δύο πιθανές οδοί για την είσοδο του ιού στο ΚΝΣ. Η πρώτη είναι η διείσδυση του ιού μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Blood-Brain Barrier-BBB). Η δεύτερη είναι η μετάδοση του ιού μέσω των περιφερικών νευρών. Ο ιός μπορεί να προκαλέσει καταστροφές στους κινητικούς νευρώνες του πρόσθιου κέρατος του νωτιαίου μυελού και των εγκεφαλικών βλαστοκυττάρων, οδηγώντας εν τέλει σε παράλυση. Η καταστροφή των νευρώνων συνοδεύεται με φλεγμονώδεις βλάβες. Παρατηρείται αύξηση των πολυμορφοπύρηνων, λευκοκυττάρων, λεμφοκυττάρων και μακροφάγων που κατανέμονται σε όλη την φαιά ουσία του πρόσθιου κέρατος του νωτιαίου μυελού. (Javier, 2016) (CDC, 2023a) (Blondel κ.ά., 2005)

Ο ιός ανιχνεύεται στις ρινοφαρυγγικές εκκρίσεις για 1-2 εβδομάδες ενώ αποβάλλεται από τα κόπρανα για αρκετές εβδομάδες ακόμα και από άτομα με ήπια συμπτώματα ή και ασυμπτωματικά. (WHO, 2004) (CDC, 2023a)

Κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού στον εντερικό σωλήνα ο ιός εισβάλλει στον τοπικό λεμφικό ιστό. Από εκεί μπορεί να εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλώντας αιμία, και να προσβάλλει τα κύτταρα του ΚΝΣ. Ωστόσο, η αιμία μπορεί να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά μέσω της χυμικής ανοσίας. (Javier, 2016) (CDC, 2023a) (Blondel κ.ά., 2005)



Εικόνα 4 Ο κύκλος ζωής του ιού της Πολιομυελίτιδας (Pfister κ.ά., 1999)



6. Κλινικά συμπτώματα

Ο ιός της Πολιομυελίτιδας συνήθως προκαλεί ήπια συμπτωματολογία, ωστόσο μπορεί να οδηγήσει και σε σοβαρές καταστάσεις. Η περίοδος επώασης για τη μη παραλυτική νόσο είναι 3-6 ημέρες, ενώ για την παραλυτική νόσο κυμαίνεται μεταξύ 7-21 ημέρες. Ο κίνδυνος σοβαρής νόσου και θανάτου από πρωτογενή μόλυνση με τον ιό της Πολιομυελίτιδας αυξάνεται με την ηλικία. (CDC, 2023a)

Το 70% περίπου των μολύνσεων από τον ιό της Πολιομυελίτιδας είναι ασυμπτωματικές. Ακόμα και τα ασυμπτωματικά άτομα αποβάλλουν τον ιό από τα κόπρανα και μπορούν να τον μεταδώσουν σε άλλους. Το 24% περίπου των μολύνσεων παρουσιάζει ήπια συμπτωματολογία, όπως χαμηλός πυρετός, βήχας και πονόλαιμος ενώ τα άτομα αναρρώνουν εντός μιας εβδομάδας και χαρακτηρίζεται ως αποτυχημένη Πολιομυελίτιδα (abortive Poliomyelitis). Μη παραλυτική άσηπτη μηνιγγίτιδα, φλεγμονή του εγκεφάλου και των μηνίγγων, προκαλείται στο 1-5% των ατόμων που μολύνονται. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν δυσκαμψία του λαιμού, της πλάτης ή και των κάτω άκρων ύστερα από κάποιες ημέρες με ήπια συμπτωματολογία. Σοβαρότερα συμπτώματα, όπως πόνος του λαιμού, της πλάτης ή των ποδιών, πονοκέφαλος και εμετοί μπορούν να εμφανιστούν. Συνήθως τα συμπτώματα υποχωρούν ύστερα από 2-10 ημέρες. (CDC, 2023a) (Louten, 2016)

Λιγότερο από 1% των συνολικών μολύνσεων οδηγεί σε παράλυση. Αρχικά εμφανίζονται ήπια συμπτώματα ίωσης που διαρκούν μερικές μέρες, ακολουθούν 1-3 ημέρες χωρίς συμπτώματα και τέλος ξεκινάει η παράλυση με πυρετό, μυϊκούς πόνους και σπασμούς στα άκρα ή την πλάτη. Η παράλυση, η οποία χαρακτηρίζεται ως οξεία χαλαρή παράλυση (AFP), συνήθως προχωράει μέσα σε 2-3 ημέρες. Είναι ασύμμετρη, με μειωμένα εν το βάθει αντανακλαστικά του τένοντα, ενώ η αίσθηση δεν επηρεάζεται. Χωρίς την ικανότητα κίνησης, οι μύες ατροφούν. Η παράλυση επηρεάζει συνήθως τα πόδια απ' ότι τα χέρια. Γνωστικές επιπλοκές δεν παρατηρούνται. Οι έφηβοι και ενήλικες βιώνουν πιο σοβαρό πόνο και παράλυση συγκριτικά με τα παιδιά, ενώ δεν παρουσιάζουν τα πρωταρχικά ήπια συμπτώματα. (CDC, 2023a) (Louten, 2016)

Η παράλυση συχνά είναι μόνιμη. Η αντιστάθμιση των λειτουργιών από τους μύες που δεν έχουν επηρεαστεί μπορεί να οδηγήσει σε μερική ή ολική ανάρρωση. Αδυναμία ή παράλυση που παραμένει 12 μήνες μετά την έναρξη της είναι μόνιμη και συμβαίνει στα 2/3 των ασθενών. Η παραλυτική Πολιομυελίτιδα χωρίζεται σε 3 κατηγορίες ανάλογα με την εξέλιξη της παράλυσης και τα όργανα που επηρεάζει. Η σπονδυλική Πολιομυελίτιδα είναι η πιο συχνή μορφή. Χαρακτηρίζεται από ασύμμετρη παράλυση που αφορά κυρίως τα κάτω άκρα αλλά μπορεί να περιλαμβάνει την πλάτη και τον αυχένα. Η βολβική Πολιομυελίτιδα είναι αποτέλεσμα της καταστροφής του



προμήκους μυελού, όπου υπάρχουν νεύρα που ελέγχουν τους μύες που συμμετέχουν στην κατάποση και την αναπνοή. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν αδυναμία στους μύες του προσώπου, στοματοφάρυγγα και του αναπνευστικού συστήματος που νευρώνονται από τους κρανιακούς νευρώνες. Η τρίτη μορφή είναι η βολβονωτιαία Πολιομυελίτιδα, η οποία αποτελεί συνδυασμό των δύο παραπάνω μορφών. (CDC, 2023a) (Louten, 2016)

Η θνησιμότητα για την παραλυτική νόσο της Πολιομυελίτιδας κυμαίνεται μεταξύ 2-5% για τα παιδιά και 15-30% για τους έφηβους και ενήλικες. Το ποσοστό ανεβαίνει στο 25-75% αν εξελιχθεί σε βολβική Πολιομυελίτιδα. (CDC, 2023a)

Παραλυτική νόσος μπορεί να προκληθεί από άγρια στελέχη του ιού, από τα εμβολιακά στελέχη που περιέχει το εμβόλιο OPV σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις, και από τα VDPVs. (CDC, 2023a)

Το 25-40% των ατόμων τα οποία ως παιδιά έπασχαν από παραλυτική Πολιομυελίτιδα μπορεί να βιώσει μυϊκούς πόνους, επιδείνωση μιας υπάρχουσας μυϊκής αδυναμίας ή εμφάνιση νέας αδυναμίας ή παράλυσης, μετά από 15-40 χρόνια. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται post-polio σύνδρομο (PPS) και είναι κατάσταση κατά την οποία τα άτομα δεν είναι μεταδοτικά και δεν απεκκρίνουν τον ιό. Η αιτία του PPS είναι άγνωστη. Ωστόσο υπάρχουν υποθέσεις που υποστηρίζουν ότι προκαλείται από την μείωση της λειτουργίας των νευρώνων που συμμετέχουν στην αντιστάθμιση των λειτουργιών των ήδη κατεστραμμένων νευρώνων. Το PPS είναι συνήθως ακίνδυνο. Ωστόσο αν στην πρωταρχική λοίμωξη επηρεάστηκαν νευρώνες του προμήκους μυελού τότε η αναπνοή ή η κατάποση μπορεί να επηρεαστούν αρνητικά. (CDC, 2023a) (Louten, 2016)



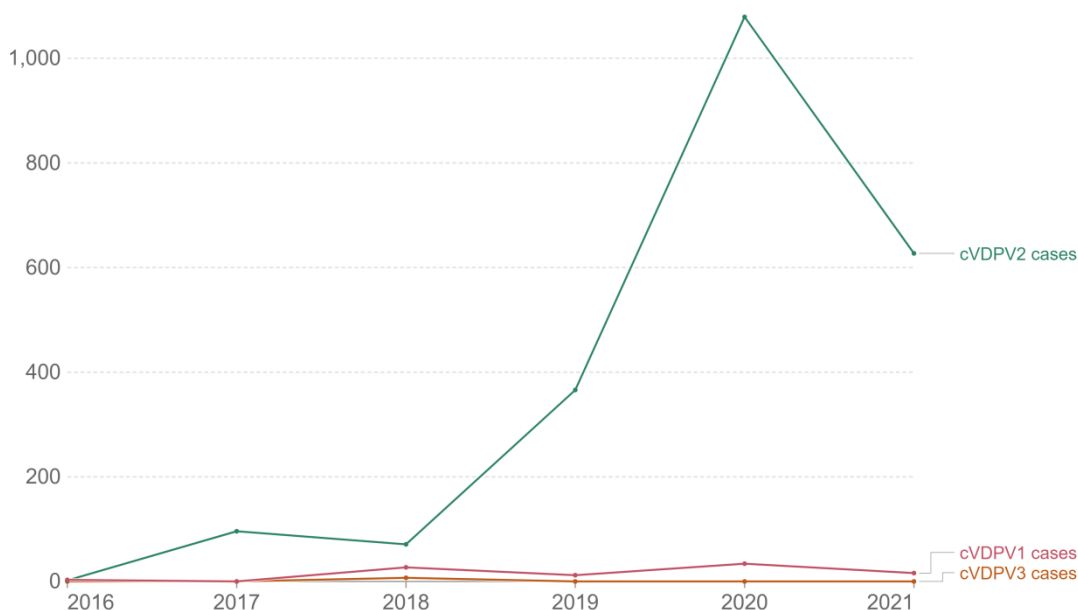
7. Εμβόλια

7.1. Εμβόλιο με εξασθενημένο ιό

Το εμβόλιο OPV ή αλλιώς Sabin περιέχει ζωντανό άγριο στέλεχος του ιού, το οποίο εξασθενεί με επαναλαμβανόμενες διελεύσεις από κύτταρα έτσι ώστε να προκληθούν μεταλλάξεις που θα μειώσουν την νευρομολυσματικότητα και την μεταδοτικότητα του. Υπάρχουν 3 είδη του OPV, που μπορεί να περιέχουν τον έναν ορότυπο, συνδυασμό 2 ορότυπων ή και τους 3 ορότυπους, σε εξασθενημένη μορφή. Τα μονοσθενή εμβόλια για τους ορότυπους 1 (mOPV1) και 2 (mOPV2) κυκλοφόρησαν το 1961. Η κυκλοφορία του μονοσθενούς εμβολίου για το ορότυπο 3 (mOPV3) εγκρίθηκε το 1962. Το 1963 κυκλοφόρησε και το τρισθενές εμβόλιο OPV (tOPV). (CDC, 2023a) (Modlin κ.ά., 2021)

Ο ζωντανός εξασθενημένος ιός του OPV πολλαπλασιάζεται στο βλεννογόνο του εντέρου καθώς και στα λεμφοειδή κύτταρα του φάρυγγα και του εντέρου με παρόμοιο τρόπο με το άγριο στέλεχος του ιού της Πολιομυελίτιδας. Ο ιός αποβάλλεται από τα κόπρανα για περίοδο μέχρι 6 εβδομάδων μετά την χορήγηση, ωστόσο η διάρκεια απέκκρισης και οι συγκεντρώσεις του ιού είναι μικρότερες, συγκριτικά με την περίπτωση άγριου στελέχους. Οι μεγαλύτερες ποσότητες απέκκρισης του ιού παρατηρούνται κατά την πρώτη με δεύτερη εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό. (Javier, 2016) (CDC, 2023a)

Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι για κάθε 2,5 εκατομμύρια δόσεων tOPV που χορηγούνται εμφανίζεται 1 περίπτωση VAPP. Η επιπλοκή αυτή οδήγησε στην σταδιακή αντικατάσταση του OPV με IPV στις βιομηχανικές χώρες. Το 1996 η Συμβουλευτική Επιτροπή για τις Πρακτικές Ανοσοποίησης (ACIP) πρότεινε την αύξηση της χρήσης του IPV μέσω ενός διαδοχικού προγράμματος χορήγησης IPV πριν από το tOPV για να μειωθούν τα περιστατικά VAPP. Η πρόκληση χυμικής ανοσίας με το IPV, πριν την επαφή με τον εξασθενημένο ιό του OPV περιόρισε την εμφάνιση VAPP στους εμβολιασμένους. Η αντικατάσταση αυτή οδήγησε στην μείωση των περιστατικών VAPP κατά 60%. Παρόλα αυτά η αναμενόμενη μείωση των περιστατικών που σχετίζονται με τα εμβολιακά στελέχη ήταν μεγαλύτερη. Η αδυναμία μείωσης τους φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της κυκλοφορίας των στελεχών που υπήρχαν πριν την μετάβαση από το τρισθενές στο δισθενές OPV και η μη επαρκής ανοσιακή κάλυψη για τον ορότυπο 2 λόγω αυτής της μετάβασης. Το mOPV2 συνέβαλλε στην αύξηση των κρουσμάτων από στελέχη VDPVs. (Modlin κ.ά., 2021)



Εικόνα 5 Τα δηλωμένα περιστατικά παραλυτικής νόσου από cVDPVs στελέχη το διάστημα 2016-2021 (WHO, 2023b)

Σε μια κοινότητα με ανεπαρκή εμβολιαστική κάλυψη για τον ιό της Πολιομυελίτιδας, υπάρχει η πιθανότητα ο ιός που προέρχεται από το εμβόλιο να μπορεί να κυκλοφορεί στην κοινότητα, να μεταλλάσσεται και ύστερα από την πάροδο 12-15 μηνών να προκαλέσει παράλυση, αν και το φαινόμενο παρατηρείται σπάνια. (CDC, 2023b)

Το 2015, ο ορότυπος 2 του άγριου στελέχους του ιού της Πολιομυελίτιδας εξαλειφθηκε. Το 2016, όλες οι χώρες που χρησιμοποιούσαν το OPV σταμάτησαν να χρησιμοποιούν το tOPV και ξεκίνησαν να χρησιμοποιούν το δισθενές που περιέχει τους ορότυπους 1 και 3, με σκοπό την μείωση του κινδύνου μόλυνσης από cVDPV2. Μία ή περισσότερες δόσεις του IPV χορηγούνται σε όλες τις χώρες, αποκλειστικά ή σε συνδυασμό με το bOPV. Σε περιπτώσεις έξαρσης κρουσμάτων λόγω του cVDPV2 η χρήση του mOPV2 πρέπει να εγκριθεί από το γενικό διευθυντή του ΠΟΥ. (CDC, 2023a)

Το nOPV2, νέο εμβόλιο, δημιουργήθηκε με σκοπό την αντιμετώπιση των cVDPV2 στελεχών. Πρόκειται για μια τροποποιημένη εκδοχή του mOPV2, η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα και μικρότερη πιθανότητα επαναφοράς της νευρομολυσματικότητας του. Είναι το πρώτο εμβόλιο που εγκρίθηκε βάσει του Καταλόγου Χρήσης Έκτακτης Ανάγκης (EUL) το Νοέμβριο του 2020 ως ανταπόκριση σε Έκτακτη Ανάγκη για τη Δημόσια Υγεία Διεθνούς Ανησυχίας (PHEIC). Αποτελέσματα από κλινικές δομικές έχουν επιβεβαιώσει την ασφάλεια του nOPV2 και την ικανοποιητική ανοσολογική απόκριση του. Η πρώτη χρήση του έγινε τον Μάρτιο του 2021 και από τότε έχουν χορηγηθεί 600.000.000 δόσεις σε 28 χώρες,



μέχρι τον Αύγουστο 2023 και οι περισσότερες δόσεις χορηγήθηκαν στη Νιγηρία. Η αυξανόμενη χρήση του nOPV2 τα τελευταία δύο χρόνια φαίνεται ότι έχει προκαλέσει την μείωση νέων cVDPV2 κρουσμάτων και την μετάδοση στην κοινότητα. (GPEI, 2023d) (WHO, 2023j) (WHO, 2022b) (WHO, 2023l)

Η απόδοση του εμβολίου παρακολουθείται συνεχώς με σκοπό την συλλογή δεδομένων και εν τέλει την πλήρη αδειοδότηση του σε όλες τις χώρες, η οποία υπολογίζεται να πραγματοποιηθεί μέχρι τα τέλη του 2023. Μέχρι στιγμής, το nOPV2 μπορεί να χορηγηθεί μόνο σε χώρες με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης εξάρσεων cVDPV2. Τα κριτήρια καθορίζονται από το EUL και είναι τα εξής:

- Χώρες στις οποίες έχει ανιχνευτεί περιστατικό cVDPV2 τους τελευταίους 6 μήνες, μέσω της επιτήρησης για AFP ή περιβαλλοντικής επιτήρησης
- Χώρες στις οποίες έχει βρεθεί περιστατικό cVDPV2 τους τελευταίους 6-12 μήνες
- Χώρες που συνορεύουν με χώρες που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια (GPEI, 2023d)

Αποδοτικότητα εμβολίου

Το εμβόλιο OPV είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό κατά του ιού της Πολιομυελίτιδας. Μία δόση του τρισθενούς εμβολίου προσφέρει ανοσία κατά των 3 ορότυπων στο 50% των εμβολιασμένων. Το OPV προσφέρει εντερική ανοσία η οποία μειώνει την απέκκριση του ιού σε περίπτωση μόλυνσης με τον ίδιο ορότυπο του ιού, εμποδίζοντας έτσι τη μετάδοση του. Η πραγματοποίηση και των 3 δόσεων προσφέρει ανοσία κατά των 3 ορότυπων σε ποσοστό $\geq 95\%$ των εμβολιασμένων στις βιομηχανικές χώρες. Η ανοσία που προσφέρει το OPV είναι εφ' όρου ζωής. (CDC, 2023a)

Σχετικά με το nOPV2, γενετική αλληλούχιση που έγινε επιβεβαίωσε την διατήρηση της γενετικής σταθερότητας του εμβολίου. Μόνο ένα δείγμα, σε σύνολο 600 δειγμάτων από την Ουγκάντα παρουσίασε μεταστροφή στις κύριες περιοχές εξασθένησης. (WHO, 2023j)

Σύμφωνα με πρόσφατη κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε με σκοπό την αξιολόγηση της ανοσογονικότητας του nOPV2 σε νεογνά στο Μπαγκλαντές, η ορομετατροπή μετά την πρώτη δόση που χορηγήθηκε κατά την γέννηση ήταν 46% και έφτασε στο 90% μετά την δεύτερη χορήγηση του εμβολίου στις 4 εβδομάδες. Τα αντίστοιχα ποσοστά για το mOPV2 είναι 21% και 90%. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι έχει σημειωθεί μείωση των εξάρσεων από cVDPV2, ύστερα από την κορύφωση το 2019. (WHO, 2023j)



7.2. Εμβόλιο με αδρανοποιημένο ιό

Το IPV εμβόλιο αναπτύχθηκε από τους Jonas Salk και Julius Youngner και η χορήγηση του εγκρίθηκε το 1955. Το εμβόλιο περιέχει αδρανοποιημένα στελέχη και από τους 3 ορότυπους του ιού, που απομονώθηκαν από ασθενείς που είχαν μολυνθεί. Τα στελέχη αυτά έχουν αναπτυχθεί ξεχωριστά σε κύτταρα σειράς Vero και αδρανοποιούνται με την χρήση φορμαλδεϋδης. Αυτό σημαίνει ότι το συγκεκριμένο εμβόλιο δεν μπορεί να προκαλέσει νόσο. Το IPV ενεργοποιεί την χυμική ανοσία. Η αρχική σύνθεση του εμβολίου αντικαταστάθηκε τα τέλη του 1980 από μια ενισχυμένη σύνθεση που περιείχε 40:8:32 units από τους ορότυπους 1, 2 και 3 αντίστοιχα. Η χορήγηση του γίνεται με υποδόρια ή ενδομυϊκή ένεση. Κάθε δόση του IPV περιέχει τα αντιβιοτικά νεομυκίνη, στρεπτομυκίνη και πολυμυξίνη Β, το συντηρητικό 2-φαινοξυαιθανόλη ενώ δεν περιέχει ανοσοενισχυτικό. (Javier, 2016) (CDC, 2023a) (Modlin κ.ά., 2021) (CDC, 2023b)

Ο αριθμός των δόσεων, το χρονικό διάστημα ανάμεσα στις δόσεις καθώς και αντισώματα προερχόμενα από την μητέρα επηρεάζουν την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού. (Modlin κ.ά., 2021)

Η πρώτη δόση του IPV προτείνεται να χορηγηθεί στις πρώτες 6 εβδομάδες, αν και συνήθως χορηγείται στην ηλικία των 2 μηνών και ακολουθεί η δεύτερη δόση στην ηλικία των 4 μηνών. Η τρίτη δόση προτείνεται να χορηγηθεί μεταξύ των 6 με 18 μηνών ζωής. Το χρονικό διάστημα που προτείνεται ανάμεσα στις αρχικές δόσεις είναι 2 μήνες, Ωστόσο, αν χρειάζεται ενισχυμένη προστασία το ελάχιστο διάστημα ανάμεσα στις δόσεις είναι 4 εβδομάδες. Οι δόσεις αυτές, μέχρι την ηλικία των 6 μηνών προτείνονται μόνο σε περίπτωση κινδύνου έκθεσης του νεογνού στον ιό της Πολιομυελίτιδας. Η τελευταία δόση του IPV πρέπει να γίνεται μεταξύ των ηλικιών 4-6 ετών και η προηγούμενη δόση να έχει χορηγηθεί τουλάχιστον 6 μήνες πριν. Η χορήγηση δόσης IPV στην ηλικία των 4 ετών ή μετά προτείνεται ανεξάρτητα από τον αριθμό προηγούμενων δόσεων. Η χορήγηση 3 δόσεων οδηγεί σε επίπεδα ορομετατροπής που φτάνουν το 85-100% κατά των 3 ορότυπων του ιού της Πολιομυελίτιδας. (Modlin κ.ά., 2021)

Το IPV δεν εμποδίζει την μετάδοση του ιού. Αντίθετα, το OPV χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις έξαρσης του ιού προκειμένου να περιοριστεί η μετάδοση. Όταν δεν υπάρχουν εξάρσεις συνίσταται η διακοπή του εμβολιασμού με OPV έτσι ώστε να αποφευχθεί η μετάδοση στελεχών VDPVs. (CDC, 2023b)



7.2.1 IPV και άλλα εμβόλια

DTaP-HepB-IPV (Pediarix)

Το εμβόλιο DTaP-HepB-IPV προσφέρει ανοσοποίηση κατά της διφθερίτιδας, του τετάνου, κοκκύτη, των λοιμώξεων που προκαλούνται από όλους τους γνωστούς υπότυπους του ιού της ηπατίτιδας B και της Πολιομυελίτιδας. Χορηγείται σε 3 δόσεις για παιδιά ηλικίας από 6 εβδομάδων μέχρι 6 ετών. Χορηγείται σε νεογνά σε ηλικία 2, 4 και 6 μηνών. Το χρονικό διάστημα ανάμεσα στις δόσεις πρέπει να είναι τουλάχιστον 4 εβδομάδες. (FDA, 2023) (CDC, 2023a)

DTaP-IPV/Hib (Pentacel)

Το εμβόλιο DTaP-IPV/Hib προσφέρει ανοσοποίηση κατά της διφθερίτιδας, της Πολιομυελίτιδας, του τετάνου, κοκκύτη και στην επεμβατική νόσο που οφείλεται στον ιό *Haemophilus influenza B*. Χορηγούνται 4 δόσεις του εμβολίου σε παιδιά ηλικίας από 6 εβδομάδων έως 4 χρονών. Οι δόσεις χορηγούνται σε ηλικίες 2, 4, 6 και 15-18 μηνών. Οι πρώτες 3 δόσεις πρέπει να απέχουν μεταξύ τους τουλάχιστον 4 εβδομάδες. Η τρίτη και τέταρτη δόση πρέπει να απέχουν τουλάχιστον 6 μήνες. Η χορήγηση της τέταρτης δόσης δεν πρέπει να χορηγείται πριν την ηλικία των 12 μηνών. Μία ενισχυτική δόση στην ηλικία των 4-6 ετών προτείνεται, μόνο με IPV ή DTaP-IPV. (FDA, 2023) (CDC, 2023a)

DTaP-IPV-Hib-HepB (Vaxelis)

Το εμβόλιο DTaP-IPV-Hib-HepB προσφέρει ανοσοποίηση κατά της διφθερίτιδας, της Πολιομυελίτιδας, ηπατίτιδας B, του τετάνου, κοκκύτη και στην επεμβατική νόσο που οφείλεται στον ιό *Haemophilus influenza B*. Χορηγείται σε παιδιά ηλικίας 6 εβδομάδων μέχρι 4 ετών σε 3 δόσεις, στους 2, 4 και 6 μήνες. Οι δόσεις πρέπει να απέχουν τουλάχιστον 4 εβδομάδες μεταξύ τους. (FDA, 2023) (CDC, 2023a)

DTaP-IPV (Kinrix)

Το εμβόλιο DTaP-IPV αποτελεί την πέμπτη δόση κατά της διφθερίτιδας, του τετάνου και του κοκκύτη και την τέταρτη δόση κατά της Πολιομυελίτιδας σε παιδιά ηλικίας 4-6 ετών. (FDA, 2023) (CDC, 2023a)

DTaP-IPV (Quadracel)

Το εμβόλιο DTaP-IPV χορηγείται μόνο ως πέμπτη κατά της διφθερίτιδας, του τετάνου και του κοκκύτη και ως τέταρτη ή πέμπτη δόση κατά της Πολιομυελίτιδας σε παιδιά ηλικίας 4-6 ετών. (FDA, 2023) (CDC, 2023a)



Ενήλικες οι οποίοι δουλεύουν σε εργαστήρια που χειρίζονται δείγματα επικίνδυνα για Πολιομυελίτιδα, υγειονομικοί εργαζόμενοι που παρέχουν υπηρεσίες σε ασθενείς ή επαφές ασθενών που μπορεί να έχουν Πολιομυελίτιδα καθώς και ταξιδιώτες σε χώρες που ενδημεί ο ιός της Πολιομυελίτιδας αποτελούν ομάδες υψηλού κινδύνου. Οι συστάσεις εμβολιασμού για αυτές τις ομάδες ενηλίκων σχετίζονται με το ιστορικό εμβολιασμού τους. Αν ένας ενήλικας που διατρέχει υψηλό κίνδυνο έκθεσης στον ιό της Πολιομυελίτιδας δεν έχει εμβολιαστεί στο παρελθόν συστήνεται η χορήγηση του εμβολίου IPV σε 3 δόσεις. Οι πρώτες δύο δόσεις θα απέχουν 1-2 μήνες μεταξύ τους ενώ η τρίτη δόση θα χορηγηθεί 6-12 μήνες από την δεύτερη. (CDC, 2023a)

Αποδοτικότητα εμβολίου

Το εμβόλιο IPV προστατεύει αποτελεσματικά από την παραλυτική νόσο του ιού της Πολιομυελίτιδας. Τα άτομα που εμβολιάζονται με δύο δόσεις του IPV παράγουν αντισώματα κατά των 3 ορότυπων του ιού σε ποσοστό $\geq 90\%$, ενώ όσοι έχουν κάνει 3 δόσεις του εμβολίου έχουν προστασία έναντι και των 3 ορότυπων σε ποσοστό $\geq 99\%$. (CDC, 2023a)

Το εμβόλιο IPV αποτρέπει τα άγρια στελέχη του ιού της Πολιομυελίτιδας να εισέλθουν στο ΚΝΣ, προστατεύοντας έτσι από την παράλυση. Το IPV προσφέρει χαμηλότερη εντερική ανοσοποίηση, συγκριτικά με το OPV. Οι εμβολιασμένοι με IPV δεν αποβάλλουν τον ιό μέσω του ρινοφάρυγγα αλλά απεκκρίνουν ποσότητες από τα κόπρανα ύστερα από έκθεση σε WPV ή VDPV. Η διάρκεια απέκκρισης καθώς και οι ποσότητες του ιού είναι παρόμοιες με αυτές ενός ανεμβολίαστου ατόμου που δεν έχει εκτεθεί ξανά σε άγριο ή μεταλλαγμένο εμβολιακό στέλεχος του ιού. Η ανοσοποίηση που προσφέρει το IPV είναι εφ' όρου ζωής, αν πραγματοποιηθούν όλες οι δόσεις. (CDC, 2023a)



7.3 Παρενέργειες των εμβολίων

Κατά τη διάρκεια των δοκιμών για το ενισχυμένο IPV οι τοπικές αντιδράσεις που καταγράφηκαν ήταν ήπιες και παροδικές. Οι συμμετέχοντες δήλωσαν σκλήρυνση τοπικά σε ποσοστό 18%, πόνο το 13% και ερύθημα το 3,2% μέσα στις πρώτες 48 ώρες από τον εμβολιασμό. Οι συστηματικές αντιδράσεις που αναφέρθηκαν ήταν πυρετός $\geq 39^{\circ}\text{C}$ στο 38% των συμμετεχόντων, ευερεθιστότητα, υπνηλία και σύγχυση. (CDC, 2023a)

Περιστατικά VAPP παρατηρούνται πολύ σπάνια, μετά από εμβολιασμό με OPV. Ο μηχανισμός για την πρόκληση VAPP πιστεύεται ότι είναι κάποια μετάλλαξη ή αναστροφή του εξασθενημένου ιού σε μια πιο νευροτροπική μορφή. Αναστροφή πιστεύεται ότι συμβαίνει στην πλειονότητα των εμβολιασμένων ατόμων με OPV, αλλά σπάνια προκαλεί παραλυτική νόσο. Η VAPP είναι πανομοιότυπη με την παράλυση που προκαλείται από το άγριο στέλεχος του ιού. Το IPV δεν μπορεί να προκαλέσει παράλυση καθώς δεν περιέχει ζωντανό ιό. (CDC, 2023a)

Η πιθανότητα παράλυσης από το OPV είναι 7-21 φορές μεγαλύτερη κατά την χορήγηση της πρώτης δόσης του εμβολίου. Επίσης η παράλυση είναι πιο πιθανόν να συμβεί σε ενήλικες. Άτομα με συγκεκριμένες ανοσοανεπάρκειες, όπως διαταραχές των B-λεμφοκυττάρων παρουσιάζουν 7.000 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης VAPP. (CDC, 2023a)

Τα στελέχη VDPVs διαφέρουν γενετικά από τα εμβολιακά στελέχη. Προκύπτουν από παρατεταμένο πολλαπλασιασμό των εμβολιακών στελεχών του OPV σε άτομα με ανοσοανεπάρκειες ή σε μια κοινότητα με χαμηλή εμβολιαστική κάλυψη, και την εκ νέου απόκτηση της νευρομολυσματικότητας και της μεταδοτικότητας τους. Οι κίνδυνοι παράλυσης και οι εκδηλώσεις παράλυσης είναι όμοιοι με του άγριου στελέχους του αντίστοιχου ορότυπου. (CDC, 2023a)



8. Επιδημιολογία

8.1 Πρωτοβουλία για την παγκόσμια εκρίζωση του ιού της Πολιομυελίτιδας (GPEI)

Τον Μάιο του 1988 ξεκίνησε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) η πρωτοβουλία για την παγκόσμια εξάλειψη του ιού της Πολιομυελίτιδας (GPEI) μέχρι το 2000. Το 1988 το άγριο στέλεχος του ιού της Πολιομυελίτιδας υπήρχε σε 125 χώρες προκαλώντας παράλυση σε περισσότερα από 350.000 παιδιά εκείνο το έτος. Μέχρι τα τέλη του 2002 τα κρούσματα είχαν μειωθεί στα 1900 ανάμεσα σε 7 μόλις χώρες. Η προσπάθεια εκρίζωσης του ιού της Πολιομυελίτιδας είχε εντυπωσιακά αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα. (WHO, 2004)

Σήμερα οι προτεινόμενες στρατηγικές από τον ΠΟΥ περιλαμβάνουν τον επαρκή εμβολιασμό των βρεφών με 3 τουλάχιστον δόσεις του OPV, συν μια δόση στα βρέφη που γεννιούνται σε ενδημικές χώρες και την παρακολούθηση περιστατικών με οξεία χαλαρή παράλυση (AFP). Εκστρατείες ανοσοποίησης του πληθυσμού και κυρίως παιδιών κάτω των 5 ετών έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές μέθοδοι επίσης. (WHO, 2004)

Σήμερα ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας προτείνει τέσσερις στρατηγικές για την εξάλειψη του ιού της Πολιομυελίτιδας. Το πρώτο βήμα είναι ο συνεχής εμβολιασμός των νεογνών, με τουλάχιστον τρεις δόσεις από το OPV και επιπλέον μια δόση μετά τη γέννηση σε ενδημικές χώρες, για την εξασφάλιση και διατήρηση υψηλής εμβολιαστικής κάλυψης. Επιπλέον, προτείνεται η θέσπιση εθνικών ημερών εμβολιασμού που θα επικεντρώνονται στον εμβολιασμό των παιδιών ηλικίας <5 ετών, σε διάστημα λίγων ημερών. Ο μαζικός εμβολιασμός εμποδίζει την εξάπλωση των άγριων στελεχών του ιού της Πολιομυελίτιδας λόγω της άμεσης ανοσοποίησης του πληθυσμού, έχοντας ως επακόλουθο τη διακοπή της αλυσίδας μετάδοσης σε μια χώρα. Η παρακολούθηση των περιστατικών AFP σε συνδυασμό με εργαστηριακό έλεγχο αποτελεί σημαντικό μέτρο για την εξάλειψη του ιού της Πολιομυελίτιδας. Οι περισσότερες μολύνσεις από τον ιό της Πολιομυελίτιδας είναι ασυμπτωματικές, με κλινικά συμπτώματα να εμφανίζονται στο 0,1-1%. Άρα είναι απαραίτητη η παρακολούθηση περιστατικών AFP προκειμένου να γίνει ενδελεχής έλεγχος για να εξακριβωθεί το ενδεχόμενο ύπαρξης του ιού. Λόγω της αδυναμίας εκτέλεσης πλήρους νευρολογικής εξέτασης σε χώρες του αναπτυσσόμενου κόσμου το σύστημα επιτήρησης περιλαμβάνει όλα τα περιστατικά οξείας χαλαρής παράλυσης. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να υπάρχουν και άλλα περιστατικά εκτός της Πολιομυελίτιδας που μοιράζονται παρόμοια κλινική εικόνα, όπως το σύνδρομο Guillain-Barré, η εγκάρσια μυελίτιδα και η τραυματική νευροπάθεια. Το γεγονός αυτό μειώνει την



ειδικότητα της παρακολούθησης, παρόλα αυτά αυξάνεται η ευαισθησία καθώς τα περισσότερα περιστατικά παραλυτικής Πολιομυελίτιδας δηλώνονται. Η ευαισθησία επίσης ελέγχεται και μέσω της επίπτωσης των περιστατικών AFP που δεν οφείλονται στον ιό της Πολιομυελίτιδας (Non Polio AFP – NPAFP).

Περιστατικά AFP	Επίπτωση NPAFP	Έτος
80602	5.38	2023
107916	8.9	2022
86970	4.54	2021
75708	3.83	2020
106181	5.55	2019
97315	5.11	2018
104060	5.46	2017
109821	5.77	2016
100222	5.16	2015
103974	5.45	2014

Πίνακας 1 Αριθμός AFP και επίπτωση NPAFP περιστατικών τα τελευταία 10 χρόνια (WHO, 2023b)

Η παρακολούθηση των περιστατικών AFP είναι πολύ αποτελεσματική στην ανίχνευση του ιού στον πληθυσμό. Συμπληρωματικά, γίνεται δειγματοληψία κοπράνων από όλα τα περιστατικά οξείας χαλαρής παράλυσης και έλεγχος τους για ανίχνευση του ιού. Το μέτρο αυτό προσφέρει επιπλέον ευαισθησία στο σύστημα επιτήρησης. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η άμεση συλλογή και μεταφορά μεγάλου αριθμού δειγμάτων και ο εργαστηριακός έλεγχος υψηλής ποιότητας. Οι εκστρατείες εμβολιασμού αποτελούν το τελευταίο βήμα για την εξάλειψη του ιού της Πολιομυελίτιδας. Η δράση αυτή στοχεύει περιοχές στις οποίες έχει επιτευχθεί σημαντική μείωση των κρουσμάτων. Με αυτόν τον τρόπο θα εντοπιστούν και οι εναπομείναντες πληθυσμοί που φέρουν τον ιό και θα εμβολιαστούν, έτσι ώστε να διακοπεί η μετάδοση. (Knipe & Howley, 2013) (WHO, 2004)

Όταν επιτευχθεί η εκρίζωση του ιού της Πολιομυελίτιδας παγκοσμίως, πηγές επανακυκλοφορίας του θα αποτελούν εργαστήρια και βιομηχανίες παραγωγής εμβολίων. Προκειμένου να αποφευχθεί κάποιο τέτοιο γεγονός έχει γίνει ένα σχέδιο το οποίο χωρίζεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση αφορά μέτρα που θα ληφθούν πριν την επίτευξη της παγκόσμιας εξάλειψης του ιού. Ιδρύματα και εργαστήρια που διαθέτουν άγρια στελέχη του ιού ή πιθανώς μολυσματικά υλικά θα καταγραφούν σε μια λίστα με σκοπό την προετοιμασία για την δεύτερη φάση. Η καταγραφή έχει ήδη ολοκληρωθεί στις περιοχές που έχει εκριζωθεί ο ιός. Επίσης, τα άγρια στελέχη θα πρέπει να αντικατασταθούν με εμβολιακά. Η δεύτερη φάση αφορά τα μέτρα που θα πρέπει να ληφθούν όταν ο ιός θα έχει εξαλειφθεί παγκοσμίως. Διαδικασίες που σχετίζονται με άγρια στελέχη του ιού θα πραγματοποιούνται σε εργαστήρια



βιοασφάλειας 3. Η Παγκόσμια Επιτροπή Πιστοποίησης θα δηλώσει την εκρίζωση του ιού της Πολιομυελίτιδας όταν (α) όλες οι περιοχές του κόσμου έχουν πιστοποιηθεί ότι δεν κυκλοφορεί ο ιός σε αυτές και (β) όταν όλα τα εργαστήρια δηλώσουν, περιορίσουν ή καταστρέψουν τα αποθέματα άγριων στελεχών του ιού. (Knipe & Howley, 2013)

Εκτός από τα άγρια στελέχη του ιού, νόσο μπορούν να προκαλέσουν και τα εξασθενημένα εμβολιακά στελέχη που χρησιμοποιούνται στο εμβόλιο OPV. Επίσης, υπάρχει ο κίνδυνος μετάλλαξης των εμβολιακών στελεχών (VDPVs). Τα VDPVs στελέχη διαφέρουν από αυτά του εμβολίου και έχουν την ικανότητα να μολύνουν τον πληθυσμό και να προκαλούν παραλυτική νόσο. (Knipe & Howley, 2013)

Τα cVDPVs προέρχονται από τα στελέχη του OPV εμβολίου, τα οποία μεταλλάσσονται και αποκτούν ξανά την νευρομολυσματικότητά τους. Οι εξάρσεις κρουσμάτων cVDPV συνδέονται με χαμηλή εμβολιαστική κάλυψη. (Bigouette, 2023) (Mohanty κ.ά., 2023)

Την περίοδο 2000-2001 υπήρξαν 21 επιβεβαιωμένα κρούσματα, εκ των οποίων και 2 θάνατοι, που σχετίζονταν με cVDPV τύπου 1 στο νησί Ισπανιόλα της Καραϊβικής. Το διάστημα 2000-2016 καταγράφηκαν 24 εξάρσεις από cVDPV. Ο αριθμός των εξάρσεων από cVDPV στελέχη αυξήθηκε από 9 περιστατικά το 2017-2018 σε 29 το 2019, και το 86% των εξάρσεων οφειλόταν στο cVDPV2 στέλεχος. Το 2020-2021 σημειώθηκαν 44 εξάρσεις από cVDPV, σε 44 χώρες, και από τους 3 ορότυπους. Το 2015, ο ΠΟΥ επιβεβαίωσε ότι ο WPV2 έχει εξαλειφθεί, παγκοσμίως. Ως εκ τούτου, σταμάτησε η χρήση του τρισθενούς OPV και ξεκίνησε η χρήση του δισθενούς OPV για την αντιμετώπιση των WPV1 και WPV3. Έκτοτε, ξεκίνησαν εξάρσεις που οφείλονταν στο cVDPV2 στέλεχος, ειδικά σε χώρες της Αφρικής και της ανατολικής Μεσογείου. (Bigouette, 2023) (Mohanty κ.ά., 2023)

Το 13% των κρουσμάτων από cVDPV οφείλονται στον ορότυπο 1, το 86% οφείλεται στον ορότυπο 2, ενώ μόνο το 1% οφείλεται στον ορότυπο 3. Το 2020, σημειώθηκαν 1081 κρούσματα από cVDPV. Το 2021 καταγράφηκαν 682 κρούσματα. Η Μαδαγασκάρη σημείωσε τα περισσότερα κρούσματα από cVDPV1, ενώ από cVDPV2 σημειώθηκαν στη Νιγηρία. Το 2022 καταγράφηκαν 185 κρούσματα από cVDPV1, 673 κρούσματα από cVDPV2 και 3 cVDPV3. Τα περισσότερα κρούσματα τόσο από cVDPV1 όσο και από cVDPV2 σημειώθηκαν στη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό. (Bigouette, 2023) (Mohamed κ.ά., 2007)

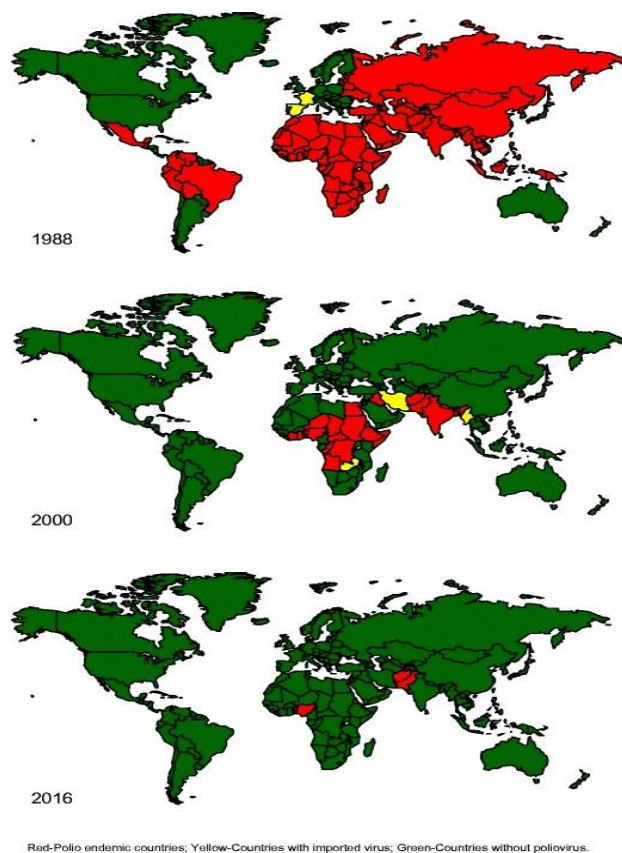
Οι περισσότερες εξάρσεις κρουσμάτων cVDPV2 παρατηρούνται σε χώρες της Αφρικής. Ωστόσο ο κίνδυνος εξάπλωσης αφορά όλο τον πλανήτη. Απόδειξη αποτελεί η ανίχνευση cVDPV2 σε λύματα στο Λονδίνο, το 2022. Ο κίνδυνος για παραλυτική νόσο σε μια χώρα όπως το Ηνωμένο Βασίλειο είναι μικρός, λόγω της υψηλής



εμβολιαστικής κάλυψης. Η αποκλειστική χρήση του IPV, που δεν προκαλεί ανοσία του εντερικού, σε συνδυασμό με την χαμηλή εμβολιαστική κάλυψη ορισμένων ομάδων δεν αποκλείουν την πιθανότητα εξάπλωσης του cVDPV2 και εμφάνισης παραλυτικής νόσου, στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Δεύτερο περιστατικό αποτελεί η επιβεβαίωση παραλυτικής νόσου, από cVDPV2, στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, τον Ιούλιο 2022. Το κρούσμα ήταν ανεμβολίαστος νεαρός ενήλικας από κοινότητα με ανεπαρκή εμβολιαστική κάλυψη, ενώ η προηγούμενη παραλυτική νόσος, οφειλόμενη σε εισαγόμενο cVDPV είχε καταγραφεί το 2013 σε ανοσοκατεσταλμένο παιδί. (Bandyopadhyay & Zipursky, 2023)

Προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι αυξανόμενες εξάρσεις του cVDPV2, σχεδιάστηκε καινούργιο μονοσθενές OPV εμβόλιο, το nOPV2, το οποίο σχεδιάστηκε ώστε να είναι γενετικά πιο σταθερό. Η χρήση του ξεκίνησε το 2020 σε χώρες στις οποίες ενδημεί το cVDPV2. (Bigouette, 2023) (Mohanty κ.ά., 2023)

Αρχικά, η παρακολούθηση της πορείας του ιού της Πολιομυελίτιδας στις ενδημικές χώρες από την GPEI βασιζόταν στην επιτήρηση περιστατικών οξείας χαλαρής παράλυσης σε παιδιά ηλικίας κάτω των 15 ετών και στην ανοσοποίηση μέσω του OPV που έχει ζωντανό εξασθενημένο ιό. Η επίπτωση της Πολιομυελίτιδας από το αρχικό στέλεχος (WPV) μειώθηκε από περίπου 350.000 κρούσματα το 1988 σε μόλις 22 κρούσματα το 2017. Τα κρούσματα εντοπίστηκαν σε Αφγανιστάν και Πακιστάν, με 14 και 8 περιστατικά αντίστοιχα. Παράλληλα, στελέχη VDPV βρέθηκαν σε Συρία και Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό, με 74 και 22 κρούσματα αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, η επιτήρηση περιστατικών AFP αφορά μόνο το 1% των κρουσμάτων. Επομένως η παρακολούθηση και περιβαλλοντολογικών δειγμάτων, όπως είναι τα λύματα, θα βοηθήσει στην καλύτερη και πιο αντιπροσωπευτική ιχνηλάτηση των κρουσμάτων. (Njile κ.ά., 2019)



Εικόνα 6 Η πορεία του ιού της Πολιομυελίτιδας στον κόσμο από την έναρξη του GPEI (Bahl κ.ά., 2018)

Σήμερα, ο ιός της Πολιομυελίτιδας ενδημεί σε δύο χώρες, το Αφγανιστάν και το Πακιστάν. Ωστόσο υπάρχουν 35 χώρες οι οποίες εμφανίζουν κρούσματα κυρίως λόγω της εισόδου του ιού από μεταναστευτικούς πληθυσμούς. Οι περισσότερες χώρες βρίσκονται στην Αφρική. Παρόλα αυτά, κρούσματα παρατηρούνται και στην Αμερική, ανατολική Μεσόγειο, Ευρώπη και νοτιοανατολική Ασία. Ο ιός της Πολιομυελίτιδας εξαλείφθηκε από την Ελλάδα το 2002. Το τελευταίο περιστατικό Πολιομυελίτιδας στην Ελλάδα που οφείλεται σε ενδογενή μόλυνση από WPV ήταν το 1982. Το 1996 παρατηρήθηκε μία έξαρση περιστατικών AFP που προκλήθηκαν από τον WPV1 στην Αλβανία. Πέντε ανεμβολίαστα ρομά παιδιά με Πολιομυελίτιδα εισήλθαν στην Ελλάδα. (Pogka κ.ά., 2017) (GPEI, 2023a) (GPEI, 2023e)

Ο ΠΟΥ χωρίζει τον πλανήτη σε 6 περιοχές: Αφρική, Αμερική, Ευρώπη, Ανατολική Μεσόγειος, Νοτιοανατολική Ασία και Δυτικός Ειρηνικός. Για να πιστοποιηθεί, από τον ΠΟΥ, κάποια από αυτές τις περιοχές ως περιοχή όπου έχει εκριζωθεί ο ιός της Πολιομυελίτιδας (polio free) θα πρέπει όλες οι χώρες που ανήκουν στην περιοχή να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις:



1. Κανένα καταγεγραμμένο περιστατικό ενδογενούς μόλυνσης από άγριο στέλεχος του ιού της Πολιομυελίτιδας τα τελευταία 3 χρόνια, με την ύπαρξη αξιόπιστου και πιστοποιημένου συστήματος παρακολούθησης,
2. Υψηλού επιπέδου εμβολιασμοί ρουτίνας για τη διατήρηση της ανοσίας του πληθυσμού,
3. Απόδειξη της ικανότητας ανίχνευσης και αντιμετώπισης εισερχόμενων περιστατικών Πολιομυελίτιδας και
4. Ύπαρξη εγγράφων, σε ισχύ, από τις εθνικές επιτροπές πιστοποίησης Πολιομυελίτιδας (NCC) για την εξέταση, έγκριση και υποβολή τεκμηρίωσης στον ανεξάρτητο φορέα ARCC. (WHO, 2023m)

Η Αμερική πιστοποιήθηκε ως περιοχή απαλλαγμένη από τον ιό της Πολιομυελίτιδας το 1994, ο Δυτικός Ειρηνικός το 2000, η Ευρώπη το 2002, η Νοτιοανατολική Ασία το 2014, η Αφρική το 2020, ενώ η Ανατολική Μεσόγειος δεν έχει πιστοποιηθεί ακόμα γιατί σε αυτή ανήκουν το Αφγανιστάν και το Πακιστάν, χώρες ενδημικές για τον ιό της Πολιομυελίτιδας. (WHO, 2022a) (GPEI, 2023b)

Ο ιός της Πολιομυελίτιδας προσβάλλει κυρίως παιδιά <5 ετών. Ωστόσο οποιοσδήποτε μπορεί να μολυνθεί από τον ιό αν δεν είναι εμβολιασμένος. Μη αναστρέψιμη παράλυση παρατηρείται σε 1 στις 200 μολύνσεις από τον ιό της Πολιομυελίτιδας. Το 5-10% όσων έχουν παραλύσει καταλήγει λόγω παράλυσης των αναπνευστικών μυών τους. (WHO, 2022a)

Περιστατικά Πολιομυελίτιδας από WPV στέλεχος έχουν μειωθεί κατά 99% από το 1988, όπου υπολογίζονταν περίπου 350.000 περιστατικά σε περισσότερες από 125 χώρες, σε μόλις 6 καταγεγραμμένα περιστατικά το 2021. (WHO, 2022a)

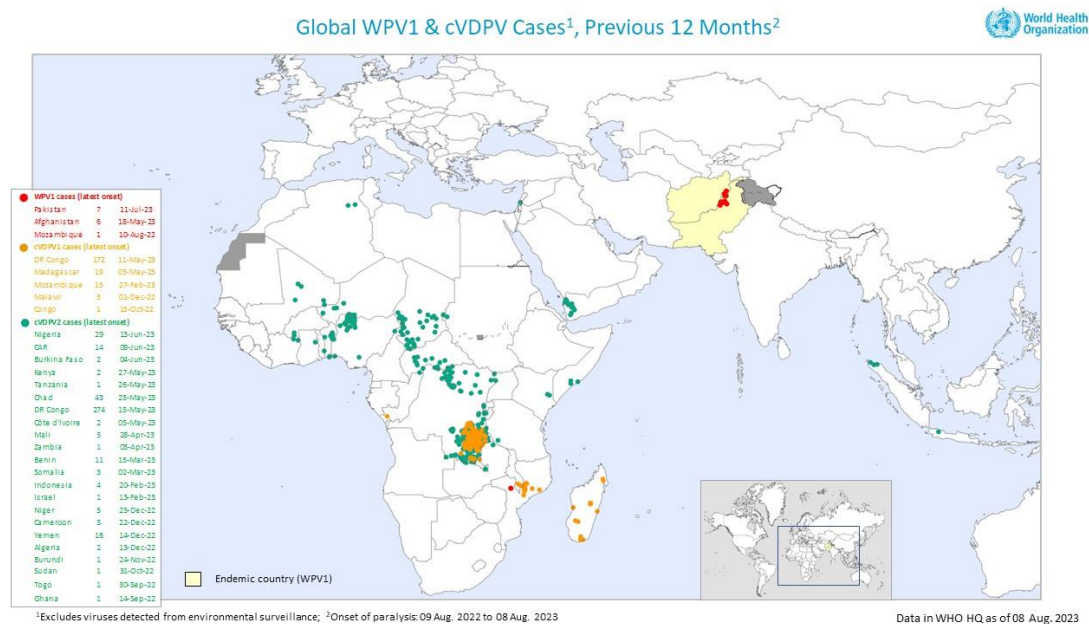


«Κόλα Κωνσταντίνα», «Αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας σε
λύματα από αστικές περιοχές και δομές φιλοξενίας προσφύγων»

	Επιτήρηση περιστατικών AFP		
Περιοχή ΠΟΥ ανά έτος	Σύνολο περιστατικών AFP*	Άθροισμα από WPV	Άθροισμα από cVDPV
2019	106271	176	378
Αμερική	2280	0	0
Ανατολική Μεσόγειος	25738	176	26
Αφρική	24450	0	328
Δυτικός Ειρηνικός	7137	0	18
Ευρώπη	1559	0	0
Νοτιοανατολική Ασία	45107	0	6
2020	75708	140	1113
Αμερική	1332	0	0
Ανατολική Μεσόγειος	20938	140	547
Αφρική	22742	0	563
Δυτικός Ειρηνικός	6037	0	2
Ευρώπη	914	0	1
Νοτιοανατολική Ασία	23745	0	0
2021	86970	6	691
Αμερική	1389	0	0
Ανατολική Μεσόγειος	22783	5	116
Αφρική	27467	1	538
Δυτικός Ειρηνικός	5919	0	0
Ευρώπη	1102	0	37
Νοτιοανατολική Ασία	28310	0	0
2022	107916	30	871
Αμερική	2166	0	1
Ανατολική Μεσόγειος	31092	22	168
Αφρική	32698	8	700
Δυτικός Ειρηνικός	5822	0	0
Ευρώπη	1521	0	1
Νοτιοανατολική Ασία	34617	0	1
2023	80602	9	304
Αμερική	1470	0	0
Ανατολική Μεσόγειος	23065	9	5
Αφρική	25490	0	295
Δυτικός Ειρηνικός	4707	0	0
Ευρώπη	1006	0	1
Νοτιοανατολική Ασία	24864	0	3
Γενικό άθροισμα	457467	361	3357

Πίνακας 2 Σύνολο καταγεγραμμένων περιστατικών AFP 2019-2023 (WHO, 2023b)

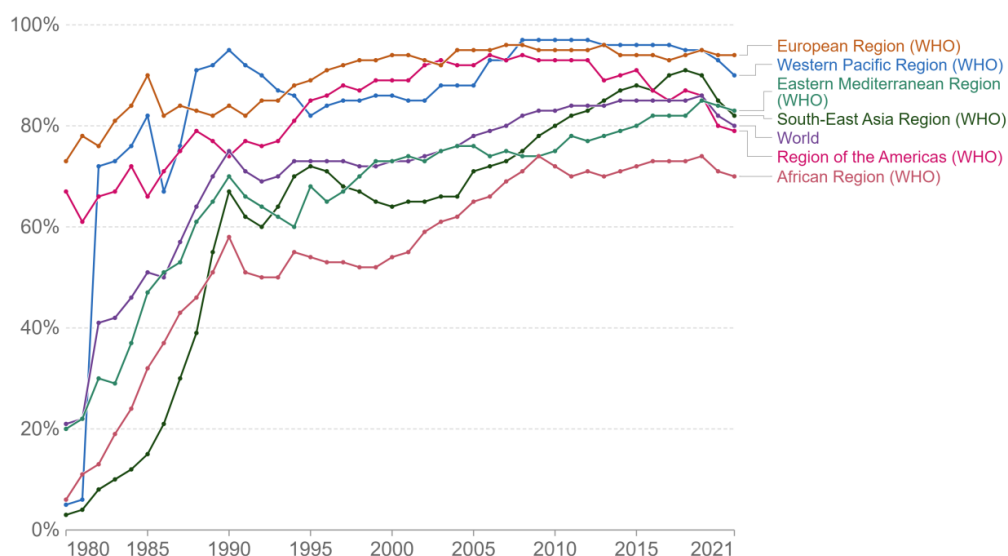
Από τον Αύγουστο του 2022 έως τον Αύγουστο του 2023 έχουν καταγραφεί 6 περιστατικά WPV1 από το Αφγανιστάν και 7 από το Πακιστάν και 1 στη Μοζαμβίκη. Τα κρούσματα από cVDPV1 είναι 210 και τα περισσότερα βρίσκονται στη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό. Τα περιστατικά που σχετίζονται με το cVDPV2 στέλεχος είναι 422 και πάλι η πλειονότητα τους βρίσκεται στη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό. (WHO, 2023h) (PPEP, 2023) (GPEI, 2023f)



Εικόνα 7 Τα κρούσματα από WP1 και cVDPVs στον κόσμο του τελευταίους 12 μήνες (κόκκινο:WPV1, κίτρινο:cVDPV1, πράσινο: cVDPV2) (GPEI, 2023f)

Καθοριστικό ρόλο για την εκρίζωση του ιού της Πολιομυελίτιδας παίζει η μεγαλύτερη δυνατή εμβολιαστική κάλυψη. Το 2022, υπολογίστηκε ότι το 84% των νεογνών παγκοσμίως έλαβε 3 δόσεις εμβολίου κατά του ιού της Πολιομυελίτιδας. (WHO, 2023g)

Η εμβολιαστική κάλυψη των νεογνών, ανά περιοχή βάσει του ΠΟΥ, για το έτος 2022, είναι: Αφρική 71%, Αμερική 82%, Ανατολική Μεσόγειος 85%, Νοτιοανατολική Ασία και Δυτικός Ειρηνικός 91%, Ευρώπη 94%. (WHO, 2023e)



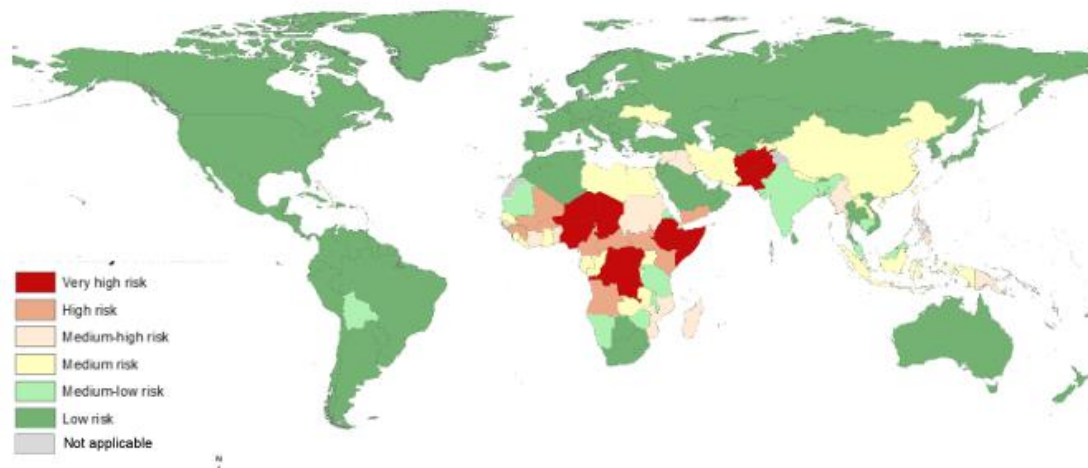
Εικόνα 8 Η εμβολιαστική κάλυψη των βρεφών ενός έτους, είτε με OPV είτε με IPV από το 1980 έως το 2021 (WHO, 2023i)

Στα πλαίσια της GPEI, αξιολογείται η κατάσταση κάθε χώρας σχετικά με τον κίνδυνο για τον ιό της Πολιομυελίτιδας. Οι 4 παράγοντες που λαμβάνονται υπόψιν είναι οι ακόλουθοι:

1. Κίνδυνος που σχετίζεται με τον ιό της Πολιομυελίτιδας: Περιλαμβάνει την επιδημιολογία των WPV και VDPV κρουσμάτων τα τελευταία 10 χρόνια και την εμβολιαστική κάλυψη του πληθυσμού κάθε χώρας. Χώρες με συνεχή ή επανεμφανιζόμενη κυκλοφορία του ιού θεωρούνται υψηλότερου κινδύνου.
2. Η κοινωνικοπολιτική κατάσταση κάθε χώρας: Χώρες με ασταθή διακυβέρνηση και οικονομία, έλλειψη ανθρώπινου δυναμικού και χαμηλού επιπέδου σύστημα υγείας κρίνεται ότι χρειάζονται μεγαλύτερη υποστήριξη από την GPEI
3. Η περιοχή του ΠΟΥ όπου εντάσσεται κάθε χώρα (Αφρική, Ευρώπη, Αμερική, Ανατολική Μεσόγειος, Νοτιοανατολική Ασία και Δυτικός Ειρηνικός)
4. Άλλοι παράγοντες, όπως η ύπαρξη εξάρσεων κρουσμάτων, η απόδοση της επιτήρησης και οι αναφορές μελών της ομάδας GPEI σχετικά με την επιτήρηση. Η ύπαρξη κρουσμάτων του ιού και η χαμηλή απόδοση της επιτήρησης αυξάνει τον κίνδυνο, ενώ οι αναφορές από τα μέλη του προγράμματος δεν επηρεάζουν σημαντικά την αξιολόγηση, ωστόσο συμβάλλουν στην πραγματοποίηση προσαρμογών που ενδεχομένως να απαιτούνται. (GPEI, 2022a)



«Κόλα Κωνσταντίνα», «Αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας σε
λύματα από αστικές περιοχές και δομές φιλοξενίας προσφύγων»



Εικόνα 9 Αξιολόγηση της επικινδυνότητας σχετικά με τον ιό της Πολιομυελίτιδας (GPEI, 2022a)

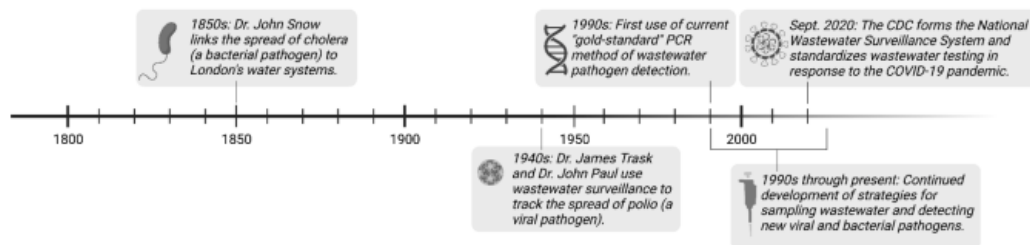


8.2 Επιτήρηση λυμάτων

Η επιτήρηση λυμάτων αποτελεί μέρος της επιτήρησης περιβαλλοντικών δειγμάτων που έχει χρησιμοποιηθεί για την αναζήτηση παθογόνων που μεταδίδονται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Χρησιμοποιήθηκε στα μέσα του 1800, στην επιδημία χολέρας που προέκυψε στο Λονδίνο. Ο επιδημιολόγος John Snow εντόπισε ένα βόθρο κοντά σε ένα σπίτι όπου υπήρξαν πολλοί θάνατοι από χολέρα. Έγινε ανασκαφή στο βόθρο και εντοπίστηκε διαρροή στην αντλία παροχής νερού. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε την αρχή για τον έλεγχο των λυμάτων για διάφορα παθογόνα, όπως των βακτηρίων *Salmonella typhi*, των ιών *Coxsackie* και του ιού της Πολιομυελίτιδας. (Kilaru κ.ά., 2023) (Schmidt, 2020)

Τη δεκαετία του 1940, οι γιατροί και επιδημιολόγοι James Trask και John από το Yale School of Medicine πρότειναν την επιτήρηση των λυμάτων ως μέτρο παρακολούθησης της επιδημίας του ιού της Πολιομυελίτιδας στις ΗΠΑ. Το 2013 αποτράπηκε επικείμενη έξαρση παραλυτικής Πολιομυελίτιδας στο Ισραήλ. Το Υπουργείο Υγείας του Ισραήλ παρακολουθούσε τα λύματα για παρουσία του ιού της Πολιομυελίτιδας σε μηνιαία βάση από εισροές σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων και τα δείγματα αυτά κάλυπταν περίπου το 30-40% του πληθυσμού της χώρας. Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του ιού της Πολιομυελίτιδας σε πολλές περιοχές. Το γεγονός αυτό κινητοποίησε τις τοπικές υγειονομικές αρχές να ξεκινήσουν εκστρατεία εμβολιασμού σε όλη την χώρα. Κανένα κρούσμα παραλυτικής Πολιομυελίτιδας δεν αναφέρθηκε. (Kilaru κ.ά., 2023) (Schmidt, 2020)

Συγκεκριμένα για τον ιό της Πολιομυελίτιδας, η επιτήρηση των λυμάτων αποτέλεσε πολύ σημαντικό εργαλείο στην πρωτοβουλία εξάλειψής του, που ξεκίνησε την δεκαετία του 1980. Αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα σύγκρισης της επιτήρησης των κλινικών περιστατικών με τα ευρήματα της επιτήρησης των λυμάτων. Η παρακολούθηση της Πολιομυελίτιδας βασίζεται στην εμφάνιση περιστατικών AFP, όμως παρουσιάζεται μόνο στο 1% των περιπτώσεων Πολιομυελίτιδας. Ο ιός της Πολιομυελίτιδας αποβάλλεται σε μεγάλες ποσότητες από τα κόπρανα. Άρα ο έλεγχος των λυμάτων μπορεί να ανιχνεύσει τον ιό που μπορεί κυκλοφορεί στην κοινότητα πριν την ευρεία μετάδοσή του. Ο έλεγχος των λυμάτων έδειξε πρώιμα σημάδια για την έξαρση κρουσμάτων από τους ιούς *Hepatitis A* και *Norovirus* στην Σουηδία, το 2013. Η επιτήρηση των λυμάτων χρησιμοποιήθηκε και στην πρόσφατη πανδημία του SARS-CoV-2, για την παρακολούθηση της πορείας της, την έγκαιρη ενημέρωση για επικείμενη έξαρση κρουσμάτων αλλά και για την ανίχνευση της εκάστοτε μετάλλαξης που κυριαρχούσε ανά περίοδο και ανά χώρα. (Kilaru κ.ά., 2023) (Schmidt, 2020)



Εικόνα 10 Χρονοδιάγραμμα της εξέλιξης της επιτήρησης των λυμάτων (Ya'el Courtney, 2023)

Η επιτήρηση των λυμάτων αποτελεί έναν δείκτη μετάδοσης μολυσματικής ασθένειας, σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα της κοινότητας, ακόμα και όταν υπάρχουν ασυμπτωματικοί φορείς. Η επιτήρηση των λυμάτων βασίζεται στην συλλογή μη επεξεργασμένων λυμάτων της κοινότητας και ανίχνευση του ιού της Πολιομυελίτιδας μέσω βιοδεικτών, όπως το γενετικό του υλικό. Σε αντίθεση με τις κλινικές εργαστηριακές δοκιμές και τις υπηρεσίες υγείας, οι οποίες αναζητούν τον ιό σε μεμονωμένα άτομα, η επιτήρηση λυμάτων μπορεί να δώσει δεδομένα στο επίπεδο της κοινότητας που εμπίπτουν στο ίδιο αποχετευτικό σύστημα. Έτσι γίνεται δυνατή η ανίχνευση της παρουσίας του ιού καθώς και αλλαγές στην ποσότητα αποβολής του, που υποδεικνύει την πορεία του στην κοινότητα. Επίσης, πρόκειται για μια οικονομική μέθοδο, συγκριτικά με τις κλινικές δοκιμές, καθώς το δείγμα είναι αντιπροσωπευτικό της κοινότητας. (Kilaru κ.ά., 2023) (National Academies of Sciences κ.ά., 2023)

Η παρακολούθηση του ιού της Πολιομυελίτιδας βασίζεται στην επιτήρηση των περιστατικών οξείας χαλαρής παράλυσης σε παιδιά <15 ετών, τα οποία όμως εμφανίζονται σε ποσοστό <1% των ατόμων που μολύνονται από τον ιό. Απεκκρίνεται σε μεγάλες ποσότητες από τα κόπρανα, είτε πρόκειται για WPV, cVDPV είτε για εμβολιακό στέλεχος και ανεξάρτητα από την κλινική εικόνα του ατόμου. Άρα είναι σημαντική και η επιτήρηση των λυμάτων για τον έλεγχο της κυκλοφορίας του ιού στην κοινότητα. (Njile κ.ά., 2019)

Η οργάνωση του δικτύου αποχέτευσης, το σημείο δειγματοληψίας και η επεξεργασία των λυμάτων επηρεάζουν την ευαισθησία της επιτήρησης λυμάτων για την ανίχνευση του ιού της Πολιομυελίτιδας. Η επιτήρηση των λυμάτων συμβάλλει στην ανίχνευση πιθανών εξάρσεων. Άρα είναι απαραίτητη η διαβεβαίωση ότι η μη ανίχνευση του ιού της Πολιομυελίτιδας στα λύματα σημαίνει ότι ο ιός δεν κυκλοφορεί στην κοινότητα. (Hamisu κ.ά., 2022)



Η παρακολούθηση των λυμάτων έχει συμβάλλει ουσιαστικά στην εκρίζωση του ιού της Πολιομυελίτιδας. Το 1984 υπήρξε μια αναπάντεχη έξαρση κρουσμάτων από το WPV3 στέλεχος στην Φιλανδία. Η επιτήρηση των λυμάτων χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η έκταση της έξαρσης στην χώρα. Δείγματα λυμάτων βρέθηκαν θετικά σε περιοχές που δεν είχαν αναφερθεί περιστατικά AFP. Οι πληροφορίες βοήθησαν στον περιορισμό των κρουσμάτων. Ύστερα από αυτήν την έξαρση δεν υπήρξαν άλλα κρούσματα WPV στην χώρα. Η Φιλανδία είναι από τις πρώτες χώρες που εφαρμόζουν συστηματική επιτήρηση στα λύματα. Την ίδια τακτική ακολούθησε και το Ισραήλ στην έξαρση από WPV1 το 1987. (Honi κ.ά., 2012) (Pöyry κ.ά., 1988) (Slater κ.ά., 1990)

Το 1992-1993, στην Ολλανδία παρουσιάστηκε έξαρση κρουσμάτων από το WP3 στέλεχος. Η παρακολούθηση των λυμάτων έδειξε ότι η έξαρση προήλθε από περιοχή στην οποία κατοικούσαν άτομα τα οποία δεν εμβολιάζονταν για θρησκευτικούς λόγους. Επίσης, βρέθηκαν ορισμένα θετικά δείγματα σε άλλες περιοχές, εβδομάδες πριν την εμφάνιση κρουσμάτων Πολιομυελίτιδας. Επομένως η επιτήρηση λυμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη επιδημιών σε περιπτώσεις έξαρσης κρουσμάτων. (Oostvogel κ.ά., 1994) (Honi κ.ά., 2012)

Μέσω της επιτήρησης των λυμάτων και των μοριακών τεχνικών, το 2002 έγινε αντιληπτή η είσοδος κρούσματος WP1 στη Γάζα, που σχετιζόταν με την έξαρση που υπήρχε στην Αίγυπτο το 2000. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην ενίσχυση των εκστρατειών εμβολιασμού και τη βελτίωση της επιτήρησης των περιστατικών AFP. (Honi κ.ά., 2012) (El Bassioni κ.ά., 2003)

Στην Αίγυπτο πραγματοποιείται συστηματικά η επιτήρηση λυμάτων για την κυκλοφορία του ιού της Πολιομυελίτιδας από το 2000. Ανιχνεύτηκαν 4 ξεχωριστές εισοδοί WPV το διάστημα 2008-2012 και 13 κρούσματα VDPV από διάφορες περιοχές του βόρειου κομματιού της χώρας. Το 2012 ανιχνεύτηκε στα λύματα WPV από δύο σημεία του Κάιρου, την ίδια περίοδο δεν υπήρχε κανέναν επιβεβαιωμένο περιστατικό AFP σχετιζόμενο με WPV. (GPEI, 2015)

Στο Πακιστάν ο ιός της Πολιομυελίτιδας ενδημεί ακόμα και σήμερα. Η επιτήρηση των λυμάτων ξεκίνησε το 2009. Το 2011 τα σημεία δειγματοληψίας ήταν 17, το 2012 έγιναν 23 και συνεχώς ο αριθμός και τα σημεία δειγματοληψίας επεκτείνονται με σκοπό την κάλυψη ενδεχόμενων κενών στην επιτήρηση. Ο WPV απομονώνεται συχνά από τα δείγματα λυμάτων παρόλη την απουσία κρουσμάτων από WPV σε κάποιες περιοχές ή την απουσία περιστατικών AFP σε άλλες. Η γενετική αλληλούχιση περιστατικών AFP και λυμάτων χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση των οδών μετάδοσης και την επιδημιολογική συσχέτιση των στελεχών με σκοπό την εύρεση των περιοχών υψηλού κινδύνου και την ενίσχυση της επιτήρησης τους. (GPEI, 2015)



Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων	% θετικά δείγματα	Έτος
256	0	0	2019
5756	1016	14,5	2020
8878	589	6,6	2021
12259	531	4,3	2022
3290	75	2,3	2023

Πίνακας 3 Δειγματοληψίες λυμάτων τα έτη 2019-2023, Παγκόσμια δεδομένα (Chard, 2020) (Rachlin, 2022) (Lee, 2023)

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων από την επιτήρηση λυμάτων θέλει μεγάλη προσοχή και τεχνογνωσία καθώς πρέπει να ληφθούν υπόψιν πολλοί παράγοντες, όπως τα ποσοστά αποβολής και ο χρόνος εμφάνισης κάθε παθογόνου. Άλλος παράγοντας που δυσχεραίνει την διαδικασία της ανάλυσης είναι η μικρή συγκέντρωση των παθογόνων στα λύματα, καθώς αραιώνονται, ειδικά όσο αυξάνεται ο αριθμός των ατόμων που αποτελούν μέρος του ίδιου αποχετευτικού συστήματος. Επίσης, η χαμηλή βιωσιμότητα των περισσότερων παθογόνων στα λύματα περιορίζει τις μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευσή τους. Καλλιεργητικές μέθοδοι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τους παραπάνω λόγους. Άρα η ανίχνευση τους βασίζεται στην αναζήτηση βιοδεικτών, που είναι ανεξάρτητοι από την βιωσιμότητα του παθογόνου. (Kilaru κ.ά., 2023) (National Academies of Sciences κ.ά., 2023)

Άλλοι περιορισμοί αφορούν την αδυναμία εξατομικευμένης διάγνωσης και ανίχνευσης των μολυσματικών ατόμων ή την κινητικότητα των πληθυσμών σε οποιαδήποτε δεδομένη περιοχή. Άρα αποτελεί έναν αδρό δείκτη της εικόνας ενός παθογόνου στην κοινότητα. (National Academies of Sciences κ.ά., 2023)

Η πιο συχνή μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), μέσω της οποίας ανιχνεύεται το γενετικό υλικό, DNA ή RNA, του παθογόνου, η οποία χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για την ανίχνευση παθογόνων σε λύματα την δεκαετία του 1990. Η PCR ενισχύσει στοχευμένες γενετικές περιοχές του προς ανίχνευση παθογόνου, μετριάζοντας κάπως το πρόβλημα της χαμηλής συγκέντρωσης. Το προϊόν της PCR μπορεί αργότερα να χρησιμοποιηθεί για αλληλούχιση, μέσω της οποίας μπορεί να γίνει ανίχνευση και των παραλλαγών των παθογόνων. Οι παραπάνω τεχνικές δεν απαιτούν το παθογόνο να είναι ζωντανό. (National Academies of Sciences κ.ά., 2023)

Η επιτήρηση λυμάτων για ειδικό σκοπό (ad hoc) είναι η στοχευμένη δειγματοληψία και επεξεργασία δειγμάτων από συγκεκριμένα σημεία σε διαφορετικές πόλεις, ή τοποθεσίες υπό ειδικές συνθήκες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνται για περιορισμένο χρονικό διάστημα το οποίο συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 6 έως 12 μηνών. Η ad hoc επιτήρηση λυμάτων μπορεί να συμβάλλει στην κατανόηση της



γεωγραφικής έκτασης της μετάδοσης των VDPV και την χρονική διάρκεια της μετάδοσης. (GPEI, 2020)

Η επιτήρηση των λυμάτων για την ανίχνευση του ιού της Πολιομυελίτιδας έχει δύο διακριτούς αλλά σχετικούς ρόλους. Ο πρώτος αφορά την ανίχνευση των κυκλοφορούντων ιών της Πολιομυελίτιδας στην κοινότητα, ως συμπληρωματικό μέτρο της παρακολούθησης των περιστατικών AFP για ύποπτα περιστατικά Πολιομυελίτιδας. Επίσης, είναι δυνατός ο εντοπισμός της μετάδοσης του WPV στις ενδημικές χώρες, ακόμα και όταν τα άτομα που μολύνονται δεν εμφανίζουν συμπτώματα. Αποτελεί χρήσιμο εργαλείο καθώς δίνει πολλές σημαντικές πληροφορίες και έτσι μπορεί να γίνει αντιληπτή η είσοδος κρουσμάτων σε χώρες στις οποίες έχει εξαλειφθεί ο ιός, η κυκλοφορία VDPV στελεχών και η επιβεβαίωση της παρουσίας των εμβολιακών στελεχών ύστερα από εκστρατείες εμβολιασμού με το OPV. 126 127 (GPEI, 2020) (WHO, 2023a)

Στις ενδημικές χώρες η επιτήρηση λυμάτων είναι συμπληρωματικό μέτρο της παρακολούθησης των περιστατικών AFP. Η γενετική αλληλούχιση μπορεί να βοηθήσει στην συσχέτιση των απομονώσεων με στελέχη που κυκλοφορούν στην χώρα την συγκεκριμένη περίοδο ή αν πρόκειται για είσοδο άλλων στελεχών από άλλες ενδημικές χώρες. Παρόλο που οι πληροφορίες από την επιτήρηση λυμάτων είναι πολύτιμες, συστήνεται στις ενδημικές χώρες να επικεντρώνονται στην παρακολούθηση των περιστατικών AFP. (GPEI, 2015) (WHO, 2023a)

Σε χώρες όπου ο WPV κυκλοφορούσε πρόσφατα, η επιτήρηση των λυμάτων βοηθάει στην επιβεβαίωση της παύσης της κυκλοφορίας του, σε συνδυασμό πάντα με την παρακολούθηση των περιστατικών AFP. Η ανίχνευση του ιού στα λύματα ελλείπει περιστατικών AFP μπορεί να δηλώνει την μη επάρκεια της παρακολούθησης των περιστατικών AFP. Η γενετική αλληλούχιση μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό της μακροχρόνιας «σιωπηλής» τοπικής κυκλοφορίας του ιού ή αν η παρουσία του ιού οφείλεται σε νέες εισαγωγές. (GPEI, 2015) (WHO, 2023a)

Σε χώρες με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης έξαρσης κρουσμάτων λόγω εισαγωγών από άλλες χώρες η συστηματική επιτήρηση των λυμάτων μπορεί να φανεί πολύτιμη καθώς μπορεί να βοηθήσει στον έγκαιρο εντοπισμό του ιού, πριν την εμφάνιση κρουσμάτων και την λήψη κατάλληλων μέτρων με σκοπό τον περιορισμό της μετάδοσης. (GPEI, 2015) (WHO, 2023a)

Χώρες με υψηλή εμβολιαστική κάλυψη, ευαίσθητο σύστημα παρακολούθησης περιστατικών AFP και μικρή πιθανότητα ευρείας μετάδοσης του ιού θεωρούνται χώρες χαμηλού κινδύνου και η επιτήρηση λυμάτων είναι χρήσιμη στην αναζήτηση στελεχών VDPVs. Συστήνεται η προσπάθεια διατήρηση της μεγάλης ευαισθησίας της



παρακολούθησης των AFP περιστατικών και της υψηλής εμβολιαστικής κάλυψης. (GPEI, 2015) (WHO, 2023a)

Υπάρχουν ομάδες ανθρώπων ή περιοχές όπου υπάρχει αυξημένος κίνδυνος μόλυνσης και μετάδοσης του ιού της Πολιομυελίτιδας. Σχολεία και γενικά δομές όπου υπάρχει συγκεντρωμένος μεγάλος αριθμός παιδιών παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες παρουσία του ιού καθώς ο ιός μολύνει κυρίως παιδιά, ομοίως και δομές φιλοξενίας προσφύγων, όπου η εμβολιαστική κάλυψη για τον WPV μπορεί να μην είναι επαρκής. Φαρμακευτικές εταιρίες που παράγουν εμβόλια για τον WPV και γενικά εργαστήρια που μπορεί να διαχειρίζονται με οποιονδήποτε τρόπο τον WPV θεωρούνται υψηλού κινδύνου για μετάδοση του ιού. Η επιτήρηση των λυμάτων σε τέτοιες εγκαταστάσεις μπορεί να παρακολουθεί ενδεχόμενη παρουσία και εξάπλωση του ιού στην υπόλοιπη κοινότητα. (GPEI, 2015) (WHO, 2023a)

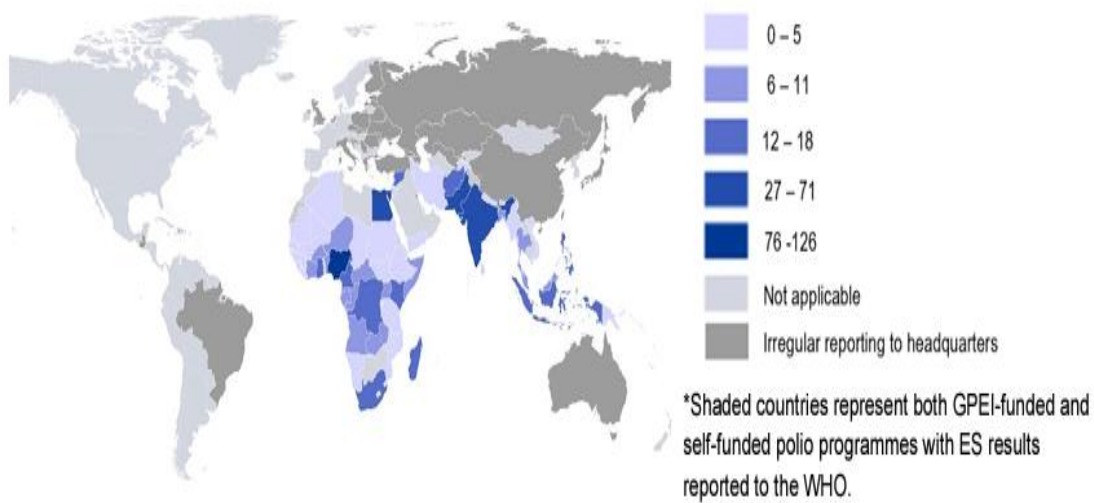
Η επιτήρηση των λυμάτων παίζει διαφορετικό ρόλο ανάλογα με την κατάσταση που βρίσκεται μια χώρα και εξυπηρετεί διαφορετικούς σκοπούς. Αν λειτουργεί ως συμπληρωματικό μέτρο παρακολούθησης για την επιβεβαίωση της εξάλειψης του WPV από την κοινότητα, προτείνεται ένα μακροπρόθεσμο και συστηματικό πρόγραμμα επιτήρησης αντιπροσωπευτικού πληθυσμού. Η εβδομαδιαία ή διεβδομαδιαία δειγματοληψία για χρονικό διάστημα 1-3 ετών από την τελευταία απομόνωση του WPV είναι η συνιστώμενη συχνότητα. (GPEI, 2015) (WHO, 2023a)

Αν υπάρχει περίπτωση επαναισθαγωγής του WPV ή εμφάνιση περιστατικών cVDPV τότε η επιτήρηση των λυμάτων προτείνεται να πραγματοποιείται για πιο σύντομο χρονικό διάστημα, αλλά όχι μικρότερο του ενός έτους, με πιο συχνές δειγματοληψίες σε περιοχές με πληθυσμούς υψηλής επικινδυνότητας. (GPEI, 2015) (WHO, 2023a)

Η GPEI, από το 2013, υποστήριζε την επιτήρηση λυμάτων σε 5 χώρες. Το 2016 δημιουργήθηκε το Σχέδιο Επέκτασης της Επιτήρησης Λυμάτων για τον ιό της Πολιομυελίτιδας (Polio Environmental Surveillance Expansion Plan - PESEP). Έτσι, η GPEI ξεκίνησε την επιτήρηση των λυμάτων σε περισσότερα σημεία στις χώρες που ενδημούσαν εκείνο το διάστημα, ενώ παράλληλα ξεκίνησε την επιτήρηση σε 6 επιπλέον χώρες. Μέχρι το τέλος του 2019, άλλες 26 χώρες ξεκίνησαν να εφαρμόζουν την επιτήρηση λυμάτων. Σύμφωνα με την GPEI, σήμερα το πρόγραμμα υποστηρίζει την επιτήρηση λυμάτων σε 550 σημεία, σε 45 χώρες και επεξεργάζονται περισσότερα από 12.000 δείγματα, ετησίως. (WHO, 2023a)



«Κόλα Κωνσταντίνα», «Αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας σε
λύματα από αστικές περιοχές και δομές φιλοξενίας προσφύγων»



Εικόνα 11 Παγκόσμια κατανομή της επιτήρησης λυμάτων για τον ιό της Πολιομυελίτιδας (GPEI, 2022a)



9. Μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης

Τα κλινικά δείγματα που επιλέγονται για την ανίχνευση των ιών της Πολιομυελίτιδας είναι εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), φαρυγγικά επιχρίσματα, πρωκτικά επιχρίσματα και δείγματα κοπράνων. Το πιο αξιόπιστο δείγμα για την ανίχνευση του ιού της Πολιομυελίτιδας είναι τα δείγματα κοπράνων, καθώς μεγάλες ποσότητες του ιού αποβάλλονται με τα κόπρανα. Εκτός από τα κλινικά δείγματα που αναφέρθηκαν, οι ιοί της Πολιομυελίτιδας μπορούν να απομονωθούν και από περιβαλλοντικά δείγματα, κυρίως αστικά λύματα και αποχετευτικά ύδατα. (Shulman κ.ά., 1997)

Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν για τη διαφοροποίηση των WPVs από τα VDPVs στελέχη βασίζονταν στις βιολογικές, φυσικοχημικές και αντιγονικές διαφορές τους. Οι μέθοδοι δείκτη RCT και αντιγονικού δείκτη ήταν αυτές που εφαρμόζονταν πιο συχνά. (van Loon κ.ά., 1993) (Böttiger, 1968)

Μέθοδος δείκτη RCT

Δείγμα από κυτταροκαλλιέργεια επωάζεται σε αυξημένες θερμοκρασίες (39,5-39,9°C). Δείγμα από την ίδια κυτταροκαλλιέργεια επωάζεται στην τυπική θερμοκρασία ανάπτυξης του ιού της Πολιομυελίτιδας, δηλαδή 35 °C. Στην συνέχεια συγκρίνεται ο τίτλος του ιού σε αυτά τα δείγματα ύστερα από την επώαση. Αν οι τίτλοι διαφέρουν λιγότερο από 10^2 φορές τότε το στέλεχος χαρακτηρίζεται ως RCT-θετικό, ενώ αν διαφέρουν τουλάχιστον 10^4 φορές το στέλεχος χαρακτηρίζεται ως RCT-αρνητικό. Τα άγρια στελέχη του ιού της Πολιομυελίτιδας είναι RCT-θετικά, ενώ τα ζωντανά εξασθενημένα στελέχη του είναι RCT-αρνητικά. (van Loon κ.ά., 1993) (Böttiger, 1968)

Μέθοδος αντιγονικού δείκτη

Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν αντιοροί που αναπτύχθηκαν κατά των WPVs και VDPVs. Χρησιμοποιούνταν πολύ για την διαφοροποίηση των στελεχών του ιού της Πολιομυελίτιδας, αν και ήταν μερικώς ειδικοί για τα WPVs και VDPVs στελέχη. Είχαν αναπτυχθεί δύο τεχνικές βασισμένες σε αυτούς τους αντιορούς, η κατά McBride και η κατά Wecker τεχνική. Και οι δύο παραλλαγές είναι τεχνικά απαιτητικές. (van Loon κ.ά., 1993)

Σύμφωνα με την προσέγγιση του McBride, ιικά στελέχη επωάζονται με τους αντιορούς. Στην συνέχεια γίνεται προσδιορισμός της μολυσματικότητας τους με τη μέθοδο της πλάκας. Ο ρυθμός εξουδετέρωσης τους συγκρίνεται με αυτόν από πρότυπα στελέχη του ιού. Η προσέγγιση του Wecker επικεντρώνεται στην μείωση



του μεγέθους ή του αριθμού των πλακών που δημιουργούνται κατά τον πολλαπλασιασμό του ιού παρουσία των αντιορών. (van Loon κ.ά., 1993)

Στα τέλη του 1970, ο ΠΟΥ πραγματοποίησε μία έρευνα με σκοπό να προσδιοριστεί η συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων που χρησιμοποιούν τις τεχνικές δείκτη RCT και αντιγονικού δείκτη, καθώς και την επιλογή της πιο αξιόπιστης μεθόδου για τη διαφοροποίηση των WPVs και VDPVs. Στην έρευνα συμπεριλήφθηκε και η μέθοδος ορόεξουδετέρωσης με cross-absorbed αντορούς. (van Loon κ.ά., 1993)

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οροεξουδετέρωση με cross-absorbed αντορούς ήταν η πιο αξιόπιστη μέθοδος. Οι άλλες δύο μέθοδοι στερούνταν ειδικότητας και έτσι υπήρχαν πολλά ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, γεγονός που τις κατέστησε αναξιόπιστες μεθόδους. (van Loon κ.ά., 1993)

Η εργαστηριακή διάγνωση πια βασίζεται σε παραδοσιακές τεχνικές, όπως η απομόνωση, η οροτυπική ταυτοποίηση και ο έλεγχος των αντισωμάτων, καθώς και σε μοριακές μεθόδους. (Shulman κ.ά., 1997) (Siafakas κ.ά., 2001)



9.1 Κλασικές μέθοδοι

Κυτταροκαλλιέργειες

Η απομόνωση των ιών της Πολιομυελίτιδας πραγματοποιείται με την χρήση κυτταρικών σειρών. Ο ιός της Πολιομυελίτιδας πολλαπλασιάζεται σε πολλές κυτταρικές σειρές, πρωτογενείς ή συνεχείς. Ο ΠΟΥ προτείνει δύο κυτταρικές σειρές για την καλλιέργεια και απομόνωση του, την L20B που προέρχεται από γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ποντικών έτσι ώστε να εκφράσουν το γονίδιο που κωδικοποιεί τον PVR και την RD που προέρχεται από ανθρώπινο ραβδομυοσάρκωμα. (WHO, 2004)

Τα L20B κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα στην παρουσία του ιού της Πολιομυελίτιδας, η οποία επιβεβαιώνεται με την χαρακτηριστική κυτταροπαθογόνο επίδραση (CPE). Υπάρχει η πιθανότητα εμφάνισης CPE από άλλους ιούς, όπως είναι οι αδενοϊοί ή άλλοι εντεροϊοί, αλλά η CPE τους είναι χαρακτηριστική και διαφέρει από αυτή που προκαλείται από τους ιούς της Πολιομυελίτιδας. Τα RD κύτταρα είναι, επίσης, πολύ ευαίσθητα στους ιούς της Πολιομυελίτιδας αλλά και σε πολλούς ιούς ECHO και εντεροϊούς με χαρακτηριστική CPE ο καθένας. (WHO, 2004)

Δοκιμασία εξουδετέρωσης

Αφού πραγματοποιηθεί η απομόνωση του ιού πρέπει να γίνει και η ταυτοποίηση του ορότυπου του. Το Βασιλικό Ινστιτούτο για τη Δημόσια Υγεία και το Περιβάλλον έχει παρασκευάσει ειδικούς αντιορούς για τους 3 διαφορετικούς ορότυπους του ιού της Πολιομυελίτιδας. Πραγματοποιείται επώαση της κυτταροκαλλιέργειας με τους ειδικούς αντιορούς. Ο αντιορός που εμποδίζει την δημιουργία CPE υποδηλώνει και τον ορότυπο του ιού. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται δοκιμασία εξουδετέρωσης και χαρακτηρίζεται από ειδικότητα. Συνήθως τα αποτελέσματα είναι έτοιμα σε 3 με 5 ημέρες. (WHO, 2004) (van Loon κ.ά., 1993)

ELISA

Η ELISA χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των αντισωμάτων, τόσο IgM όσο και IgG. Τα IgM αντισώματα παράγονται κατά την πρώτη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Άρα δίνεται η ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης από τον ιό της Πολιομυελίτιδας. Οι αντιοροί που σχεδιάζονται μπορούν να διακρίνουν αν πρόκειται για άγριο ή προερχόμενο από εμβόλιο στέλεχος για κάθε ορότυπο. Πρόκειται για μια οικονομική μέθοδο, εύκολη στην εκτέλεση και ειδική. Ωστόσο παρουσιάζεται δυσκολία στην παραγωγή των αντιορών (WHO, 2004) (van Loon κ.ά., 1993) (Glikmann κ.ά., 1987)



Μονοκλωνικά αντισώματα

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι μια ομάδα αντισωμάτων που παράγονται από πανομοιότυπους κλώνους Β λεμφοκυττάρων κατά ενός συγκεκριμένου αντιγόνου. Έχουν αναπτυχθεί πάνελ μονοκλωνικών αντισωμάτων για καθένα από τους τρεις ορότυπους του ιού της Πολιομυελίτιδας. Το πάνελ για κάθε ορότυπο περιλαμβάνει 6 αντισώματα με διαφορετικούς βαθμούς ειδικότητας του στελέχους. Προβλήματα σχετικά με τη σταθερότητα, την ανασύσταση και την ειδικότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων έχουν παρατηρηθεί. (van Loon κ.ά., 1993)



9.2 Μοριακές μέθοδοι

Οι μοριακές τεχνικές τα τελευταία χρόνια έχουν αντικαταστήσει τις παραδοσιακές τεχνικές καθώς είναι χρονοβόρες, κοστοβόρες. Οι κυριότερες μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των ιών της Πολιομυελίτιδας είναι οι ακόλουθες. (WHO, 2004) (van Loon κ.ά., 1993)

Χαρτογράφηση ολιγονουκλεοτιδίων T1

Είναι η πρώτη μοριακή τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τη γονιδιωματική ανάλυση της προέλευσης ενός στελέχους του ιού της Πολιομυελίτιδας. Η ριβονουκλεάση T1 προκαλεί τη διάσπαση του RNA του ιού σε υπολείμματα γουανοσίνης και έτσι δημιουργούνται πολλά ολιγονουκλεοτίδια, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από τη θέση των βάσεων στο RNA. Μετά την ανάλυση με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση, τα μεγαλύτερα, δομικά μοναδικά, ραδιοσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια αποδίδουν χαρακτηριστικό μοτίβο μεταξύ 50 και 60 κηλίδων, το οποίο αποτελεί το αποτύπωμα του συγκεκριμένου στελέχους. Πρόκειται για μια ευαίσθητη μέθοδο για την σύγκριση διάφορων στελεχών του ιού της Πολιομυελίτιδας. Επίσης, χαρακτηρίζεται και από αναπαραγωγιμότητα, όταν εφαρμόζεται από εξειδικευμένα εργαστήρια. Ωστόσο, πρόκειται για μια απαιτητική μέθοδο όσον αφορά τις τεχνικές δεξιότητες και γι αυτό δεν είναι εύκολη η εφαρμογή της σε πολλά εργαστήρια παγκοσμίως. (van Loon κ.ά., 1993)

Υβριδισμός με ανιχνευτή

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ειδικούς ανιχνευτές για συγκεκριμένες αλληλουχίες στο RNA του ιού. Πρόκειται για μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδο. Συνθετικοί ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές και υπογονιδιωματικοί ριβοανιχνευτές έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και διαφοροποίηση των ιών της Πολιομυελίτιδας. Οι ανιχνευτές αυτοί παράγονται εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες. Επίσης, η χρήση μη ραδιενεργών ανιχνευτών δεν επηρεάζει την ευαισθησία της μεθόδου. Οι ανιχνευτές έχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές σε αλληλουχίες που βρίσκονται κοντά στο 5' άκρο του γονιδίου που κωδικοποιεί την VP1 και αυτό γιατί πρόκειται για περιοχές που είναι συντηρημένες ανάμεσα σε συγγενικά στελέχη. Για τον σχεδιασμό των ανιχνευτών είναι απαραίτητη η γνώση της αλληλουχίας του RNA του στελέχους προς αναζήτηση. Το γεγονός αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα όσον αφορά τους ιούς της Πολιομυελίτιδας που προέρχονται από τα εμβόλια, καθώς σε αυτά τα στελέχη δεν αναμένεται ιδιαίτερη γονιδιωματική εξέλιξη. Αντιθέτως, τα άγρια στελέχη παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια, άρα υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί



γονότυποι τους. Άρα απαιτείται ο σχεδιασμός πολλών διαφορετικών ανιχνευτών έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση όσο το δυνατό περισσότερων διαφορετικών γονότυπων. Η χρήση της μεθόδου για επιτήρηση σε περιοχές με αυτόχθονα άγρια στελέχη του ιού είναι ιδανική. Ωστόσο, σε περίπτωση εισαγόμενων άγριων στελεχών υπάρχει η πιθανότητα αδυναμίας ανίχνευσής τους. Η αναγνώριση τους ως άγρια στελέχη θα πραγματοποιηθεί έμμεσα, λόγω της αδυναμίας τους να υβριδοποιηθούν με τους ειδικούς ανιχνευτές για τα εμβολιακά στελέχη. (van Loon κ.ά., 1993)

Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος RT-PCR (αντίστροφη μεταγραφή - αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του γενετικού υλικού του ιού της Πολιομυελίτιδας σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα και την ενδοτυπική διάκριση των στελεχών του. Η PCR δίνει τη δυνατότητα ενίσχυσης ενός συγκεκριμένου τμήματος γενετικού υλικού. Αυτό πραγματοποιείται με την χρήση ειδικών εκκινητών, με αλληλουχία συμπληρωματική προς την αλληλουχία ενδιαφέροντος. Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία στάδια, την αποδιάταξη, τον υβριδισμό και την επέκταση. Κάθε στάδιο πραγματοποιείται σε διαφορετική θερμοκρασία. Στο πρώτο στάδιο η θερμοκρασία ορίζεται γύρω στους 95°C για 1-5 δευτερόλεπτα, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA. Στην συνέχεια πραγματοποιείται υβριδισμός της μονής έλικας του DNA με τους εκκινητές, με μείωση της θερμοκρασίας στους 60°C. Στο τελικό στάδιο γίνεται επιμήκυνση των εκκινητών με τη δράση της DNA πολυμεράσης, παρουσία dNTPs, έχοντας ως εκμαγείο τη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA. Η θερμοκρασία ανεβαίνει γύρω στους 72°C. Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για 25-45 φορές. Η RT-PCR χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του RNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, που καταλύει την σύνθεση του RNA έχοντας ως μήτρα RNA. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία συμπληρωματικού cDNA, το οποίο είναι πιο σταθερό από το RNA. Άρα η δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης είναι η μετατροπή του αρχικού RNA σε DNA. Τα ενισχυμένα τμήματα DNA που προκύπτουν από την PCR εντοπίζονται με τη χρήση χρωστικών που φθορίζουν. (WHO, 2004) (Siafakas κ.ά., 2002) (Farkas & Holland, 2009)

Για την ανίχνευση και ενδοτυπική διάκριση των ιών της Πολιομυελίτιδας χρησιμοποιούνται κατάλληλοι εκκινητές που στοχεύουν σε συντηρημένες περιοχές του ιϊκού RNA, όπως είναι η 5'UTR και η VP1 περιοχή. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ευαισθησία, ειδικότητα, άμεσα αποτελέσματα αλλά δεν μπορεί να διακρίνει τα ζώντα από τα νεκρά ιϊκά σώματα, άρα δεν μπορεί να γίνει γνωστό αν πρόκειται για παλιά ή πρόσφατη λοίμωξη. Διάφορες παραλλαγές της RT-PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση του ιού της Πολιομυελίτιδας, όπως η real-time



RT-PCR για πιο άμεσα αποτελέσματα, η nested PCR για μεγαλύτερη ευαισθησία κ.α. (WHO, 2004) (Siafakas κ.ά., 2002) (Siafakas κ.ά., 2003) (Oberste κ.ά., 2003)

RFLP

Το ιϊκό RNA μεταγράφεται και πολλαπλασιάζεται με τη μέθοδο της PCR. Το προϊόν της PCR, κόβεται σε τμήματα διαφόρων μεγεθών, ύστερα από την πέψη του με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα θραύσματα αυτά διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης και συγκρίνονται με πρότυπα γονιδιωματικά τμήματα διαφορετικών στελεχών. Η RFLP χρησιμοποιείται για την εξέταση της συσχέτισης των ιϊκών γονιδιωμάτων. Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από ειδικότητα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενδοτυπική διαφοροποίηση των ιών της Πολιομυελίτιδας αλλά μπορεί να δώσει και πληροφορίες επιδημιολογικού ενδιαφέροντος. (van Loon κ.ά., 1993)

Γονιδιωματική αλληλούχιση

Η γονιδιωματική αλληλούχιση του ιϊκού γενώματος, ή τμήματος αυτού, αποτελεί την ιδανική μέθοδο για την εξέταση της συσχέτισης στελεχών του ιού της Πολιομυελίτιδας. Ο ιός της Πολιομυελίτιδας μεταλλάσσεται συνεχώς. Οι μεταλλάξεις που είναι σταθερές στην VP1 περιοχή είναι συνήθως σιωπηλές και δεν επηρεάζουν τη δομή του καψιδίου και κατ'επέκταση ούτε η βιωσιμότητα του μεταλλαγμένου ιού. Άρα υπάρχουν πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις του ιού της Πολιομυελίτιδας. Μέσω της αλληλούχισης είναι δυνατή η ανίχνευση και ο προσδιορισμός των μεταλλάξεων αυτών με σκοπό την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων. Οι αλληλουχίες της VP1 περιοχής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διερεύνηση της μετάδοσης και της πορείας του ιού. Η διερεύνηση της γενετικής συγγένειας στελεχών του ιού της Πολιομυελίτιδας, μέσω της αλληλούχισης της VP1 περιοχής επιτρέπει τον εντοπισμό της πηγής μίας έξαρσης αλλά και την κίνηση του ιού από περιοχή σε περιοχή ή και από χώρα σε χώρα. Είναι δυνατή η διάκριση περιοχών με επίμονη μετάδοση του ιού από περιοχές με συνεχείς εισαγωγές κρουσμάτων. (van Loon κ.ά., 1993) (Farkas & Holland, 2009)



10. Εξέλιξη των ιών της Πολιομυελίτιδας

Οι ιοί της Πολιομυελίτιδας, όπως και όλοι οι RNA ιοί, αναπτύσσονται με υψηλούς ρυθμούς. Η ποικιλομορφία τους οφείλεται κυρίως σε δύο μηχανισμούς, τη μεταλλαξιγένεση και τον γενετικό ανασυνδυασμό. (Domingo & Holland, 1997)

10.1 Μεταλλαξιγένεση

Ο υψηλός ρυθμός μεταλλάξεων που παρατηρείται στους ιούς της Πολιομυελίτιδας οφείλεται στην έλλειψη μηχανισμών ελέγχου της πιστότητας της αντιγραφής (proof-reading) της RNA πολυμεράσης του ιού ($3D^{pol}$), σε αντίθεση με τις DNA πολυμεράσες των DNA ιών. Υπολογίζεται ότι η συχνότητα λάθους της $3D^{pol}$ ανά κύκλο είναι 10^{-4} με 10^{-5} ανά βάση, ενώ για τις DNA πολυμεράσες η συχνότητα αυτή κυμαίνεται από 10^{-8} μέχρι 10^{-11} ανά βάση. Η μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων έχει οδηγήσει την δημιουργία πολλών πληθυσμών του ιού με διαφορετικούς γονότυπους και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως 'quasi-species' (περίπου είδη). Ένα άγριο στέλεχος χαρακτηρίζεται ως 'quasi-species' όταν ο πληθυσμός τους δεν έχει μία μοναδική αλληλουχία αλλά μοιράζεται μια κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Αυτή η γενετική ποικιλομορφία των ιών της Πολιομυελίτιδας τους προσφέρει την ικανότητα προσαρμογής σε νέα περιβάλλοντα. (Ward & Flanagan, 1992) (Rodriguez-Wells κ.ά., 2001) (Domingo κ.ά., 1985) (Parvin κ.ά., 1986)

Οι περιοχές που υφίστανται τις περισσότερες μεταλλάξεις είναι εκείνες που εκφράζουν τα γονίδια των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3. Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε αυτές τις περιοχές πιστεύεται ότι σχετίζονται με τη μεταστροφή των εμβολιακών εξασθενημένων στελεχών σε νευρομολυσματικά. Από τις δομικές πρωτεΐνες, η VP1 παρουσιάζει την μεγαλύτερη ευμεταβλητότητα. Ο λόγος πιστεύεται ότι είναι διότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συμμετέχει στην έκφραση των περισσότερων αντιγονικών θέσεων του ιού, οι οποίες είναι απαραίτητες για την επιβίωση του. Άρα δέχεται την μεγαλύτερη εξελικτική πίεση από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Μεταλλάξεις δεν υφίστανται όλες οι περιοχές των δομικών πρωτεϊνών. Οι περιοχές που σχετίζονται με την δομή του καψιδίου και την αλληλεπίδραση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα PVR διατηρούν την αλληλουχία τους διότι βρίσκονται στο εσωτερικό της αύλακας όπου η αναγνώριση από τα αντισώματα δεν είναι δυνατή και επομένως αποφεύγουν την αντιγονική πίεση. Μεγάλη ευμεταβλητότητα παρουσιάζει και η 5'UTR, με εξαίρεση τα cloverleaf και CRE που συμμετέχουν στην αντιγραφή του ιού, καθώς και το IRES που συμμετέχει στη μετάφρασή του. Οι περιοχές γενετικού υλικού του ιού που δεν σχετίζονται με τις δομικές πρωτεΐνες είναι πιο συντηρημένες. (Georgescu κ.ά., 1997) (Martín κ.ά., 2002) (Muir κ.ά., 1998)



10.2 Μηχανισμοί ανασυνδυασμού

Ο γενετικός ανασυνδυασμός αποτελεί έναν ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης των ιών. Οι ιοί της Πολιομυελίτιδας ήταν οι πρώτοι RNA ιοί στους οποίους παρατηρήθηκε ανταλλαγή γενετικού υλικού. Η συχνότητα ανταλλαγής γενετικού υλικού βρέθηκε ότι είναι ισότιμη με αυτή της ενσωμάτωσης μεταλλάξεων. (Guillot κ.ά., 2000)

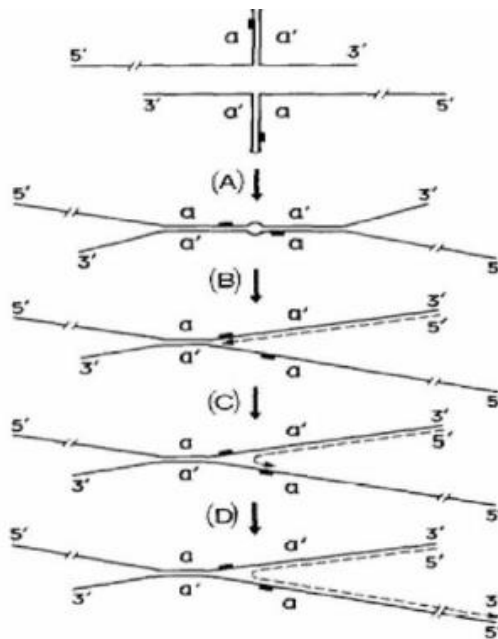
Ο γενετικός ανασυνδυασμός του γενετικού υλικού των ιών της Πολιομυελίτιδας πραγματοποιείται σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί ταυτόχρονα με ιικά στελέχη είτε του ίδιου ορότυπου, η λεγόμενη ομοτυπία, είτε διαφορετικών ορότυπων, που ονομάζεται ετεροτυπία. (Muir κ.ά., 1998) (Guillot κ.ά., 2000)

Οι περισσότεροι ανασυνδυασμοί των ιών της Πολιομυελίτιδας οφείλονται στα εμβολιακά στελέχη του OPV. Το εμβόλιο περιέχει εξασθενημένα στελέχη και των 3 ορότυπων του ιού και έτσι ευνοείται η ταυτόχρονη μόλυνση του κυττάρου από διάφορους ανασυνδυασμούς των ορότυπων αυτών. Ανασυνδυασμένα στελέχη Sabin έχουν απομονωθεί τόσο από υγιή άτομα που είχαν εμβολιαστεί, όσο και από άτομα που εμφάνισαν VAPP. (Guillot κ.ά., 2000) (Furlone κ.ά., 1993) (Blomqvist κ.ά., 2003) (Karakasiliotis κ.ά., 2004)

Έχουν προταθεί δύο βασικοί μηχανισμοί ανασυνδυασμού, ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch mechanism) και ο μηχανισμός ρήξης-ένωσης (mechanism of the breaking and joining). (Kirkegaard & Baltimore, 1986) (Gmyl κ.ά., 1999)

10.2.1 Μηχανισμός αλλαγής μήτρας

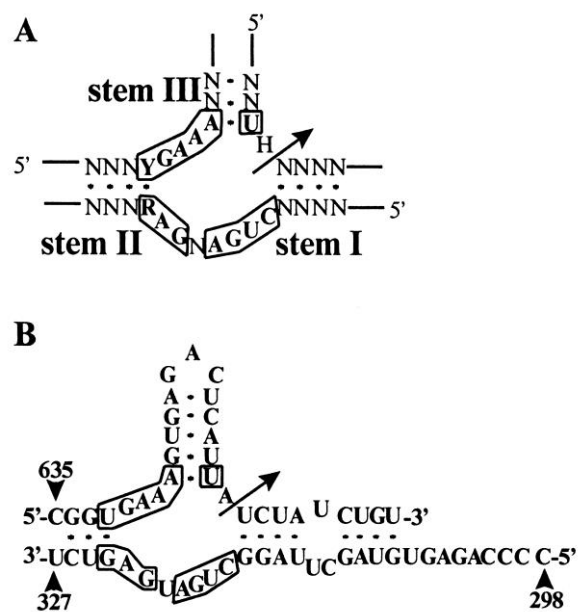
Ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας είναι ένας αντιγραφικός μηχανισμός. Ο ανασυνδυασμός συμβαίνει στο στάδιο επιμήκυνσης ενός νεοσυντιθέμενου μορίου RNA, κατά την αντιγραφή του ιού. Η 3D^{pol} συναντά εμπόδιο κατά την σύνθεση του RNA με αποτέλεσμα τη διακοπή της επιμήκυνσης. Η πολυμεράση αποδεσμεύεται από το μόριο RNA και μπορεί να δεσμευτεί σε άλλο κλώνο και να συνεχίσει την αντιγραφή. Έχει προταθεί ότι το εμπόδιο μπορεί να είναι είτε κάποια σταθερή δευτεροταγής δομή είτε κάποιο λάθος νουκλεοτίδιο που προστέθηκε από την πολυμεράση του ιού στο νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο. Αν η μετάβαση της πολυμεράσης από τον έναν κλώνο στον άλλο είναι ακριβής τότε ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος, ενώ αν η μετάβαση δεν είναι ακριβής ο ανασυνδυασμός είναι μη ομόλογος και επηρεάζει την βιωσιμότητα των νέων στελεχών. Ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας είναι ο επικρατέστερος μηχανισμός ανασυνδυασμού του ιού της Πολιομυελίτιδας. (Kirkegaard & Baltimore, 1986) (Romanova κ.ά., 1986)



Εικόνα 12 Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού αλλαγής μήτρας (Romanova κ.ά., 1986)

10.2.2 Μηχανισμός ρήξης-επανένωσης

Πρόκειται για έναν μη αντιγραφικό μηχανισμό ανασυνδυασμού. Ο μηχανισμός λειτουργεί με μόρια RNA κόβονται σε κάποια σημεία και τα εκτιθέμενα άκρα ενώνονται. Υπάρχουν δύο θεωρίες για το συγκεκριμένο είδος ανασυνδυασμού. Στην πρώτη θεωρία, οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί των μορίων RNA προσβάλλονται από εξωτερικό νουκλεόφιλο μόριο H_2O με αποτέλεσμα τη διάσπαση τους και την έκθεση των 5' και 3' άκρων τους. Τα εκτιθέμενα άκρα δημιουργούν μια δομή διακλάδωσης και ενώνονται μέσω της ενεργοποίησης της 5' φωσφορικής ομάδας. Η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει ότι ο φωσφοδιεστερικός δεσμός προσβάλλεται από το παρακείμενο 2-υδροξύλιο (εσωτερικό νουκλεόφιλο). Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ενός κυκλικού 2, 3-φωσφορικού άκρου και ενός 5-φωσφορικού άκρου. Τα άκρα αυτά μπορούν να ενωθούν μέσω της τρανσεστεροποίησης. (Gmyl κ.ά., 1999)



Εικόνα 13 Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού ρήξης-επανένωσης (Gmyl κ.ά., 1999)



*«Κόλα Κωνσταντίνα», «Αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας σε
λύματα από αστικές περιοχές και δομές φιλοξενίας προσφύγων»*

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Στόχος εργασίας

Η Ελλάδα θεωρείται χώρα απαλλαγμένη από τον ιό της Πολιομυελίτιδας από το 2002. Το τελευταίο περιστατικό πολιομυελίτιδας δηλώθηκε το 1996 και προήλθε από την είσοδο ανεμβολίαστων αθίγγανων παιδιών στην χώρα. Παρόλο που ο ιός έχει εκριζωθεί από την χώρα ο κίνδυνος επανεμφάνισης του δεν παύει να υπάρχει. Η Ελλάδα δέχεται πολύ συχνά μεγάλο αριθμό προσφύγων και μεταναστών από διάφορες χώρες. Τα μεταναστευτικά κύματα από χώρες ενδημικές ή και γειτονικές αυτών καθώς και οι κακές συνθήκες υγιεινής καθιστούν τους πληθυσμούς αυτούς υψηλού κινδύνου για την μετάδοση του ιού της Πολιομυελίτιδας.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η εξέταση αστικών λυμάτων και βοθρολυμάτων για την παρουσία του ιού της Πολιομυελίτιδας. Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος, το δείγμα θα αναλυθεί ώστε να γίνει η κατάταξη σε WPVs, VDPVs ή Sabin-like στελέχη του ιού της Πολιομυελίτιδας. Στο πλαίσιο της εργασίας πραγματοποιήθηκε σύγκριση δύο μεθόδων επεξεργασίας λυμάτων:

1. Μέθοδος κατακρήμνισης με την χρήση PEG/NaCl
2. Μέθοδος συμπύκνωσης με στήλες κατακράτησης



Μέθοδοι και υλικά

Συλλογή δειγμάτων

Υλικό της παρούσας εργασίας αποτέλεσαν αστικά λύματα και βοθρολύματα. Η συλλογή των λυμάτων πραγματοποιήθηκε το διάστημα Μάρτιος – Αύγουστος 2023 από τις εισόδους βιολογικών καθαρισμών Λάρισας, Βόλου, Ξάνθης και Αλεξανδρούπολης, ανά εβδομάδα, καθώς και από τους βόθρους της δομής φιλοξενίας προσφύγων στο Κουτσόχερο Λάρισας, ανά 10 ημέρες. Συνολικά συλλέχτηκαν 296 δείγματα αστικών λυμάτων, 70 από τη Λάρισα, 73 από το Βόλο, 78 από την Ξάνθη, 75 από την Αλεξανδρούπολη και 15 βοθρολύματα από το Κουτσόχερο. Τα λύματα στους βιολογικούς καθαρισμούς συλλέχτηκαν από αυτόματο σύστημα συλλογής, το οποίο λειτουργούσε καθ'όλη τη διάρκεια του 24ώρου από τις εισόδους των εγκαταστάσεων. Τα λύματα είναι ανεπεξέργαστα και αντιπροσωπευτικά του 24ώρου και ο όγκος που μεταφέρθηκε στο εργαστήριο ήταν 500ml. Η συλλογή του βοθρολύματος από το Κουτσόχερο πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πλαστικού περιέκτη, προσκολλημένου σε τηλεσκοπικό βραχίονα. Συνολικά υπάρχουν 4 βόθροι στη δομή. Από κάθε βόθρο συλλέχτηκαν 500ml, τα οποία ομογενοποιήθηκαν σε έναν πλαστικό αποστειρωμένο περιέκτη των 2lt. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν και συντηρήθηκαν υπό ψύξη στους 4°C μέχρι την επεξεργασία τους.



Επεξεργασία λυμάτων

Η επεξεργασία των λυμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στηλών κατακράτησης. Στο πλαίσιο της εργασίας πραγματοποιήθηκε σύγκριση της μεθόδου των στηλών κατακράτησης με τη μέθοδο κατακρήμνισης με την χρήση PEG/NaCl. Χρησιμοποιήθηκε H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς, στο οποίο ενοφθαλμίστηκε εμβολιακό στέλεχος Sabin1. Η ανάκτηση του γενετικού υλικού του Sabin1 φαίνεται στο στάδιο της PCR, όπου γίνεται και η σύγκριση των μεθόδων.

Το Sabin1 ενοφθαλμίζεται στο πρώτο στάδιο, με την πρωτεΐνάση, της μεθόδου κατακράτησης με στήλες, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η απελευθέρωση του γενετικού υλικού. Στη μέθοδο κατακρήμνισης με την χρήση PEG/NaCl το Sabin1 προστίθεται κατά την απομόνωση του γενετικού υλικού που πραγματοποιείται σε ανοιχτού τύπου αυτόματο μηχάνημα KingFisher Apex της ThermoScientific με το αντίστοιχο kit. Βακτηριοφάγος MS2 χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας.

Μέθοδος κατακρήμνισης με την χρήση PEG/NaCl και απομόνωση γενετικού υλικού

Αποτελεί κλασική και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο συμπύκνωσης λυμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο πρωτόκολλα με αυτήν τη μέθοδο, με διαφορετικούς αρχικούς όγκους δείγματος. Χρησιμοποιήθηκε H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς και ενοφθαλμίστηκε εμβολιακό στέλεχος Sabin1. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια που θα εφαρμοζόταν και στην περίπτωση που επεξεργαζόταν δείγμα λύματος.

Η ανάκτηση του γενετικού υλικού του εμβολιακού στελέχους Sabin1 υπολογίζεται ύστερα από την ενίσχυση με την RT-PCR. Το PEG σε συνδυασμό με το NaCl χρησιμοποιούνται με σκοπό την κατακρήμνιση των ιών. (Sapula κ.ά., 2021)

Στο πρώτο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν 105ml αρχικού δείγματος, τα οποία συμπυκνώθηκαν σε 400μl. Αρχικά προστέθηκε 1,5 gr γλυκίνης σε 105ml H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς όπου αναδεύτηκαν για 30 λεπτά σε μαγνητικό αναδευτήρα. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 4.700 g για 30 λεπτά, προκειμένου να καθιζάνουν τα στερεά υλικά. Στο υπερκείμενο, που συλλέχθηκε μετά την φυγοκέντρωση, προστέθηκαν 10,5 gr PEG και 2,364 gr NaCl, το μίγμα αναδεύτηκε μέχρι την ομογενοποίηση και φυγοκεντρήθηκε στα 12.000 g για 2 ώρες. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα που δημιουργήθηκε διαλύθηκε σε 400μl PBS. Τέλος το δείγμα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο eppendorf και αποθηκεύτηκε σε ψυγείο, στους 4 °C. (βλ. Παράρτημα Α)



Στο δεύτερο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν 2.000ml αρχικού δείγματος, τα οποία συμπυκνώθηκαν σε 1,5ml. Αρχικά το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 12000 g για 30 λεπτά για την καθίζηση των στερεών στοιχείων. Συλλέχτηκε το υπερκείμενο, στο οποίο προστέθηκε PEG6000 και NaCl σε ποσοστό 7% και 2,3%, αντίστοιχα. Το μίγμα αναδεύτηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε κινούμενη πλατφόρμα στους 4°C όπου αναδεύτηκε μέχρι το επόμενο πρωί. Στην συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε στα 12000 g για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε ενώ το ίζημα διαλύθηκε σε 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος TES, συλλέχτηκε σε αποστειρωμένο erpendorf και φυγοκεκτρήθηκε στα 12000 g για 5 λεπτά προκειμένου να γίνει καθίζηση τυχόν υπολειμμάτων PEG. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε σε νέο αποστειρωμένο erpendorf και αποθηκεύτηκε σε ψυγείο στους 4 °C. (βλ. Παράρτημα Α)

Το τελικό δείγμα και στις δύο περιπτώσεις είναι συμπυκνωμένο λύμα, έτοιμο προς απομόνωση γενετικού υλικού. Το στάδιο της απομόνωσης του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε μόνο στα δείγματα H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των μεθόδων επεξεργασίας των λυμάτων, και συμπυκνώθηκαν με τη μέθοδο PEG/NaCl. Η απομόνωση του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε σε αυτόματο μηχάνημα ανοιχτού τύπου KingFisher Apex της ThermoScientific με το αντίστοιχο kit. Το MagmaTM Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit βασίζεται στη μέθοδο των μαγνητικών σφαιριδίων για τη δέσμευση του γενετικού υλικού. Χρησιμοποιήθηκαν 200μl του δείγματος, ενώ το τελικό έκλουσμα είχε όγκο 50μl.

Αρχικά ονοματίστηκαν 4 πλάκες, που περιέχουν 96 βοθρία, ένα για κάθε δείγμα, ως εξής: Wash 1, Wash 2, Sample, Elution. Στην πλάκα Wash 1 προστέθηκαν 500μl Wash 1, στην πλάκα Wash 2 προστέθηκαν 500μl Wash 2, το οποίο είναι διάλυμα 80% αιθανόλης και στην πλάκα Elution προστέθηκαν 50μl H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς, σε κάθε βοθρίο ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Στην πλάκα Sample προστέθηκαν 5μl πρωτεΐνωση K, 10μl βακτηριοφάγου MS2 και 200μl από το δείγμα, αφού έχει ανακινηθεί καλά προηγουμένως, σε κάθε βοθρίο ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων. Η πρωτεΐνωση K συμμετέχει στην απελευθέρωση του γενετικού υλικού Παρασκευάστηκε μίγμα Binding Solution (265μl) και Total Nucleic Acid Magnetic Beads (10μl) για κάθε δείγμα, και μοιράστηκαν 275μl σε κάθε βοθρίο ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, στην πλάκα Sample. Οι 4 πλάκες, μαζί με ρύγχη και βάση για τα ρύγχη, τοποθετούνται στο αυτόματο μηχάνημα ανοιχτού τύπου KingFisher Apex της ThermoScientific. Το γενετικό υλικό που απομονώθηκε βρίσκεται στην πλάκα Elution. Με την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου απομόνωσης, η πλάκα Elution καλύφθηκε με αυτοκόλλητο MicroAmpTM Clear Adhesive Film, για την αποφυγή οποιασδήποτε επιμόλυνσης, και τοποθετήθηκε σε παγοπλάκα για την



άμεση χρήση της ή σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για μελλοντική χρήση. (βλ. Παράρτημα Γ)

Στήλες κατακράτησης

Αποτελεί γρήγορη και εύχρηστη τεχνική καθώς πραγματοποιείται κατακράτηση και εκχύλιση του νουκλεϊκού οξέος με την μέθοδο των στηλών, σε περίπου 2 ώρες. Απαιτούνται 40 ml του λύματος. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με το Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit, του οίκου Promega, και σύμφωνα με τις οδηγίες του kit. Η μέθοδος προσφέρει ταυτόχρονη συμπύκνωση των λυμάτων και εκχύλιση του γενετικού υλικού. Το τελικό προϊόν είναι εκλούόμενο γενετικό υλικό, όγκου 40μl, έτοιμο προς PCR. (Promega, 2023)

Η μέθοδος των στηλών κατακράτησης χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία όλων των λυμάτων της παρούσας εργασίας, καθώς και για την σύγκριση με τη μέθοδο κατακρήμνισης με την χρήση PEG/NaCl, όπου χρησιμοποιήθηκε H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς και ενοφθαλμίστηκε εμβολιακό στέλεχος Sabin1. Οι διαδικασίες των μεθόδων συμπύκνωσης πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο, ανεξάρτητα από το είδος του δείγματος, προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα. Τα αποτελέσματα από την σύγκριση με δείγμα νερού θα πρέπει να αντανakλούνται και στην περίπτωση που το δείγμα είναι λύμα. Επομένως, οι μεθοδολογίες πρέπει να είναι ίδιες και για τα δύο είδη δειγμάτων.

Αρχικά, προστέθηκαν 500μl πρωτεϊνάσης και 10μl βακτηριοφάγου MS2, σε 40ml δείγματος και επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό την απελευθέρωση του γενετικού υλικού. Ο βακτηριοφάγος χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 3000 g για 10 λεπτά έτσι ώστε να καθιζάνουν τα υπάρχοντα στερεά. Το υπερκείμενο μοιράστηκε σε δύο falcon σε καθένα από τα οποία προστέθηκαν 12 ml Binding Buffer 1 (BBD), 0.5 ml Binding Buffer 2 (BBE), αναδεύτηκαν με το υπερκείμενο και στην συνέχεια προστέθηκαν και 48 ml ισοπροπανόλης. Όλη η ποσότητα του μίγματος πέρασε μέσα από φίλτρο με την χρήση της συσκευής κενού Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold. Ακολούθησε καθαρισμός με την προσθήκη και διέλευση από το φίλτρο 5ml Column Wash 1 και μετά προσθήκη και διέλευση από το φίλτρο 20ml Column Wash 2. Έπειτα, προστέθηκαν 500μl H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 60°C, πέρασαν από το φίλτρο και συγκεντρώθηκαν σε αποστειρωμένο eppendorf, το οποίο ήταν τοποθετημένο στην Eluator™ κατασκευή. Το βήμα πραγματοποιήθηκε άλλη μία φορά. (Promega, 2023)

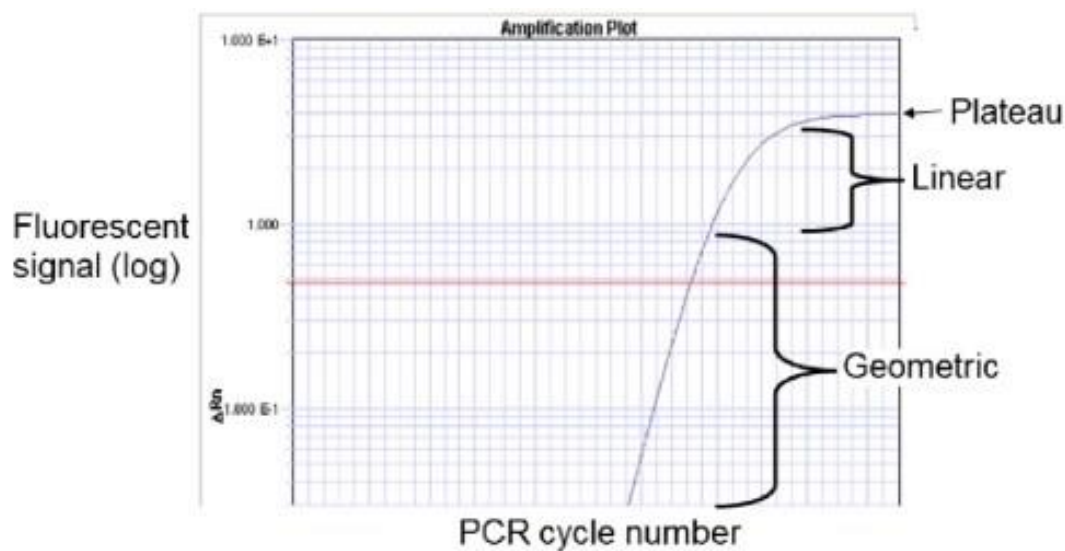


Στο erppendorf, όπου περιέχει 1 ml από το εκλουμένο δείγμα, προστέθηκαν 400μl BBD και 100μl BBE, αναδεύτηκαν και χωρίστηκε η ποσότητα σε δύο νέα erppendorf και προστέθηκαν 750μl ισοπροπανόλης. Ακολούθησε προσθήκη 750μl σε μικροστήλη και φυγοκέντρωση σε μικροφυγόκεντρο στα 10.000 rpm για 1 λεπτό, έτσι ώστε να περάσει όλη η ποσότητα από το φίλτρο της μικροστήλης. Το βήμα πραγματοποιήθηκε άλλες 3 φορές προκειμένου να περάσει όλος ο όγκος από το φίλτρο της μικροστήλης. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 300μl Column Wash 1 και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 10.000 rpm για 1 λεπτό, για να περάσει όλη η ποσότητα από το φίλτρο της μικροστήλης. Ακολούθησε προσθήκη 500μl Column Wash 2 και φυγοκέντρωση στα 10.000 rpm για 1 λεπτό, για να περάσει όλη η ποσότητα από το φίλτρο της μικροστήλης. Το βήμα πραγματοποιήθηκε άλλη μία φορά. Οι μικροστήλες τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα erppendorf και προστέθηκαν 40μl H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 60°C, και φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000rpm για 1 λεπτό, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση του γενετικού υλικού που βρίσκεται παγιδευμένο στο φίλτρο της μικροστήλης. Το αποστειρωμένο erppendorf που περιέχει 40μl εκλουόμενου γενετικού υλικού αποθηκεύτηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80°C), μέχρι την χρήση του. Το τελικό δείγμα είναι έκλουσμα, έτοιμο για PCR. (Promega, 2023) (βλ. Παράρτημα Β)

Ενίσχυση γονιδιακών στόχων με realtime RT-PCR

Η PCR έχει τρεις φάσεις, την εκθετική, τη γραμμική και την φάση πλατώ. Στην εκθετική φάση το προϊόν αυξάνεται εκθετικά λόγω της περίσσειας των αντιδραστηρίων σε αυτό το στάδιο. Στην φάση αυτή, θεωρητικά, το προϊόν της PCR διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Στη γραμμική φάση παρατηρείται γραμμική αύξηση του προϊόντος καθώς η ποσότητα των αντιδραστηρίων ξεκινάει να μειώνεται. Τέλος, η PCR φτάνει την φάση του πλατώ όπου τα αντιδραστήρια εξαντλούνται. (Yuan κ.ά., 2006) (Löfström κ.ά., 2015)

Στην realtime RT-PCR χρησιμοποιούνται φθορίζουσες χρωστικές (probes), οι οποίες συνδέονται με το αμπλικόνιο που θα σχηματιστεί από τους εκκινητές. Η realtime RT-PCR βασίζεται στην άμεση συσχέτισης της έντασης του σήματος φθορισμού μιας χρωστικής με τον αριθμό των αμπλικονίων. Έτσι είναι δυνατή η έμμεση ποσοτικοποίηση των μορίων DNA, μέσω της μέτρησης της έντασης του φθορισμού. Ο υπολογισμός πραγματοποιείται βάσει γραφήματος, όπου στον άξονα x ορίζεται ο αριθμός των κύκλων της PCR και στο άξονα y αναγράφεται η ένταση του φθορισμού, που είναι ανάλογη με τα αμπλικόνια. (Yuan κ.ά., 2006) (Löfström κ.ά., 2015)



Εικόνα 14 Ενδεικτική εικόνα θετικού αποτελέσματος σε realtime RT-PCR (ThermoFisher Scientific, 2023a)

Για την ακριβή ερμηνεία των αποτελεσμάτων της realtime RT-PCR χρησιμοποιούνται θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων των αντιδραστηρίων και αποφυγή ερμηνείας ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Θετικό αποτέλεσμα στον αρνητικό μάρτυρα υποδεικνύει την ύπαρξη επιμόλυνσης και η διαδικασία πραγματοποιείται εκ νέου με νέα αντιδραστήρια. Ως



θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε θετικό εμβολιακό στέλεχος, για να εξακριβωθούν η αποτελεσματικότητα σύνδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, οι σωστές συνθήκες της realtime RT-PCR και η σωστή παρασκευή του μίγματος MasterMix. Αρνητικό αποτέλεσμα στον θετικό μάρτυρα υποδεικνύει ακατάλληλους εκκινητές, λάθος συνθήκες PCR, λάθος κατά την παρασκευή του μίγματος MasterMix ή συνδυασμός των παραπάνω. Ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε βακτηριοφάγος MS2, που ενοφθαλμίστηκε στο δείγμα πριν την έναρξη της συμπύκνωσης των λυμάτων με τη μέθοδο κατακράτησης στηλών. Ο εσωτερικός μάρτυρας εξακριβώνει την επιτυχημένη διεργασία της εκχύλισης του γενετικού υλικού του δείγματος και την απουσία αναστολέων της RT-PCR. Αρνητικό αποτέλεσμα του βακτηριοφάγου υποδεικνύει λάθος κατά τη διαδικασία εκχύλισης του γενετικού υλικού ή/και την ύπαρξη αναστολέων της RT-PCR.

Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τις αναλογίες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του MasterMix με το Invitrogen™ SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit και οι συνθήκες για την realtime RT-PCR.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl) για ένα δείγμα
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	1
2X Reaction Mix	25
Forward εκκινητής, 10μM	1
Reverse εκκινητής, 10μM	1
Φθορίζουσα χρωστική(probe), 10μM	0,5
RNA δείγματος	5
H2O απαλλαγμένο από αναστολείς	μέχρι τα 50μl

Πίνακας 4 Όγκοι αντιδραστηρίων για παρασκευή μίγματος MasterMix σύμφωνα με το Invitrogen™ SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (ThermoFisher Scientific, 2023b)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η παρασκευή του μίγματος MasterMix, σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, και στην συνέχεια μοιράστηκαν 45μl του μίγματος σε πλάκα, με 96 βοθρία, στα αντίστοιχα βοθρία. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 5μl του εκλουόμενου RNA κάθε δείγματος, του αρνητικού και του θετικού μάρτυρα, στις αντίστοιχες θέσεις. Η πλάκα σφραγίστηκε με αυτοκόλλητο MicroAmp™ Clear Adhesive Film, αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε για την συγκέντρωση του μίγματος στον πυθμένα και την καταστροφή ενδεχόμενων φυσαλίδων. Τέλος, η πλάκα τοποθετήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή QuantStudio™ 5 Real-Time της ThermoFisherScientific, ρυθμίστηκαν οι συνθήκες της realtime RT-PCR και τα αποτελέσματα ήταν έτοιμα προς ανάλυση, ύστερα από 2 ώρες. (ThermoFisher Scientific, 2023b) (βλ. Παράρτημα Δ)



Συνθήκες realtime RT-PCR			
	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Επώαση	50	20 min	1x
Αντίστροφη μεταγραφή	95	2 min	1x
Ενεργοποίηση	95	24 sec	40x
Αποδιάταξη	44	30 sec	
Υβριδισμός/Επέκταση	60	30 sec	

Πίνακας 5 Συνθήκες realtime RT-PCR

Χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι εκκινητών για την αναζήτηση της συντηρημένης περιοχής VP1 του γένους *Enterovirus*. Αρνητικό αποτέλεσμα συνεπάγεται απουσία κάποιου ιού του γένους *Enterovirus* άρα και του ιού της Πολιομυελίτιδας. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και ένα ζευγάρι εκκινητών για την ανίχνευση του βακτηριοφάγου MS2, που λειτουργεί ως εσωτερικός μάρτυρας

Εκκινητής/Φθορίζουσα χρωστική	Αλληλουχία	Στόχος	Αναφορά
panEV Forward	5'-GCGATTGTCACCATWAGCAGYCA-3'	Πρωτεΐνη VP1	(Hassan κ.ά., 2017)
panEV Reverse	5'-GGCCCCTGAATGCGGCTAATCC-3'		
Φθορίζουσα χρωστική (Probe)	5'-FAM-CCGACTACTTTGGGWGTCCGTGT-BHQ1-3'		
MS2 Forward	5'-CTCTGAGAGCGGCTCTATTGGT-3'	Πρωτεΐνη ωρίμανσης	(Ninove κ.ά., 2011)
MS2 Reverse	5'-GTTCCCTACAACGAGCCTAAATTC-3'		
Φθορίζουσα χρωστική (Probe)	5'-VIC-TCAGACACGCGGTCCGCTATAACGA-BHQ1-3'		

Πίνακας 6 Οι panEV και MS2 εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην realtime RT-PCR

Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος στην realtime RT-PCR με τους εκκινητές για το γένος των *Enterovirus*, διεξάγεται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να διαπιστωθεί αν πρόκειται για κάποιο στέλεχος του ιού της Πολιομυελίτιδας.

Εκκινητής/Φθορίζουσα χρωστική	Αλληλουχία	Στόχος	Αναφορά
panPV Forward	5'-AYRTACATATYTGRTAIAC-3'	Πρωτεΐνη VP1	(Hassan κ.ά., 2017)
panPV Reverse	5'-CITAITCIMGITTYGAYATG-3'		
Φθορίζουσα χρωστική (Probe)	5'-FAM-TGRTTNARIGCRTGICCRTTRTT-BHQ1-3'		

Πίνακας 7 Οι panPV εκκινητές



Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος στην realtime RT-PCR με τους panPV εκκινητές, διεξάγεται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να διευκρινιστεί αν πρόκειται για άγριο στέλεχος (WPV), για εμβολιακό στέλεχος (Sabin) ή για προερχόμενο από εμβόλιο στέλεχος (VDPV).

Εκκινητής/Φθορίζουσα χρωστική	Αλληλουχία	Στόχος	Αναφορά
WPV1 Forward	5'-AACAAATGGGCATGCTTTGAAT-3'	Πρωτεΐνη VP1	(Sharma κ.ά., 2004)
WPV1 Reverse	5'-TTTTCTGGCACTGGTGCG-3'		
Φθορίζουσα χρωστική (Probe)	5'-FAM-CAGGTCTATCAAATCAT- BHQ1-3'		
WPV3 Forward	5'- GGTGTCTTGCTGTAAGAGTTGTGA - 3'	Πρωτεΐνη VP1	(Sharma κ.ά., 2004)
WPV3 Reverse	5'-CGCACCTTGGATGTAACCTTTG-3'		
Φθορίζουσα χρωστική (Probe)	5'-FAM-CGATCACAACCCC-BHQ1-3'		
Sabin1 Forward	5'-CCACTGGCTTCAGTGTTC-3'	Πρωτεΐνη VP1	(Hassan κ.ά., 2017)
Sabin1 Reverse	5'-AGGTCAGATGCTTGAAAGC-3'		
Φθορίζουσα χρωστική (Probe)	5'-TXR- TTGCCGCCCCCACCCTTCACGGA- BHQ1-3'		
Sabin2 Forward	5'-CGGCTTTGTGTCAGGCA-3'	Πρωτεΐνη VP1	(Hassan κ.ά., 2017)
Sabin2 Reverse	5'-CCGTTGAAGGGATTACTAAA-3'		
Φθορίζουσα χρωστική (Probe)	5'-VIC- ATTGGTCCCCCGACTTCCACCAAT- 3'		
Sabin3 Forward	5'-TTAGTATCAGGTAAGCTATC-3'	Πρωτεΐνη VP1	(Hassan κ.ά., 2017)
Sabin3 Reverse	5'-AGGGCGCCCTAACTTT-3'		
Φθορίζουσα χρωστική (Probe)	5'-FAM-TCACTCCCGAAGCAACAG- BHQ2-3'		
VDPV1 Forward	5'-CATGCGTGGCCATTATA-3'	Πρωτεΐνη VP1	(Burns κ.ά., 2016)
VDPV1 Reverse	5'-TAAATTCCATATCAAATCTA-3'		
Φθορίζουσα χρωστική (Probe)	5'-FAM- CACCAAGAATAAGGATAAGC-BHQ- 1-3'		
VDPV2 Forward	5'-GACATGGAGTTCACCTTTG-3'	Πρωτεΐνη VP1	(Burns κ.ά., 2016)
VDPV2 Reverse	5'-CTCCGGGTGGTATATAC-3'		
Φθορίζουσα χρωστική (Probe)	5'-FAM-CATTGATGCAAATAAC-BHQ- 1-3'		
Sabin3 Forward	5'-CATTTACATGAAACCCAAAC-3'	Πρωτεΐνη VP1	(Burns κ.ά., 2016)
Sabin3 Reverse	5'-TGGTCAAACCTTTCTCAGA-3'		
Φθορίζουσα χρωστική (Probe)	5'-FAM-TAGGAACAACCTGGAC-BHQ- 1-3'		

Πίνακας 8 Οι WPV, Sabin και VDPV εκκινητές

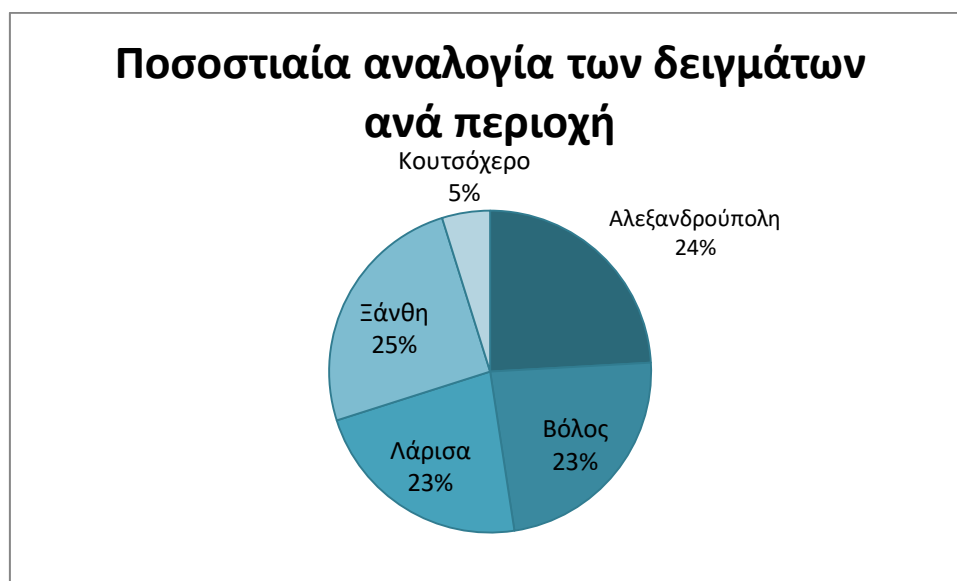


Αποτελέσματα

Συνολικά αναλύθηκαν 296 δείγματα λυμάτων από τον Μάρτιο έως τον Αύγουστο 2023. Πραγματοποιήθηκε συλλογή 75 δειγμάτων λυμάτων από την Αλεξανδρούπολη, 73 από το Βόλο, 70 από τη Λάρισα, 78 από την Ξάνθη και 15 δείγματα βοθρολυμάτων από τη δομή φιλοξενίας προσφύγων στο Κουτσόχερο. Η συμπύκνωση όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο κατακράτησης στηλών. Τα αποτελέσματα από την realtime RT-PCR ήταν αρνητικά για την ανίχνευση του ιού της Πολιομυελίτιδας.

Πόλη	Αριθμός δειγμάτων	Χρονικό διάστημα	Αποτέλεσμα	Σύνολο δειγμάτων
Αλεξανδρούπολη	14	Μάρτιος	Αρνητικό	75
	8	Απρίλιος	Αρνητικό	
	14	Μάιος	Αρνητικό	
	13	Ιούνιος	Αρνητικό	
	12	Ιούλιος	Αρνητικό	
	14	Αύγουστος	Αρνητικό	
Βόλος	13	Μάρτιος	Αρνητικό	73
	9	Απρίλιος	Αρνητικό	
	13	Μάιος	Αρνητικό	
	13	Ιούνιος	Αρνητικό	
	12	Ιούλιος	Αρνητικό	
	13	Αύγουστος	Αρνητικό	
Λάρισα	11	Μάρτιος	Αρνητικό	70
	10	Απρίλιος	Αρνητικό	
	12	Μάιος	Αρνητικό	
	12	Ιούνιος	Αρνητικό	
	12	Ιούλιος	Αρνητικό	
	13	Αύγουστος	Αρνητικό	
Ξάνθη	13	Μάρτιος	Αρνητικό	78
	11	Απρίλιος	Αρνητικό	
	14	Μάιος	Αρνητικό	
	13	Ιούνιος	Αρνητικό	
	12	Ιούλιος	Αρνητικό	
	15	Αύγουστος	Αρνητικό	
Κουτσόχερο	4	Μάρτιος	Αρνητικό	15
	2	Απρίλιος	Αρνητικό	
	4	Μάιος	Αρνητικό	
	2	Ιούνιος	Αρνητικό	
	2	Ιούλιος	Αρνητικό	
	1	Αύγουστος	Αρνητικό	

Πίνακας 9 Τα δείγματα που συλλέχτηκαν ανά πόλη και μήνα το διάστημα Μάρτιος-Αύγουστος 2023



Πίνακας 10 Ποσοστιαία αναλογία των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ανά περιοχή

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας ελέγχθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητα σύνδεσης τους με την συντηρημένη περιοχή στόχο. Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε εμβολιακό στέλεχος.

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε H_2O απαλλαγμένο από αναστολείς, προκειμένου να διαπιστωθεί τυχόν επιμόλυνση κατά τη διαδικασία προετοιμασίας του MasterMix.

Ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο βακτηριοφάγος MS2, προκειμένου να εξακριβωθεί η επιτυχημένη διεργασία της εκχύλιση του γενετικού υλικού.

Έγινε σύγκριση δύο μεθόδων επεξεργασίας λυμάτων, της μεθόδου κατακρήμνισης με την χρήση PEG/NaCl και της μεθόδου συμπύκνωσης με στήλες κατακράτησης. Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε H_2O απαλλαγμένο από αναστολείς στο οποίο ενοφθαλμίστηκε εμβολιακό στέλεχος. Η realtime RT-PCR έδειξε ότι η μέθοδος συμπύκνωσης με στήλες κατακράτησης είχε μεγαλύτερη ανάκτηση του γενετικού υλικού του Sabin1 κατά 4 φορές.



Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε επεξεργασία και αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας σε αστικά λύματα 4 πόλεων της Ελλάδας και βοθρολύματα από τη δομή φιλοξενίας προσφύγων στο Κουτσόχερο. Πραγματοποιήθηκε realtime RT-PCR με εκκινητές που στοχεύουν στην VP1 συντηρημένη περιοχή του γένους *Enterovirus*, στο οποίο ανήκει και ο ιός της Πολιομυελίτιδας. Αρνητικό αποτέλεσμα για *Enterovirus* συνεπάγεται και απουσία του ιού της Πολιομυελίτιδας.

Τα μεγάλα μεταναστευτικά κύματα που δέχεται συστηματικά η Ελλάδα την καθιστούν ευάλωτη στην είσοδο του ιού της Πολιομυελίτιδας. Η επιτήρηση των λυμάτων δίνει τη δυνατότητα ελέγχου ενός μεγάλου και αντιπροσωπευτικού δείγματος που πληθυσμού με γρήγορο, οικονομικό και αξιόπιστο τρόπο αφού ο ιός της Πολιομυελίτιδας αποβάλλεται σε μεγάλες ποσότητες και για μεγάλο χρονικό διάστημα από τα κόπρανα, ακόμα και από ασυμπτωματικούς φορείς. Μέσω της επιτήρησης των λυμάτων είναι δυνατός ο εντοπισμός του ιού χωρίς αναφορά κλινικού περιστατικού Πολιομυελίτιδας.

Το 2023, από τον Ιανουάριο έως και τον Αύγουστο, καταγράφηκαν 754.389 νόμιμοι μετανάστες και 6.863 πρόσφυγες στην Ελλάδα. Οι περισσότεροι νόμιμοι μετανάστες είναι αλβανικής εθνικότητας, ενώ οι περισσότεροι πρόσφυγες προέρχονται από το Πακιστάν. Παρακάτω αναφέρονται οι 10 κορυφαίες εθνικότητες των νόμιμων μεταναστών και προσφύγων στην Ελλάδα το 2023. (Υπουργείο Μετανάστευσης & Ασύλου, 2020)

Χώρα προέλευσης	Ποσοστό
Αλβανία	60,20%
Κίνα	5,60%
Γεωργία	4,20%
Πακιστάν	4%
Ρωσία	3,20%
Ουκρανία	3%
Αίγυπτος	2,10%
Ινδία	2%
Μπαγκλαντές	1,90%
Φιλιππίνες	1,60%

Πίνακας 11 Οι κορυφαίες εθνικότητες νόμιμων μεταναστών στην Ελλάδα για το 2023 (Υπουργείο Μετανάστευσης & Ασύλου, 2020)



Χώρα προέλευσης	Ποσοστό
Πακιστάν	30%
Αφγανιστάν	8%
Αίγυπτος	8%
Μπαγκλαντές	8%
Αλβανία	6%
Σιέρα Λεόνε	5%
Γεωργία	5%
Σομαλία	4%
Ινδία	4%
Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό	4%
Λοιπές	18%

Πίνακας 12 Οι κορυφαίες εθνικότητες προσφύγων στην Ελλάδα για το 2023 (Υπουργείο Μετανάστευσης & Ασύλου, 2020)

Η Ευρώπη θεωρείται απαλλαγμένη από τον ιό της Πολιομυελίτιδας από το 2002 και με εμβολιαστική κάλυψη που φτάνει το 94%. Ωστόσο, από τότε έχουν αναφερθεί νέα περιστατικά WP1 και cVDPV. Τα πιο πρόσφατα περιστατικά σημειώθηκαν τον Οκτώβριο του 2021 στην Ουκρανία και τον Μάιο του 2022 στο Λονδίνο, όπου βρέθηκε στέλεχος VDPV2. Το στέλεχος που βρέθηκε στην Ουκρανία προερχόταν από έξαρση στο Τατζικιστάν το 2021. Δύο παιδιά παρουσίασαν παράλυση, ενώ 19 κοντινά τους άτομα βρέθηκαν θετικά, χωρίς όμως συμπτώματα. Η ανίχνευση του ιού στο Λονδίνο πραγματοποιήθηκε μετά από επιτήρηση λυμάτων, ενώ δεν αναφέρθηκε κανένα κλινικό περιστατικό Πολιομυελίτιδας. Αύξηση θετικών περιβαλλοντικών δειγμάτων για cVDPV έχει παρατηρηθεί αυτή τη χρονιά. Γονιδιακή ανάλυση των θετικών δειγμάτων συνέδεσε τα στελέχη που βρέθηκαν με στελέχη που υπάρχουν στο Ισραήλ και την Αμερική. Η Αλβανία θεωρείται χώρα απαλλαγμένη από τον ιό της Πολιομυελίτιδας από το 1985. Τον Απρίλιο με Νοέμβριο του 1996 υπήρξε μία μεγάλη έξαρση κρουσμάτων, η οποία αντιμετωπίστηκε με τον μαζικό εμβολιασμό των παιδιών ηλικίας ≤ 5 ετών από τον Απρίλιο έως τον Μάιο του 1996, με αποτέλεσμα η εμβολιαστική κάλυψη να φτάσει το 98% (Atti κ.ά., 1997) (WHO, 2023g) (GPEI, 2022b) (WHO, 2023c)

Το τελευταίο περιστατικό ενδογενούς μόλυνσης από WPV, τόσο για την Κίνα, όσο και για τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό ήταν το 2000. Ωστόσο, συνεχίζουν και καταγράφονται περιστατικά cVDPV1, cVDPV2 και cVDPV3, γεγονός που ενδεχομένως οφείλεται στην χαμηλή εμβολιαστική κάλυψη των χωρών. Οι εντατικές εκστρατείες εμβολιασμού συνέβαλαν τον περιορισμό την μετάδοσης των cVDPVs. (GPEI, 2023c) (GPEI, 2023b)



Το Πακιστάν και το Αφγανιστάν είναι οι χώρες που παραμένουν ενδημικές για τον ιό της Πολιομυελίτιδας. Ωστόσο οι τακτικές εκστρατείες εμβολιασμού και οι επέκταση των σημείων επιτήρησης των λυμάτων έχουν συμβάλει σημαντικά στην μείωση της κυκλοφορίας του WPV1. Η Αίγυπτος θεωρείται απαλλαγμένη από τον ιό της Πολιομυελίτιδας από το 2006. Ωστόσο, τον Σεπτέμβριο του 2020 βρέθηκε cVDPV2 σε λύματα της χώρας, πιθανόν προερχόμενο από έξαρση κρουσμάτων στο Σουδάν. Κανένα κλινικό περιστατικό Πολιομυελίτιδας δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής γεγονός που υποδηλώνει την επαρκή εμβολιαστική κάλυψη του πληθυσμού, ιδίως των παιδιών. Το Νοέμβριο του 2020 ξεκίνησε η χορήγηση του nOPV2 με σκοπό την προφύλαξη από το cVDPV2. (WHO, 2023k) (WHO, 2023d)

Η μη ανίχνευση του ιού της Πολιομυελίτιδας στην παρούσα εργασία αποτελεί αποτέλεσμα που συνάδει με τη γενική εικόνα που επικρατεί για τον ιό και ειδικά για τις χώρες από τις οποίες προέρχονται τα μεγάλα κύματα μετανάστευσης στην Ελλάδα. Οι συνεχείς εκστρατείες εμβολιασμού, η παρακολούθηση των περιστατικών AFP, η επιτήρηση των λυμάτων και η συνεχόμενη επέκταση του δικτύου επιτήρησης λυμάτων συμβάλλουν ουσιαστικά στον εντοπισμό και περιορισμό μετάδοσης κρουσμάτων στην κοινότητα. Η γονιδιακή ανάλυση στελεχών που απομονώνονται από λύματα μπορεί να συσχετίσει στελέχη από διάφορες περιοχές και χώρες και να βοηθήσει στην εύρεση της πηγής κρουσμάτων.

Συμπερασματικά, η Ελλάδα είναι χώρα που δέχεται μεγάλο πλήθος μεταναστών και προσφύγων. Το γεγονός αυτό καθιστά την χώρα ευάλωτη για την επανένταξη του ιού της Πολιομυελίτιδας. Η υψηλή εμβολιαστική κάλυψη της χώρας, που φτάνει το 99% και η επιτήρηση των λυμάτων αποτελούν παράγοντες που συμβάλλουν σημαντικά στην πρόληψη της μετάδοσης του ιού της Πολιομυελίτιδας. (WHO, 2023g)

Τα αποτελέσματα της εργασίας αφορούν συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές και χρονικό διάστημα οπότε δεν μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την απουσία του ιού από την Ελλάδα. Τα λύματα συλλέχθηκαν από περιοχές, όπου οι πρόσφυγες μεταφέρθηκαν μετά από εβδομάδες φιλοξενίας σε δομές πρώτης γραμμής κοντά στα σύνορα. Υπάρχει η πιθανότητα κάποιο κρούσμα να είχε εισέλθει στην χώρα αλλά να πέρασε το χρονικό διάστημα απέκκρισης του ιού από τα κόπρανα μέχρι την άφιξη του στις περιοχές που ελέγχθηκαν στην εργασία ή να μεταφέρθηκε σε άλλη περιοχή που δεν συμπεριλαμβάνονταν στην έρευνα.

Τέλος, για πλήρως αντιπροσωπευτική εικόνα, χρειάζεται συλλογή λυμάτων από το σύνολο της επικράτειας, συμπεριλαμβάνοντας τις δομές φιλοξενίας πρώτης γραμμής.



Βιβλιογραφία

1. Παπαπαναγιώτου, Ι. Κ., & Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, Β. (2008). *Ιατρική Μικροβιολογία & Ιολογία* (Δεύτερη). UNIVERSITY STUDIO PRESS.
2. Υπουργείο Μετανάστευσης & Ασύλου. (2020, Μάιος 8). *Στατιστικά | Υπουργείο Μετανάστευσης και Ασύλου*. <https://migration.gov.gr/statistika/>
3. Amero, C. D., Arnold, J. J., Moustafa, I. M., Cameron, C. E., & Foster, M. P. (2008). Identification of the oriI-Binding Site of Poliovirus 3C Protein by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Virology*, 82(9), 4363–4370. <https://doi.org/10.1128/JVI.02087-07>
4. Aniko, V. P., Mugavero, J., Molla, A., & Wimmer, E. (1998). *Internal Ribosomal Entry Site Scanning of the Poliovirus Polyprotein: Implications for Proteolytic Processing—ScienceDirect*. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9376>
5. Atti, M. L. C. D., Prevots, R., Sallabanda, A., Malfait, P., Diamantil, E., Aylward, B., Greco, D., & Wassilak, S. (1997). Polio outbreak in Albania, 1996. *Eurosurveillance*, 2(5), 37–39. <https://doi.org/10.2807/esm.02.05.00162-en>
6. Bahl, S., Bhatnagar, P., Sutter, R. W., Roesel, S., & Zaffran, M. (2018). Global Polio Eradication – Way Ahead. *The Indian Journal of Pediatrics*, 85(2), 124–131. <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2586-8>
7. Bandyopadhyay, A. S., & Zipursky, S. (2023). A novel tool to eradicate an ancient scourge: The novel oral polio vaccine type 2 story. *The Lancet Infectious Diseases*, 23(2), e67–e71. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00582-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00582-5)
8. Barton, D. J., & Flanagan, J. B. (1997). Synchronous replication of poliovirus RNA: Initiation of negative-strand RNA synthesis requires the guanidine-inhibited activity of protein 2C. *Journal of Virology*, 71(11), 8482–8489. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8482-8489.1997>
9. Belov, G. A., Altan-Bonnet, N., Kovtunovych, G., Jackson, C. L., Lippincott-Schwartz, J., & Ehrenfeld, E. (2007). Hijacking Components of the Cellular Secretory Pathway for Replication of Poliovirus RNA. *Journal of Virology*, 81(2), 558–567. <https://doi.org/10.1128/JVI.01820-06>
10. Bigouette, J. P. (2023). Update on Vaccine-Derived Poliovirus Outbreaks—Worldwide, January 2021–December 2022. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 72. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7214a3>
11. Blomqvist, S., Bruu, A.-L., Stenvik, M., & Hovi, T. (2003). Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *Journal of General Virology*, 84(3), 573–580. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18708-0>
12. Blondel, B., Colbere-Garapin, F., Couderc, T., Wirotius, A., & Guivel-Benhassine, F. (2005). Poliovirus, Pathogenesis of Poliomyelitis, and Apoptosis. Στο D. E. Griffin (Επιμ.), *Role of Apoptosis in Infection* (σσ. 25–56). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-27320-4_2
13. Blondel, B., Duncan, G., Couderc, T., Delpeyroux, F., Pavio, N., & Colbère-Garapin, F. (1998). Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *Journal of Neurovirology*, 4(1), 1–26. <https://doi.org/10.3109/13550289809113478>
14. Böttiger, M. (1968). Rct-marker tests on isolates from WM 3 and Sabin type 3 attenuated poliovirus vaccinees. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, 25(3), 299–307. <https://doi.org/10.1007/BF01556558>



15. Brown, B., Oberste, M. S., Maher, K., & Pallansch, M. A. (2003). Complete Genomic Sequencing Shows that Polioviruses and Members of Human Enterovirus Species C Are Closely Related in the Noncapsid Coding Region. *Journal of Virology*, 77(16), 8973–8984. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8973-8984.2003>
16. Bubeck, D., Filman, D. J., Cheng, N., Steven, A. C., Hogle, J. M., & Belnap, D. M. (2005). The Structure of the Poliovirus 135S Cell Entry Intermediate at 10-Angstrom Resolution Reveals the Location of an Externalized Polypeptide That Binds to Membranes. *Journal of Virology*, 79(12), 7745–7755. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7745-7755.2005>
17. Burns, C. C., Kilpatrick, D. R., Iber, J. C., Chen, Q., & Kew, O. M. (2016). Molecular Properties of Poliovirus Isolates: Nucleotide Sequence Analysis, Typing by PCR and Real-Time RT-PCR. Στο *Poliovirus. Methods in Molecular Biology*. Humana Press,.
18. Calandria, C., Irurzun, A., Barco, Á., & Carrasco, L. (2004). Individual expression of poliovirus 2Apro and 3Cpro induces activation of caspase-3 and PARP cleavage in HeLa cells. *Virus Research*, 104(1), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.02.042>
19. CDC. (2023a, Απρίλιος 26). *Pinkbook: Poliomyelitis* | CDC. <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/polio.html>
20. CDC. (2023b, Αύγουστος 3). *Polio Disease and Poliovirus*. <https://www.cdc.gov/orr/polioviruscontainment/diseaseandvirus.htm>
21. Chard, A. N. (2020). Progress Toward Polio Eradication—Worldwide, January 2018–March 2020. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6925a4>
22. Clark, M. E., & Dasgupta, A. (1990). A transcriptionally active form of TFIIC is modified in poliovirus-infected HeLa cells. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.10.5106>
23. Cuconati, A., Xiang, W., Lahser, F., Pfister, T., & Wimmer, E. (1998). A Protein Linkage Map of the P2 Nonstructural Proteins of Poliovirus | *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.2.1297-1307.1998>
24. DeStefano, J. J., & Tittle, O. (2006). Poliovirus Protein 3AB Displays Nucleic Acid Chaperone and Helix-Destabilizing Activities. *Journal of Virology*, 80(4), 1662–1671. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.4.1662-1671.2006>
25. Domingo, E., & Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology*, 51, 151–178. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.151>
26. Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortín, J., López-Galindez, C., Pérez-Breña, P., Villanueva, N., Nájera, R., VandePol, S., Steinhauer, D., DePolo, N., & Holland, J. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: Biological relevance — a review. *Gene*, 40(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90017-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90017-4)
27. El Bassioni, L., Barakat, I., Nasr, E., de Gourville, E. M., Hovi, T., Blomqvist, S., Burns, C., Stenvik, M., Gary, H., Kew, O. M., Pallansch, M. A., & Wahdan, M. H. (2003). Prolonged Detection of Indigenous Wild Polioviruses in Sewage from Communities in Egypt. *American Journal of Epidemiology*, 158(8), 807–815. <https://doi.org/10.1093/aje/kwg202>
28. Farkas, D. H., & Holland, C. A. (2009). Chapter 3—Overview of Molecular Diagnostic Techniques and Instrumentation. Στο R. R. Tubbs & M. H. Stoler (Επιμ.), *Cell and Tissue Based Molecular Pathology* (σσ. 19–32). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-044306901-7.50008-0>
29. FDA, O. of the. (2023, Σεπτέμβριος 26). *U.S. Food and Drug Administration*. FDA; FDA. <https://www.fda.gov/>



30. Filman, D. J., Syed, R., Chow, M., Macadam, A. J., Minor, P. D., & Hogle, J. M. (1989). Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *The EMBO Journal*, 8(5), 1567–1579. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03541.x>
31. Freistadt, M. S., & Racaniello, V. R. (1991). Mutational analysis of the cellular receptor for poliovirus. *Journal of Virology*, 65(7), 3873–3876. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.7.3873-3876.1991>
32. Fricks, C. E., & Hogle, J. M. (1990). Cell-induced conformational change in poliovirus: Externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *Journal of Virology*, 64(5), 1934–1945. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.5.1934-1945.1990>
33. Furlone, M., Guillot, S., Otelea, D., Balanant, J., Candrea, A., & Crainic, R. (1993). Polioviruses with Natural Recombinant Genomes Isolated from Vaccine-Associated Paralytic Poliomyelitis. *Virology*, 196(1), 199–208. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1468>
34. Georgescu, M.-M., Balanant, J., Ozden, S., & Crainic, R. (1997). Random selection: A model for poliovirus infection of the central nervous system. *Journal of General Virology*, 78(8), 1819–1828. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-8-1819>
35. Glikmann, G., Pedersen, M., & Petersen, I. (1987). Intratypic differentiation of poliovirus strains by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Poliovirus type 2 and poliovirus type 3. *Journal of Virological Methods*, 18(1), 25–36. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(87\)90107-8](https://doi.org/10.1016/0166-0934(87)90107-8)
36. Gmyl, A. P., Evgeny V. Belousov, Svetlana V. Maslova, Elena V. Khitrina, Alexander B. Chetverin, & Vadim I. Agol. (1999). *Nonreplicative RNA Recombination in Poliovirus* | *Journal of Virology*. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.73.11.8958-8965.1999>
37. GPEI. (2015). *GUIDELINES ON ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE FOR DETECTION OF POLIOVIRUSES*.
38. GPEI. (2020). *Standard Operating Procedures for Polio Environmental Surveillance Enhancement Following Investigation of a Poliovirus Event or Outbreak*.
39. GPEI. (2022a). *Global Polio Surveillance Action Plan 2022–2024*. World Health Organization.
40. GPEI. (2022b). *GPEI-Vaccine-derived poliovirus type 2 (VDPV2) detected in environmental samples in London*. <https://polioeradication.org/news-post/vaccine-derived-poliovirus-type-2-vdpv2-detected-in-environmental-samples-in-london-uk/>
41. GPEI. (2023a). *Endemic Countries – GPEI*. <https://polioeradication.org/where-we-work/polio-endemic-countries/>
42. GPEI. (2023b). *GPEI-Certification*. <https://polioeradication.org/polio-today/preparing-for-a-polio-free-world/certification/>
43. GPEI. (2023c). *GPEI-China*. <https://polioeradication.org/where-we-work/china/>
44. GPEI. (2023d). *GPEI-nOPV2*. <https://polioeradication.org/nopv2/>
45. GPEI. (2023e). *GPEI-Outbreak Countries*. <https://polioeradication.org/where-we-work/polio-outbreak-countries/>
46. GPEI. (2023f). *GPEI-Polio Now*. <https://polioeradication.org/polio-today/polio-now/>
47. GPEI. (2023g). *GPEI-Vaccine-Derived Polioviruses*. <https://polioeradication.org/polio-today/polio-prevention/the-virus/vaccine-derived-polio-viruses/>
48. Granoff, A., & Webster, R. G. (1999). *Encyclopedia of Virology: τ. Πρώτος (Δεύτερη)*. Elsevier Science.
49. Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J., & Barer, M. (2007). *Medical Microbiology (Δέκατη έκδοση)*. Churchill Livingstone Elsevier.
50. Guillot, S., Caro, V., Cuervo, N., Korotkova, E., Combiescu, M., Persu, A., Aubert-Combiescu, A., Delpeyroux, F., & Crainic, R. (2000). Natural Genetic Exchanges



- between Vaccine and Wild Poliovirus Strains in Humans. *Journal of Virology*, 74(18), 8434–8443. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8434-8443.2000>
51. Gulevich, A. Y., Yusupova, R. A., & Drygin, Y. F. (2001). A phosphodiesterase from ascites carcinoma Krebs II cells specifically cleaves the bond between VPg and RNA of encephalomyocarditis virus. *Biochemistry. Biokhimiia*, 66(3), 345–349. <https://doi.org/10.1023/a:1010220401336>
52. Gupta, S. D., & Banerjee, A. (2019). Chapter 5 - Poliovirus Polymerase: An Effective Target for Design and Development of Antipolio Drugs. Στο S. P. Gupta (Επιμ.), *Viral Polymerases* (σσ. 135–154). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815422-9.00005-X>
53. Hamisu, A. W., Blake, I. M., Sume, G., Braka, F., Jimoh, A., Dahiru, H., Bonos, M., Dankoli, R., Mamuda Bello, A., Yusuf, K. M., Lawal, N. M., Ahmed, F., Aliyu, Z., John, D., Nwachukwu, T. E., Ayeni, M. F., Gumede-Moeletsi, N., Veltsos, P., Giri, S., ... Grassly, N. C. (2022). Characterizing Environmental Surveillance Sites in Nigeria and Their Sensitivity to Detect Poliovirus and Other Enteroviruses. *The Journal of Infectious Diseases*, 225(8), 1377–1386. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa175>
54. Harber, J., Bernhardt, G., Lu, H.-H., Sgro, J.-Y., & Wimmer, E. (1995). Canyon Rim Residues, Including Antigenic Determinants, Modulate Serotype-Specific Binding of Polioviruses to Mutants of the Poliovirus Receptor. *Virology*, 214(2), 559–570. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.0067>
55. Hassan, J., Wangai, L., Borus, P., Khayeka-Wandabwa, C., Karani, L. W., Kithinji, M., & Kiptoo, M. (2017). Vaccine-related poliovirus shedding in trivalent polio vaccine and human immunodeficiency virus status: Analysis from under five children. *BMC Research Notes*, 10(1), 555. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2843-y>
56. Herold, J., & Andino, R. (2001). Poliovirus RNA Replication Requires Genome Circularization through a Protein-Protein Bridge. *Molecular Cell*, 7(3), 581–591. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00205-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00205-2)
57. Hogle, J. M., Chow, M., & Filman, D. J. (1985). Three-Dimensional Structure of Poliovirus at 2.9 Å Resolution. *Science*, 229(4720), 1358–1365. <https://doi.org/10.1126/science.2994218>
58. Hovi, T., Shulman, L. M., Avoort, H. V. D., Deshpande, J., Roivainen, M., & Gourville, E. M. D. (2012). Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. *Epidemiology & Infection*, 140(1), 1–13. <https://doi.org/10.1017/S095026881000316X>
59. Ivan Ventoso, S. E. M., John W. B. Hershey, Luis Carrasco. (1998). *Poliovirus 2A proteinase cleaves directly the eIF-4G subunit of eIF-4F complex*. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01027-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01027-8)
60. Javier, M. (2016). *Poliovirus Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media New York.
61. Karakasiliotis, I., Markoulatos, P., & Katsorchis, T. (2004). Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Molecular and Cellular Probes*, 18(2), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2003.09.009>
62. Kauder, S. E., & Racaniello, V. R. (2004). Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *Journal of Clinical Investigation*, 113(12), 1743–1753. <https://doi.org/10.1172/JCI200421323>
63. Kilaru, P., Hill, D., Anderson, K., Collins, M. B., Green, H., Kmush, B. L., & Larsen, D. A. (2023). Wastewater Surveillance for Infectious Disease: A Systematic Review. *American Journal of Epidemiology*, 192(2), 305–322. <https://doi.org/10.1093/aje/kwac175>



64. Kirkegaard, K., & Baltimore, D. (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*, 47(3), 433–443. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90600-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90600-8)
65. Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2013). *Fields Virology Sixth Edition: τ. Πρώτος* (Εκτη). LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.
66. Kondratova, A. A., Neznanov, N., Kondratov, R. V., & Gudkov, A. V. (2005). Poliovirus Protein 3A Binds and Deregulates LIS1, Causing Block of Membrane Protein Trafficking and Deregulation of Cell Division. *Cell Cycle*, 4(10), 1403–1410. <https://doi.org/10.4161/cc.4.10.2041>
67. Lee, S. E. (2023). Progress Toward Poliomyelitis Eradication—Worldwide, January 2021–March 2023. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 72. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7219a3>
68. Leppard, K., N. D. E., Andrew. (2007). *Introduction to Modern Virology*. Blackwell Publishing Limited (Εκτη). Blackwell Publishing.
69. Löfström, C., Josefsen, M. H., Hansen, T., Søndergaard, M. S. R., & Hoorfar, J. (2015). 9—Fluorescence-based real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technologies for high throughput screening of pathogens. Στο A. K. Bhunia, M. S. Kim, & C. R. Taitt (Επιμ.), *High Throughput Screening for Food Safety Assessment* (σσ. 219–248). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-801-6.00009-5>
70. Louten, J. (2016). Chapter 14—Poliovirus. Στο J. Louten (Επιμ.), *Essential Human Virology* (σσ. 257–271). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00014-4>
71. Lyle, J. M., Clewell, A., Richmond, K., Richards, O. C., Hope, D. A., Schultz, S. C., & Kirkegaard, K. (2002). Similar Structural Basis for Membrane Localization and Protein Priming by an RNA-dependent RNA Polymerase *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16324–16331. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112429200>
72. Macklin, G. (2020). Update on Immunodeficiency-Associated Vaccine-Derived Polioviruses—Worldwide, July 2018–December 2019. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6928a4>
73. Madan, V., Castelló, A., & Carrasco, L. (2008). Viroporins from RNA viruses induce caspase-dependent apoptosis. *Cellular Microbiology*, 10(2), 437–451. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01057.x>
74. Marcotte, L. L., Wass, A. B., Gohara, D. W., Pathak, H. B., Arnold, J. J., Filman, D. J., Cameron, C. E., & Hogle, J. M. (2007). Crystal Structure of Poliovirus 3CD Protein: Virally Encoded Protease and Precursor to the RNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of Virology*, 81(7), 3583–3596. <https://doi.org/10.1128/JVI.02306-06>
75. Martín, J., Samoilovich, E., Dunn, G., Lackenby, A., Feldman, E., Heath, A., Svirchevskaya, E., Cooper, G., Yermalovich, M., & Minor, P. D. (2002). Isolation of an Intertypic Poliovirus Capsid Recombinant from a Child with Vaccine-Associated Paralytic Poliomyelitis. *Journal of Virology*, 76(21), 10921–10928. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.21.10921-10928.2002>
76. Mendelsohn, C. L., Wimmer, E., & Racaniello, V. R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56(5), 855–865. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90690-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90690-9)
77. Modlin, J. F., Bandyopadhyay, A. S., & Sutter, R. (2021). Immunization Against Poliomyelitis and the Challenges to Worldwide Poliomyelitis Eradication. *The Journal of Infectious Diseases*, 224(Supplement_4), S398–S404. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa622>
78. Mohamed, R., Richoz-Payot, J., Gremaud, E., Mottier, P., Yilmaz, E., Tabet, J.-C., & Guy, P. A. (2007). Advantages of Molecularly Imprinted Polymers LC-ESI-MS/MS for



- the Selective Extraction and Quantification of Chloramphenicol in Milk-Based Matrixes. Comparison with a Classical Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, 79(24), 9557–9565. <https://doi.org/10.1021/ac7019859>
79. Mohanty, A., Rohilla, R., Zaman, K., Hada, V., Dhakal, S., Shah, A., Padhi, B. K., Al-qaim, Z. H., Altawfiq, K. J. A., Tirupathi, R., Sah, R., & Al-Tawfiq, J. A. (2023). Vaccine Derived Poliovirus (VDPV). *Le Infezioni in Medicina*, 31(2), 174–185. <https://doi.org/10.53854/liim-3102-5>
80. Muir, P., Kämmerer, U., Korn, K., Mulders, M. N., Pöyry, T., Weissbrich, B., Kandolf, R., Cleator, G. M., & van Loon, A. M. (1998). Molecular Typing of Enteroviruses: Current Status and Future Requirements. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 202–227. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.202>
81. Murray, K. E., Steil, B. P., Roberts, A. W., & Barton, D. J. (2004). Replication of Poliovirus RNA with Complete Internal Ribosome Entry Site Deletions. *Journal of Virology*, 78(3), 1393–1402. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.3.1393-1402.2004>
82. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Health and Medicine Division, Division on Earth and Life Studies, Board on Population Health and Public Health Practice, & Water Science and Technology Board; Committee on Community Wastewater-based Infectious Disease Surveillance. (2023). *Wastewater-based Disease Surveillance for Public Health Action*. National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK591712/>
83. Ninove, L., Nougairede, A., Gazin, C., Thirion, L., Delogu, I., Zandotti, C., Charrel, R. N., & De Lamballerie, X. (2011). RNA and DNA Bacteriophages as Molecular Diagnosis Controls in Clinical Virology: A Comprehensive Study of More than 45,000 Routine PCR Tests. *PLoS ONE*, 6(2), e16142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016142>
84. Njile, D. K., Sadeuh-Mba, S. A., Endegue-Zanga, M.-C., Mengouo, M. N., Djoumetio, M. D., Pouth, F. B. B., Diop, O. M., & Njouom, R. (2019). Detection and characterization of polioviruses originating from urban sewage in Yaounde and Douala, Cameroon 2016–2017. *BMC Research Notes*, 12(1), 248. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4280-6>
85. Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., & Pallansch, M. A. (1999). Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *Journal of Virology*, 73(3), 1941–1948.
86. Oberste, M. S., Nix, W. A., Maher, K., & Pallansch, M. A. (2003). Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *Journal of Clinical Virology*, 26(3), 375–377. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(03\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(03)00004-0)
87. Oostvogel, P. M., Avoort, H. G. A. M. van der, Mulders, M. N., Loon, A. M. van, Spaendonck, M. A. E. C., Rümke, H. C., Steenis, G. van, & Wijngaarden, J. K. van. (1994). Poliomyelitis outbreak in an unvaccinated community in the Netherlands, 1992–93. *The Lancet*, 344(8923), 665–670. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92091-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92091-5)
88. Parvin, J. D., Smith, F. I., & Palese, P. (1986). Rapid RNA Sequencing Using Double-Stranded Template DNA, SP6 Polymerase, and 3'-Deoxynucleotide Triphosphates. *DNA*, 5(2), 167–171. <https://doi.org/10.1089/dna.1986.5.167>
89. Perera, R., Daijogo, S., Walter, B. L., Nguyen, J. H. C., & Semler, B. L. (2007). Cellular Protein Modification by Poliovirus: The Two Faces of Poly(rC)-Binding Protein. *Journal of Virology*, 81(17), 8919–8932. <https://doi.org/10.1128/JVI.01013-07>
90. Pfister, T., Mirzayan, C., & Wimmer, E. (1999). POLIOVIRUSES (PICORNAVIRIDAE) | Molecular Biology. Στο A. Granoff & R. G. Webster (Επιμ.), *Encyclopedia of Virology (Second Edition)* (σσ. 1330–1348). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0224>
91. Pfister, T., & Wimmer, E. (1999). Characterization of the Nucleoside Triphosphatase Activity of Poliovirus Protein 2C Reveals a Mechanism by Which Guanidine Inhibits



- Poliovirus Replication *. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 6992–7001.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.6992>
92. Pogka, V., Labropoulou, S., Emmanouil, M., Voulgari-Kokota, A., Vernardaki, A., Georgakopoulou, T., & Mentis, A. F. (2017). Laboratory Surveillance of Polio and Other Enteroviruses in High-Risk Populations and Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(5), e02872-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02872-16>
93. Pöyry, T., Stenvik, M., & Hovi, T. (1988). Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(2), 371–374.
<https://doi.org/10.1128/aem.54.2.371-374.1988>
94. PPEP. (2023). *Polio Cases Update 2023 | Across Pakistanu2019s Provinces*.
<https://www.endpolio.com.pk/polioin-pakistan/polio-cases-in-provinces>
95. Prévôt, D., Décimo, D., Herbreteau, C. H., Roux, F., Garin, J., Darlix, J.-L., & Ohlmann, T. (2003). Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO Journal*, 22(8), 1909–1921.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg175>
96. Promega. (2023). *Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit Technical Manual*.
<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/500/wizard-enviro-total-nucleic-acid-kit-protocol-tm662/>
97. Racaniello, V. R. (1996). *Early events in poliovirus infection: Virus-receptor interactions*. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.1137>
98. Rachlin, A. (2022). Progress Toward Polio Eradication—Worldwide, January 2020–April 2022. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 71.
<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7119a2>
99. Richards, O. C., & Ehrenfeld, E. (1998). Effects of Poliovirus 3AB Protein on 3D Polymerase-catalyzed Reaction*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 12832–12840. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12832>
100. Rodriguez-Wells, V., Plotch, S. J., & DeStefano, J. J. (2001). Primer-dependent synthesis by poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol). *Nucleic Acids Research*, 29(13), 2715–2724. <https://doi.org/10.1093/nar/29.13.2715>
101. Rohll, J. B., Moon, D. H., Evans, D. J., & Almond, J. W. (1995). The 3' untranslated region of picornavirus RNA: Features required for efficient genome replication. *Journal of Virology*, 69(12), 7835–7844. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.12.7835-7844.1995>
102. Romanova, L. I., Blinov, V. M., Tolskaya, E. A., Viktorova, E. G., Kolesnikova, M. S., Guseva, E. A., & Agol, V. I. (1986). The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: A model of recombination between RNA genomes. *Virology*, 155(1), 202–213. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90180-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90180-7)
103. Rust, R. C., Landmann, L., Gosert, R., Tang, B. L., Hong, W., Hauri, H.-P., Egger, D., & Bienz, K. (2001). Cellular COPII Proteins Are Involved in Production of the Vesicles That Form the Poliovirus Replication Complex. *Journal of Virology*, 75(20), 9808–9818. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.20.9808-9818.2001>
104. S P Tucker, C. L. T., E. Wimmer, R. W. Compans. (1993, Ιούλιος 1). *Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells | Journal of Virology*.
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.67.7.4274-4282.1993>
105. Sapula, S. A., Whittall, J. J., Pandopulos, A. J., Gerber, C., & Venter, H. (2021). An optimized and robust PEG precipitation method for detection of SARS-CoV-2 in wastewater. *Science of The Total Environment*, 785, 147270.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147270>
106. Schmidt, C. (2020). Watcher in the wastewater. *Nature Biotechnology*, 38(8), Article 8.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0620-2>



107. Selinka, H. C., Zibert, A., & Wimmer, E. (1991). Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intercellular adhesion molecule 1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3598–3602. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3598>
108. Sharma, R., Raychaudhuri, S., & Dasgupta, A. (2004). Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: Implications for host cell transcription shut-off. *Virology*, 320(2), 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.10.020>
109. Shulman, L. M., Manor, Y., Azar, R., Handsher, R., Vonsover, A., Mendelson, E., Rothman, S., Hassin, D., Halmut, T., Abramovitz, B., & Varsano, N. (1997). Identification of a new strain of fastidious enterovirus 70 as the causative agent of an outbreak of hemorrhagic conjunctivitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(8), 2145–2149. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.8.2145-2149.1997>
110. Siafakas, N., Georgopoulou, A., Markoulatos, P., & Spyrou, N. (2000). Isolation of polioviruses and other enteroviruses in south Greece between 1994 and 1998. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 14(4), 157–163. [https://doi.org/10.1002/1098-2825\(2000\)14:4<157::AID-JCLA4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1098-2825(2000)14:4<157::AID-JCLA4>3.0.CO;2-P)
111. Siafakas, N., Georgopoulou, A., Markoulatos, P., Spyrou, N., & Stanway, G. (2001). Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 15(2), 87–95. <https://doi.org/10.1002/jcla.7>
112. Siafakas, N., Markoulatos, P., Stanway, G., Tzanakaki, G., & Kourea-Kremastinou, J. (2002). 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 5'-UTR. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 209–216. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0414>
113. Siafakas, N., Markoulatos, P., Vlachos, C., Stanway, G., Tzanakaki, G., & Kourea-Kremastinou, J. (2003). Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Molecular and Cellular Probes*, 17(2), 113–123. [https://doi.org/10.1016/S0890-8508\(03\)00029-X](https://doi.org/10.1016/S0890-8508(03)00029-X)
114. Slater, P. E., Costin, C., Yarrow, A., Ben-Zvi, T., Avni, A., Epstein, I., Orenstein, W. A., Morag, A., Handsher, R., Green, M. S., Rishpon, S., Havkin, O., Swartz, T. A., Kew, O. M., Rey, M., & Melnick, J. L. (1990). Poliomyelitis outbreak in Israel in 1988: A report with two commentaries. *The Lancet*, 335(8699), 1192–1195. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92705-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92705-M)
115. Stanway, G. (1990). Structure, function and evolution of picornaviruses. *Journal of General Virology*, 71(11), 2483–2501. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-11-2483>
116. ThermoFisher Scientific. (2023a). *Efficiency of Real-Time PCR - GR*. <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/efficiency-real-time-pcr-qpcr.html>
117. ThermoFisher Scientific. (2023b). *SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11732020>
118. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2016). *Microbiology An Introduction* (Δωδέκατη). Pearson Global Edition.
119. Toyoda, H., Nicklin, M. J. H., Murray, M. G., Anderson, C. W., Dunn, J. J., Studier, F. W., & Wimmer, E. (1986). A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell*, 45(5), 761–770. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90790-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90790-7)
120. van Loon, A. M., Ras, A., Poelstra, P., Mulders, M., & van der Avoort, H. (1993). Intratypic differentiation of polioviruses. Στο E. Kurstak (Επιμ.), *Measles and*



- Poliomyelitis: Vaccines, Immunization, and Control* (σσ. 359–369). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9278-8_30
121. W G Dougherty, B. L. S. (1993). *Expression of virus-encoded proteinases: Functional and structural similarities with cellular enzymes*. - PMC.
<https://doi.org/10.1128/mr.57.4.781-822.1993>
122. Ward, C. D., & Flanagan, J. B. (1992). Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *Journal of Virology*, 66(6), 3784–3793.
<https://doi.org/10.1128/jvi.66.6.3784-3793.1992>
123. WHO. (2004). *Polio laboratory manual, 4th ed.* World Health Organization.
124. WHO. (2023a). *Field guidance for the implementation of environmental surveillance for poliovirus*. World Health Organization.
125. WHO. (2022a). *Poliomyelitis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis>
126. WHO. (2022b). *Report from the first joint meeting (virtual) of WHO Global Advisory Committee on Vaccine Safety and WHO Advisory Committee on Safety of Medicinal Products, 14–16 June 2022*. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/who-wer9734-397-408>
127. WHO. (2023b). *AFP/polio data*. <https://extranet.who.int/polis/public/CaseCount.aspx>
128. WHO. (2023c). *Assessment of polio outbreak response in Ukraine brings country major step closer to official closure of the outbreak*. <https://www.who.int/europe/news/item/07-06-2023-assessment-of-polio-outbreak-response-in-ukraine-brings-country-major-step-closer-to-official-closure-of-the-outbreak>
129. WHO. (2023d). *Egypt*. World Health Organization - Regional Office for the Eastern Mediterranean. <http://www.emro.who.int/polio-eradication/priority-countries/egypt.html>
130. WHO. (2023e). *GHO | By category | Polio (Pol3)—Immunization coverage estimates by WHO region*. WHO; World Health Organization.
<https://apps.who.int/gho/data/view.main.81605?lang=en>
131. WHO. (2023f). *History of polio vaccination*. <https://www.who.int/news-room/spotlight/history-of-vaccination/history-of-polio-vaccination>
132. WHO. (2023g). *Immunization coverage*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/immunization-coverage>
133. WHO. (2023h). *Monthly polio snapshots*. World Health Organization - Regional Office for the Eastern Mediterranean. <http://www.emro.who.int/afg/information-resources/polio-in-afghanistan.html>
134. WHO. (2023i). *Poliomyelitis vaccination coverage*.
<https://immunizationdata.who.int/pages/coverage/pol.html>
135. WHO. (2023j). *Report of the second joint meeting (hybrid) of the WHO Global Advisory Committee on Vaccine Safety and the WHO Advisory Committee on Safety of Medicinal Products, 14–16 December 2022*. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/who-wer9809-83-92>
136. WHO. (2023k, Ιούνιος 1). *First large-scale campaign in DRC using innovative polio vaccine*. WHO | Regional Office for Africa.
<https://www.afro.who.int/countries/democratic-republic-of-congo/news/first-large-scale-campaign-drc-using-innovative-polio-vaccine>
137. WHO. (2023l, Αύγουστος 11). *Weekly Epidemiological Record (WER), 11 August 2023, Vol. 98, No. 32, pp.345–354 [EN/FR]—World | ReliefWeb*.
<https://reliefweb.int/report/world/weekly-epidemiological-record-wer-11-august-2023-vol-98-no-32-pp345-354-enfr>
138. WHO. (2023m, Σεπτέμβριος 28). *Polio certification*. WHO | Regional Office for Africa.
<https://www.afro.who.int/health-topics/polio/polio-certification>



139. Witwer, C., Rauscher, S., Hofacker, I. L., & Stadler, P. F. (2001). Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Research*, 29(24), 5079–5089.
140. Ya’el Courtney. (2023, Μάρτιος 9). Something in the Sewage: What watching our wastewater can tell us about infectious diseases. *Science in the News*.
<https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2023/something-in-the-sewage-what-watching-our-wastewater-can-tell-us-about-infectious-diseases/>
141. Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., & Stewart, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>
142. Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A. M. Q., Knowles, N. J., Lindberg, A. M., Pallansch, M. A., Palmenberg, A. C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T., & ICTV Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *Journal of General Virology*, 98(10), 2421–2422.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911>



Παράρτημα Α: Μέθοδος κατακρήμνισης με την χρήση PEG/NaCl

Απαραίτητα υλικά-εξοπλισμός

- PEG 6000
- NaCl
- Tris-HCL
- EDTA
- Glycine
- PBS
- Falcon 50ml
- Μαγνητικός αναδευτήρας, μαγνήτης
- Ζυγαριά ακριβείας
- Φυγόκεντρος, μικροφυγόκεντρος
- Eppendorf 1.5ml, 2ml
- Κωνικές φιάλες, 200ml, 2lt
- Κινούμενη πλατφόρμα
- Συσκευή αναρρόφησης
- Ογκομετρικός σωλήνας 1lt
- Πιπέτες και ρύγχη για όγκους 10, 400
- Ορολογικές πιπέτες για όγκο 1.500μl

Χρήση του συνολικού όγκου του λύματος, διάρκεια περίπου 24 ώρες – για τα λύματα από το Κουτσόχερο

1. Ο συνολικός όγκος του λύματος είναι 2lt. Πραγματοποιείται ισόποσος διαμοιρασμός του όγκου σε falcon των 50ml.
2. Φυγοκέντρωση στα 12000 g για 30 λεπτά και στους 4°C για την καθίζηση των στερεών
3. Συλλογή του υπερκείμενου σε κωνική φιάλη και προσθήκη PEG6000 και NaCl σε ποσοστό 7% και 2,3% αντίστοιχα.
4. Ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
5. Ανάδευση σε κινούμενη πλατφόρμα, στους 4°C μέχρι το επόμενο πρωί (περίπου 18 ώρες)
6. Πραγματοποιείται ισόποσος διαμοιρασμός του όγκου σε falcon των 50ml και φυγοκέντρωση στα 12000 g για 30 λεπτά και στους 4°C.
7. Απόρριψη του υπερκείμενου
8. Διάλυση του ιζήματος σε 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος TES
9. Συγκέντρωση του ιζήματος σε αποστειρωμένο eppendorf των 2 ml



10. Φυγοκέντρωση στα 12000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 25°C προκειμένου να γίνει καθίζηση τυχόν υπολειμμάτων PEG.
11. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε ένα erppendorf των 2 ml και αποθηκεύεται σε ψυγείο στους 4 °C.

Χρήση 105 ml από τον συνολικό όγκο του λύματος, διάρκεια 3 ώρες – για αστικά λύματα

1. Διαμοιρασμός 105 ml δείγματος σε 3 falcon των 50ml. Κάθε falcon περιέχει 35ml από το δείγμα.
1. Ανάδευση 105 ml του δείγματος με 1,5 ml γλυκίνης για 30 λεπτά, σε μαγνητικό αναδευτήρα. Η γλυκίνη χρησιμοποιείται για την αποδέσμευση των ιών από τα στερεά στοιχεία.
2. Φυγοκέντρωση στα 4.700 g για 30 λεπτά, στους 4 °C για την καθίζηση των στερεών στοιχείων
3. Συλλογή του υπερκείμενου και προσθήκη 10,5 gr PEG και 2,364 gr NaCl. Το PEG και το NaCl χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των ιών αλλάζοντας την διαλυτότητα τους και προκαλώντας κατακρήμνιση.
4. Ανάδευση μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα
5. Φυγοκέντρωση στα 12000 g για 2 ώρες, στους 4 °C
6. Απόρριψη του υπερκείμενου. Στον πυθμένα των σωληναρίων βρίσκεται το ίζημα που περιέχει το σύνολο των ιών του δείγματος.
7. Χρήση 400 μl PBS, που αποτελεί συντηρητικό διάλυμα, για την αποκόλληση του ιζήματος
8. Συγκέντρωση του ιζήματος σε αποστειρωμένο erppendorf του 1,5 ml και αποθήκευση σε ψυγείο στους 4 °C.



Παράρτημα Β: Μέθοδος κατακράτησης με στήλες

Υλικά-εξοπλισμός

- Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit
- PureYield™ Midicolumn
- Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold
- Eluator™
- Θερμοπλάκα
- Eppendorf 1.5μl
- Φυγόκεντρος, μικροφυγόκεντρος
- Βακτηριοφάγος MS2
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 95%
- Συσκευή αναρρόφησης
- Ογκομετρικοί σωλήνες, 100ml, 500ml
- Πιπέτες και ρύγχη για όγκους 10 μl, 40μl, 100μl, 300μl, 400μl, 500μl, 750μl
- Ορολογικές πιπέτες για όγκους 5ml, 6ml, 20ml, 24ml

Διαδικασία

1. Σε όγκο δείγματος 40 ml, που τοποθετείται σε falcon των 50ml, προστίθενται 0.5 ml πρωτεΐνωσης και 10μl βακτηριοφάγου MS2, με σκοπό την απελευθέρωση του γενετικού υλικού, και επωάζονται για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Φυγοκέντρωση στα 3000 g για 10 λεπτά και στους 25°C έτσι ώστε να καθιζάνουν τα υπάρχοντα στερεά.
3. Το υπερκείμενο συλλέγεται και χωρίζεται σε 2 νέα falcon των 50ml. Κάθε falcon περιέχει 20ml του υπερκείμενου και αναμιγνύεται και αναδεύεται με 12 ml Binding Buffer 1 (BBD), 0.5 ml Binding Buffer 2 (BBE)
4. Προστίθενται 48 ml ισοπροπανόλης και το μίγμα αναδεύεται
5. Όλη η ποσότητα του μίγματος περνάει μέσα από φίλτρο με την χρήση της συσκευής κενού.
6. Πραγματοποιείται πρώτος καθαρισμός με την προσθήκη 5ml από το Column Wash 1 (CWE). Αφήνεται να περάσει όλη η ποσότητα από το φίλτρο.
7. Πραγματοποιείται δεύτερος καθαρισμός με την προσθήκη 20ml από το Column Wash 2 (RWA). Αφήνεται να περάσει όλη η ποσότητα από το φίλτρο.



8. Προστίθεται νερό (0.5 ml) απαλλαγμένο από αναστολείς, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 60°C, περνάει από το φίλτρο και συγκεντρώνεται σε αποστειρωμένο erpendorf. Το βήμα επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά.
9. Στο erpendorf, όπου περιέχει 1 ml από το εκλουμένο δείγμα, προστίθενται 0.4 ml BBD και 0.1 ml BBE και αναδεύονται.
10. Το μίγμα χωρίζεται σε δύο erpendorf με ποσότητα 0.75 ml
11. Προσθήκη 0,75 ml ισοπροπανόλης σε κάθε erpendorf και ανάδευση.
12. Προσθήκη 0,75 ml του μίγματος σε μικροστήλη και φυγοκέντρωση σε μικροφυγόκεντρο στα 10.000 rpm για 1 λεπτό. Απόρριψη της ποσότητας που πέρασε το φίλτρο της μικροστήλης.
13. Επανάληψη του βήματος άλλες 3 φορές, έτσι ώστε να περάσει όλος ο όγκος του μίγματος από το φίλτρο (1.5 ml)
14. Προσθήκη 0.3ml WBE στη μικροστήλη και φυγοκέντρωση σε μικροφυγόκεντρο στα 10.000 rpm για 1 λεπτό. Απόρριψη της ποσότητας που πέρασε το φίλτρο της μικροστήλης.
15. Προσθήκη 0.5ml RWA στη μικροστήλη και φυγοκέντρωση σε μικροφυγόκεντρο στα 10.000 rpm για 1 λεπτό. Απόρριψη της ποσότητας που πέρασε το φίλτρο της μικροστήλης.
16. Επανάληψη του βήματος άλλη μία φορά
17. Φυγοκέντρωση για επιπλέον 30 δευτερόλεπτα για την απομάκρυνση υπολειμμάτων
18. Τοποθέτηση της μικροστήλης σε αποστειρωμένο erpendorf
19. Πραγματοποιείται εκχύλιση του γενετικού υλικού που βρίσκεται παγιδευμένο στο φίλτρο της μικροστήλης με την προσθήκη 20μl προθερμασμένου H₂O απαλλαγμένου από αναστολείς και φυγοκέντρωση σε μικροφυγόκεντρο στα 10.000 rpm για 1 λεπτό.
20. Επανάληψη του βήματος άλλη μία φορά
21. Το αποστειρωμένο erpendorf που περιέχει 40μl εκλουόμενου γενετικού υλικού αποθηκεύεται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).



Παράρτημα Γ: Απομόνωση γενετικού υλικού

Το στάδιο πραγματοποιήθηκε μόνο στα δείγματα με H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς, που χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των μεθόδων συμπύκνωσης, και συμπυκνώθηκαν με τη μέθοδο PEG/NaCl. Η απομόνωση του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε σε ανοιχτού τύπου αυτόματο μηχάνημα KingFisher Apex της ThermoScientific με το αντίστοιχο kit.

Υλικά-εξοπλισμός

- Μηχάνημα ανοιχτού τύπου KingFisher Apex της ThermoScientific
- MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit
- KingFisher™ Deepwell 96 Plate
- Tip Comb Presenting Plate for KF 96
- MicroAmp™ Clear Adhesive Film
- Βακτηριοφάγος MS2
- Vortex
- Πιπέτες και ρύγχη για όγκους 5, 10, 50, 200, 265, 275, 500

Διαδικασία

1. Ονοματίζονται 4 πλάκες, που περιέχουν 96 βοθρία. (Wash 1, Wash 2, Sample, Elution)
2. Στην πλάκα Wash 1 προστίθενται 500μl Wash 1 σε όσα βοθρία είναι και τα δείγματα προς απομόνωση.
3. Στην πλάκα Wash 2 προστίθενται 500μl Wash 2 σε όσα βοθρία είναι και τα δείγματα προς απομόνωση. Το Wash 2 είναι 80% αιθανόλη.
4. Στην πλάκα Elution προστίθενται 50μl ddH₂O σε όσα βοθρία είναι και τα δείγματα προς απομόνωση. Σε αυτή τη πλάκα θα συγκεντρωθεί το γενετικό υλικό στο τέλος της διαδικασίας.
5. Στην πλάκα Sample προστίθενται 5μl πρωτεΐνωση K, 10μl βακτηριοφάγου MS2 και 200μl από το δείγμα, αφού έχει ανακινηθεί καλά προηγουμένως.
6. Παρασκευάζεται μίγμα Binding Solution (265μl) και Total Nucleic Acid Magnetic Beads (10μl) για κάθε δείγμα.
7. Ήπια ανάδευση για ομογενοποίηση
8. Στην πλάκα Sample προστίθενται 275μl από το μίγμα Binding Solution και Total Nucleic Acid Magnetic Beads.
9. Οι 4 πλάκες τοποθετούνται το αυτόματο μηχάνημα ανοιχτού τύπου KingFisher Apex της ThermoScientific.
10. Το πρωτόκολλο χρειάζεται περίπου 22 λεπτά για να ολοκληρωθεί.



*«Κόλα Κωνσταντίνα», «Αναζήτηση του ιού της Πολιομυελίτιδας σε
λύματα από αστικές περιοχές και δομές φιλοξενίας προσφύγων»*

11. Η πλάκα Elution καλύπτεται με αυτοκόλλητο MicroAmp™ Clear Adhesive Film για να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση.
12. Η πλάκα Elution τοποθετείται σε πάγο για άμεση χρήση ή σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για μελλοντική χρήση.



Παράρτημα Δ: Μέθοδος realtime RT-PCR

Υλικά-εξοπλισμός

- Invitrogen™ SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit
- Μικροφυγόκεντρος
- Θερμοκυκλοποιητής QuantStudio™ 5 Real-Time της ThermoFisherScientific
- Vortex
- Αποστειρωμένα eppendorfs
- Πλάκα 96 βοθρίων
- MicroAmp™ Clear Adhesive Film
- Παγοπλάκα
- H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς
- Πιπέτες και ρύγχη

Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τις αναλογίες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του MasterMix με το Invitrogen™ SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit και οι συνθήκες της realtime RT-PCR. Ο όγκος κάθε αντιδραστηρίου πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων προς ανάλυση.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl) για ένα δείγμα
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	1
2X Reaction Mix	25
Forward εκκινητής, 10μM	1
Reverse εκκινητής, 10μM	1
Φθορίζουσα χρωστική(probe), 10μM	0,5
RNA δείγματος	5
H ₂ O απαλλαγμένο από αναστολείς	μέχρι τα 50μl

Συνθήκες realtime RT-PCR			
	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Επώαση	50	20 min	1x
Αντίστροφη μεταγραφή	95	2 min	1x
Ενεργοποίηση	95	24 sec	40x
Αποδιάταξη	44	30 sec	
Υβριδισμός/Επέκταση	60	30 sec	



Διαδικασία

1. Όλα τα αντιδραστήρια του kit βρίσκονται αποθηκευμένα σε κατάψυξη (-20°C). Άρα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ξεπαγώσουν.
2. Αναδεύονται ήπια και φυγοκεντρούνται για 2-3 δευτερόλεπτα με σκοπό την ομογενοποίηση και συγκέντρωση όλης της ποσότητας στον πάτο.
3. Πραγματοποιείται η παρασκευή του μίγματος του MasterMix, σύμφωνα με τον πίνακα παραπάνω. Όλα τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε αποστειρωμένο eppendorf.
4. Ήπια ανάδευση για ομογενοποίηση και σύντομη φυγοκέντρωση για την συγκέντρωση της ποσότητας στον πάτο
5. Πραγματοποιείται διαμοιρασμός του μίγματος σε αποστειρωμένα βοθρία ή πλάκα. Ο όγκος που μοιράζεται σε κάθε βοθρίο είναι 45μl.
6. Πραγματοποιείται μεταφορά του εκλούόμενου γενετικού υλικού στο αντίστοιχο βοθρίο. Ο όγκος που μεταφέρεται είναι 5μl.
7. Η πλάκα, σφραγίζεται με αυτοκόλλητο MicroAmp™ Clear Adhesive Film.
8. Ανάδευση για ομογενοποίηση για περίπου 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση για την συγκέντρωση της ποσότητας στον πάτο και την καταστροφή ενδεχόμενων φυσαλίδων.
9. Τοποθέτηση των αποστειρωμένων βοθρίων ή της πλάκας σε θερμοκυκλοποιητή QuantStudio™ 5 Real-Time της ThermoFisherScientific
10. Ρύθμιση του προγράμματος στον θερμοκυκλοποιητή, σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα και έναρξη της PCR
11. Ανάλυση των αποτελεσμάτων.