

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»



ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΣΤΑΜΑΤΗ

Μεταπτυχιακή διατριβή

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ .
ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΝΑΘΕΩΡΗΘΕΙ Η ΥΠΑΡΧΟΥΣΑ ΚΟΙΝΟΤΙΚΗ ΟΔΗΓΙΑ;**



ΛΑΡΙΣΑ 2009

Ανίχνευση εντεροϊών σε πόσιμο νερό.
Πρέπει να αναθεωρηθεί η υπάρχουσα Κοινοτική Οδηγία;

ΛΑΡΙΣΑ, 2009

2



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7338/1
Ημερ. Εισ.: 30-07-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
579.257 2
ΣΤΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087206

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΤΡΟΠΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών Μικροοργανισμών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΟΣΙΑΛΟΣ

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αισθάνομαι τη βαθύτατη υποχρέωση να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον καθηγητή μου κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την ανάθεση σε εμένα του ενδιαφέροντος και πρωτότυπου αυτού θέματος , την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής και την κριτική διόρθωση του κειμένου. Πάνω από όλα όμως τον ευχαριστώ γιατί λειτούργησε για μένα σαν υπόδειγμα πανεπιστημιακού δασκάλου με τις γνώσεις και το ήθος του .

Επίσης ένα θερμό ευχαριστώ στους Λέκτορες κ. Δημήτρη Καρπούζα και κ. Δημήτρη Μόσιαλο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας.

Ακόμη ευχαριστώ όλους τους συναδέλφους στο εργαστήριο για το φιλικό κλίμα στο χώρο εργασίας και πρωτίτως ευχαριστώ την κ. Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου για την τεράστια υπομονή της , την καθοδήγηση και την βοήθεια που απλόχερα μου προσέφερε στις όποιες δυσκολίες συνάντησα.

Τέλος , θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον σύζυγο μου Χρήστο για την στήριξη και την κατανόησή τους.

Αυτή η εργασία είναι εξ ολοκλήρου αφιερωμένη στα παιδιά μου Μαριλένα και Ορέστη που είναι ότι σημαντικότερο έχω στην ζωή μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το νερό το προοριζόμενο για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να είναι από κάθε άποψη αβλαβές για την υγεία του ανθρώπου, οργανοληπτικά άμεμπτο και απολύτως καθαρό, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς και οποιεσδήποτε ουσίες σε αριθμούς και συγκεντρώσεις που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία.

Η υδατογενής μετάδοση των μικροβίων είναι ένας πολύ αποτελεσματικός τρόπος για την ευρεία και ταυτόχρονη εξάπλωση ασθενειών σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Μεταξύ αυτών των μικροβίων σημαντική θέση καταλαμβάνουν οι εντερικοί ιοί (εντεροϊοί, ρεοϊοί, αστροϊοί, ιός της ηπατίτιδας Α, νοροϊοί, αδενονοϊοί) λόγω της ιδιαίτερης σημασίας τους για τη δημόσια υγεία .

Οι εντερικοί ιοί εγκλείονται στα κόπρανα , περνούν στα λύματα από όπου εάν δεν γίνει σωστή επεξεργασία καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον. Έχουν καταγραφεί παγκοσμίως, λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων μη επεξεργασμένων επιφανειακών και υπόγειων υδάτων καθώς επίσης και λοιμώξεις από τη κατανάλωση πόσιμου νερού και οστρακοειδών.

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των εντερικών ιών στο υδάτινο περιβάλλον είναι η θερμοκρασία , το φώς, η ακτινοβολία, το pH , η προσρόφησή τους στις επιφάνειες και η παρουσία άλλων μικροοργανισμών.

Το γένος των εντεροϊών είναι το πιο σημαντικό της οικογένειας των Picornaviridae, ως προς την παθογένεια των μελών του αναφορικά με τον άνθρωπο. Αποτελείται από τουλάχιστον 65 οροτύπους οι οποίοι ταξινομούνται σε πέντε υποομάδες. Το καψίδιο των εντεροϊών δεν περιβάλλεται από λιπιδικό έλυτρο και εσωκλείει ένα μόριο RNA θετικής πολικότητας. Το γένωμα των εντεροϊών περιλαμβάνει τρεις κύριες περιοχές: την 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR), το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) και την 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR). Η κωδική περιοχή του RNA (ORF) μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία περιέχει πληροφορίες για τις τέσσερις δομικές (VP1-VP4) και τις επτά λειτουργικές (2A-2C και 3A-3D) πρωτεΐνες του ιού.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση εντεροϊών στο πόσιμο νερό. Επειδή οι ιοί βρίσκονται συνήθως στο νερό σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις , επιλέχθηκε μεγάλος όγκος δειγμάτων (4 L) και με την μέθοδο «προσρόφησης- έκλουσης με ηλεκτραρνητικά φίλτρα» ώστε να συγκεντρωθούν οι ιοί σε μικρότερο όγκο. Ακολούθως εφαρμόστηκε η τεχνική της Αντίστροφης Μεταγραφής-Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (RT-PCR) η οποία παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την

ανίχνευση γενετικού υλικού των εντεροϊών και χρησιμοποιείται επιτυχώς για να ανιχνεύσει ακόμη και αυτούς τους οροτύπους που δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε κυτταρικές σειρές, όπως επίσης και για τα μη ταυτοποιήσιμα με τις συμβατικές μεθόδους στελέχη.

Το αποτέλεσμα της μελέτης ήταν ότι σε κανένα δείγμα πόσιμου νερού δεν ανιχνεύτηκε εντεροϊός. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την ισχύουσα Κοινοτική Οδηγία 98/83/ΕΚ η οποία περιλαμβάνει τους εντεροϊούς μόνο στα πλαίσια συμπληρωματικής παρακολούθησης της ποιότητας του πόσιμου νερού και όχι στις υποχρεωτικές μικροβιολογικές παραμέτρους.

ABSTRACT

Water intended for human consumption must be in all respects harmless to human health, and organoleptically perfectly clean, free from pathogenic organisms and substances in any numbers or concentrations, which constitute a potential danger to public health. The water-transmission of bacteria is a very effective way for the broad spread of disease to a large part of population. Enteric viruses (enteroviruses, reoviruses, astroviruses, hepatitis A virus, noroviruses, adenoviruses) play an important role in these microbes. These enteric viruses can be transmitted via faecial-oral route through end up in aquatic environment. Infections have been recorded worldwide from the use of contaminated untreated surface water and groundwater as well as infections from consumption of drinking water and shellfish. The main factors affecting the survival of enteric viruses in the aquatic environment are temperature, light, radiation, the pH, the absorption on surfaces and the presence of other microorganisms.

The genus of enteroviruses is the most important in the family Picornaviridae, as to the pathogenicity of members in relation to man. It consists of at least 65 serotypes which are classified into five subgroups. The capsid of the enteroviruses is not surrounded by lipid husks and encloses an RNA molecule of positive polarity. The genome of enterovirus comprises three main regions: the 5' non-coding region (5'UTR), under the open reading frame (ORF) and 3' non-coding region (3'UTR). The coding region of RNA (ORF) is translated into a polyprotein, which contains information on the four structural (VP1-VP4) and seven functional (2A-2C and 3A-3D) proteins of the virus.

The purpose of this study was to detect enteroviruses in drinking water. Because viruses are usually found in water at very low concentrations, we selected bulk samples 4 L and the method «Adsorption-elution with electronegative membranes» to concentrate viruses in a smaller volume. Then the technique of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied which provides a direct and sensitive tool to detect genetic material of enterovirus and used successfully to detect even those serotypes that can not be developed in cell lines, as well as non-identifiable with conventional methods of management.

The result of this study was that enterovirus was not detected in any sample of drinking water. This is in agreement with current EU Directive 98/83/EC which includes enteroviruses only under additional monitoring of the quality of drinking water and not compulsory microbiological parameters.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή	10
1.1 Εντερικοί Ιοί	10
1.1.1 Εντερικοί Ιοί Στο Υδάτινο Περιβάλλον	10
1.1.1.1 Λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων μη επεξεργασμένων επιφανειακών υδάτων	14
1.1.1.2 Λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων μη επεξεργασμένων υπόγειων υδάτων	17
1.1.1.3 Λοιμώξεις από την κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού	18
1.1.1.4 Λοιμώξεις από την κατανάλωση μολυσμένων οστρακοειδών	18
1.1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των ιών στο περιβάλλον	19
1.1.2.1 Θερμοκρασία	19
1.1.2.2 Φως Ακτινοβολία	20
1.1.2.3 pH	20
1.1.2.4 Προσρόφηση ιών σε επιφάνειες	21
1.1.2.5 Παρουσία άλλων μικροοργανισμών	21
1.2 Εντεροϊοί	22
1.2.1 Ταξινόμηση Εντεροϊών	22
1.2.2 Δομή Εντεροϊών	24
1.2.2.1 Το καψίδιο	25
1.2.2.1.1 Δομικές Πρωτεΐνες	26
1.2.2.1.2 Λειτουργικές Πρωτεΐνες	27
1.2.2.2 Το γονιδίωμα	28
1.2.3 Υποδοχείς εντεροϊών	30
1.2.4 Κύκλος Ζωής των εντεροϊών	31
1.2.4.1 Μετάφραση	31
1.2.4.2 Αντιγραφή	32
1.2.4.3 Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων	32
1.2.5 Εξέλιξη των εντεροϊών	33
1.2.6 Μέθοδοι συγκέντρωσης ιών από το νερό	35
1.2.7 Μέθοδοι ανίχνευσης εντεροϊών	37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Υλικά και Μέθοδοι	40
2.1 Δειγματοληψίες	40
2.2 Μέθοδοι συγκέντρωσης δειγμάτων	42
2.2.1 Μέθοδος προσρόφησης – έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα	42
2.2.2 Μέθοδος καθίζησης με PEG	43
2.3 Εκχύλιση RNA	44
2.4 Αντίστροφη μεταγραφή (RT)	45
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	45
2.6 Semi Nested PCR	47
2.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Αποτελέσματα	48
3.1 Επιλογή μεθόδου συγκέντρωσης και ανίχνευσης εντεροϊών	48
3.2 Έλεγχος αναστολέων	48
3.3 Προσρόφηση σε ηλεκτραρνητικά φορτισμένα φίλτρα	50
3.4 Μέθοδος καθίζησης με PEG	51
3.5 Ανίχνευση εντεροϊών	52

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Νομοθεσία	55
4.1 Κατευθυντήριες Γραμμές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για το πόσιμο νερό	55
4.2 Γενική Πολιτική της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το νερό	58
4.2.1 Η Οδηγία Πλαίσιο για το νερό (2000/60/EK)	59
4.3 Κοινοτική Οδηγία 98/83 για το πόσιμο νερό	61
4.3.1 Μικροβιολογικές παράμετροι	62
4.3.2 Επίπεδα παρακολούθησης ποιότητας νερού	67

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συζήτηση	69
Βιβλιογραφία	73

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

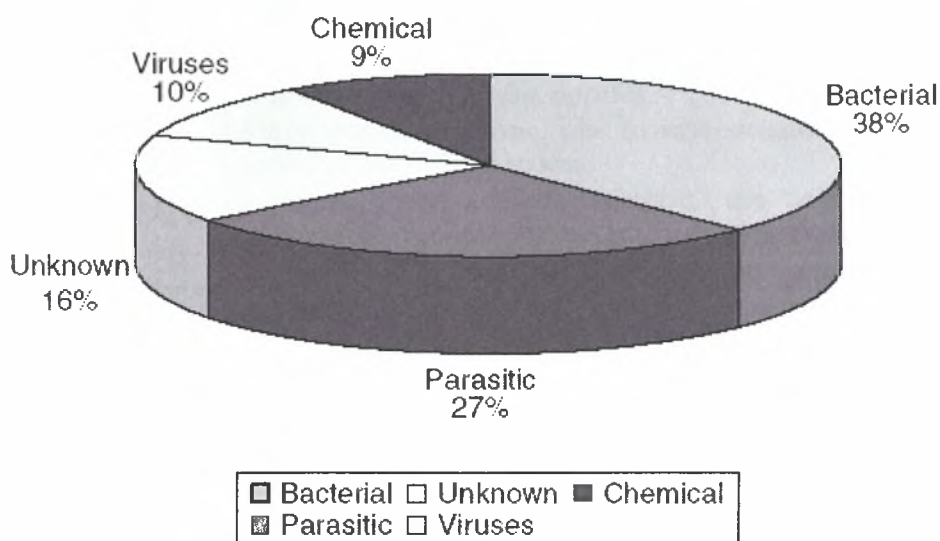
1.1 Εντερικοί Ιοί

1.1.1 Εντερικοί Ιοί Στο Υδάτινο Περιβάλλον

Από τους πρώτους που αντιλήφθηκαν τη σημασία της υγιεινής ύδρευσης και αποχέτευσης ήταν οι πολιτισμοί που αναπτύχθηκαν στον Ελληνικό χώρο, με πρωτοπόρους τους κατοίκους της Κνωσού, της Φαιστού και της Ζάκρου όπου ανακαλύφθηκαν τέλεια συστήματα ύδρευσης που χρονολογούνται από το 1700 π. Χ. Οι αρχαιολόγοι υποστηρίζουν ότι οι υγιεινολογικές γνώσεις των κατοίκων της Μινωικής Κρήτης επηρέασαν και εφαρμόστηκαν αργότερα και στα ανάκτορα της Τίρυνθας και των Μυκηνών.

Το πόσιμο νερό αποτελεί το υπ' αριθμόν ένα είδος διατροφής και είναι υψίστης σημασίας για την ικανοποίηση των κοινωνικών αναγκών του ανθρώπου. Το νερό το προοριζόμενο για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να είναι από κάθε άποψη αβλαβές για την υγεία του ανθρώπου, οργανοληπτικά άμεμπτο και απολύτως καθαρό, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς και οποιεσδήποτε ουσίες σε αριθμούς και συγκεντρώσεις που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία.

Η υδατογενής μετάδοση των μικροβίων είναι ένας πολύ αποτελεσματικός τρόπος για την ευρεία και ταυτόχρονη εξάπλωση ασθενειών σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Μεταξύ αυτών των μικροβίων σημαντική θέση καταλαμβάνουν οι ιοί (εικόνα 1) και ιδιαίτερος οι εντερικοί ιοί λόγω της ιδιαίτερης σημασίας τους για τη δημόσια υγεία .



Εικόνα 1 . Παράγοντες που ευθύνονται για υδατογενείς επιδημίες από το πόσιμο νερό στις Η.Π.Α τα έτη 2001- 2002. (CDC,2004)

Οι εντερικοί ιοί εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της στοματικής οδού, πολλαπλασιάζονται και τελικά αποβάλλονται στα κόπρανα σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Πάνω από 100 διαφορετικοί ιοί που περιέχονται στα ανθρώπινα κόπρανα περνούν στα λύματα και τελικά στο υδάτινο περιβάλλον. Σε 1g κοπράνων μολυσμένου ατόμου μπορεί να περιέχονται πάνω από 10^6 ιικά σωματίδια. Στα λύματα η συγκέντρωσή τους μπορεί να είναι έως και 10^5 μολυσματικοί ιοί/λίτρο. Συχνά οι ιοί δεν απενεργοποιούνται εντελώς και δεν απομακρύνονται από τα λύματα στις μονάδες βιολογικού καθαρισμού. Κατά συνέπεια οι μολυσματικοί ιοί καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον (θαλάσσια ύδατα, πόσιμα ύδατα, υπόγεια και επιφανειακά ύδατα) (IAWPCR,1983). Οι ιοί αυτοί έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα επιβίωσης από τα παραδοσιακά βακτήρια – δείκτες (Akin et al., 1975).

Η πιο μελετημένη ομάδα εντερικών ιών είναι οι Εντεροϊοί . Άλλοι εντερικοί ιοί είναι ο ιός της ηπατίτιδας Α, οι Ρεοϊοί, οι Άδενοϊοί, οι Ροταϊοί, οι Αστροϊοί και οι Νοροϊοί ,οι οποίοι όπως και οι εντεροϊοί υπάρχουν στα κόπρανα, έχουν ανιχνευθεί στα λύματα και ευθύνονται για πληθώρα ασθενειών στον άνθρωπο (Πίνακας 1).

Ιοί Εντερικής Προέλευσης	Κλινικά Σύνδρομα
Εντεροϊοί Polio-ιοί Echo-ιοί Coxsackie-ιοί A, B	Παράλυση, μηνιγγίτιδα, πυρετός Μηνιγγίτιδα, παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, ερυθήμα, πυρετός, διάρροια Κυνάγχη, μηνιγγίτιδα, παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, περικαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, πλευροδυνία
Reo-ιοί	Παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, γαστρεντερίτιδα
Adeno-ιοί	Διάρροια-παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, παθήσεις οφθαλμών
Rota-ιοί	Γαστρεντερίτιδα (κυρίως στα βρέφη)
Ιός ηπατίτιδας A	Ηπατίτιδα-ίκτερος
Astro-ιοί	Γαστρεντερίτιδα
Calici-ιοί Human calici-ιοί Norwalk SRSV Ιός ηπατίτιδας E	Γαστρεντερίτιδα Γαστρεντερίτιδα (ενηλίκων), πυρετός Γαστρεντερίτιδα Ηπατίτιδα
Corona-ιοί	Γαστρεντερίτιδα, αναπνευστικές ασθένειες
Parvo-ιοί	Γαστρεντερίτιδα
Toro-ιοί	Γαστρεντερίτιδα

Πίνακας 1 : Ιοί Εντερικής Προέλευσης που μεταδίδονται υδατογενώς (Bosch, 1998).

Κάθε χρόνο 518 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο πεθαίνουν από γαστρεντερίτιδα, ενώ εκτιμάται πως 1 εκατομμύριο παιδιά πεθαίνουν από διάρροια που οφείλεται σε ρότα ιούς . Επιπλέον, στη Μεσόγειο ενδημεί ο ιός της ηπατίτιδας A ενώ και ο ιός της πολιομυελίτιδας δεν έχει ακόμα πλήρως εξαλειφθεί ιδιαίτερα στις Αφρικανικές χώρες. Όσον αφορά στους αδενοϊούς, στους αστροϊούς, στους Noro ιούς , καθώς και στον ιό της ηπατίτιδας E, φαίνεται ότι προκαλούν γαστρεντερίτιδα μετά από κατανάλωση μολυσμένου νερού ή τροφίμων (ιδιαίτερα οστρακοειδών). Στον πίνακα 2 αναφέρονται ενδεικτικά ποσοστά θνησιμότητας λόγω των παραπάνω ιών (Centers for Disease Control and Prevention, 1995).

Επιδημιολογικές μελέτες για τις ιογενείς λοιμώξεις που προέρχονται από το νερό είναι περίπλοκες γιατί σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται απουσία κλινικών συμπτωμάτων , ιδιαίτερα στα παιδιά. Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση των παθογόνων οργανισμών είναι η πυκνότητα του πληθυσμού, η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση, το ακολουθούμενο πρότυπο διαβίωσης, η εκπαίδευση, ο εμβολιασμός, το κλίμα, η γεωγραφία, η αστικοποίηση, η μετανάστευση , τα ταξίδια και πάνω από όλα οι εφαρμοζόμενες πολιτικές για τη δημόσια υγεία .

Ιοί Εντερικής Προέλευσης	Θνησιμότητα %
Polio-ιός 1	0.90
Echo-ιοί	0.27-0.29
Coxsackie-ιοί Α	0.12-0.50
Coxsackie-ιοί Β	0.59-0.94
Adeno-ιοί	0.01
Rota-ιοί	0.01-0.12
Ιός ηπατιτίδας Α	0.60
Norwalk	0.0001

Πίνακας 2 : Ποσοστό θνησιμότητας ατόμων που έχουν προσβληθεί από τους εντερικούς ιούς στις αναπτυσσόμενες χώρες (CDC, 1995).

Οι εντερικοί ιοί που περιέχονται στις ανθρώπινες εκκρίσεις ακολουθούν διάφορες πορείες στο περιβάλλον (εικόνα 2).



Εικόνα 2 : Πορεία ιών εντερικής προέλευσης στο υδάτινο περιβάλλον με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο (Rao *et al.*, 1986).

Όταν μεγάλη ποσότητα μολυσμένων λυμάτων με εντερικούς μικροοργανισμούς αναμιγνύεται με νερό που στη συνέχεια, είτε χωρίς επεξεργασία καταλήγει στη θάλασσα, είτε είναι ανεπαρκώς επεξεργασμένο και χρησιμοποιείται για άρδευση ή πόση, τότε είναι πολύ πιθανό να προκληθεί υδατογενής επιδημία (Bosch A., 1998). Ο άνθρωπος είναι δυνατό να έρθει σε επαφή με τους εντερικούς ιούς ως εξής:

- α) με την κατανάλωση πόσιμου νερού που προέρχεται από επιφανειακά και υπόγεια ύδατα που περιέχουν κοπρανώδεις προσμίξεις ή ανεπαρκώς επεξεργασμένα λύματα.
- β) με την κατανάλωση οστρακοειδών που καλλιεργούνται σε μολυσμένα νερά.
- γ) με την κατανάλωση δημητριακών που καλλιεργήθηκαν με τη χρησιμοποίηση ακατάλληλου νερού άρδευσης.
- δ) με την κολύμβηση σε παραλίες όπου διοχετεύονται μη επεξεργασμένα λύματα στη θάλασσα.

Τα επιφανειακά νερά (ποτάμια, λίμνες) που δέχονται εκροές λυμάτων πιθανόν να περιέχουν εντερικούς ιούς οι οποίοι δεν είναι πάντα ανιχνεύσιμοι διότι είτε βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις είτε είναι αναμεμειγμένοι με διαλυμένα συστατικά και επικάθονται στο ίζημα (Hot et al. 2003). Ο αριθμός των εντερικών ιών που μπορεί να απομονωθεί από τα επιφανειακά νερά, ποικίλλει εποχιακά, εξαρτάται από τον όγκο των διοχετευομένων λυμάτων και από τις κλιματολογικές συνθήκες. Έχει παρατηρηθεί ότι οι εντεροϊοί δείχνουν εποχιακή προτίμηση. Οι επιδημίες εμφανίζονται κυρίως τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες ιδιαίτερα στις εύκρατες περιοχές. Ορισμένοι τύποι εντεροϊών μπορούν να είναι ενδημικοί σε ένα πληθυσμό. Η πολιομυελίτιδα εμφανίζει παγκόσμια κατανομή και οι πολιοϊοί εξαπλώνονται πιο συχνά κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και του φθινοπώρου, ενώ οι περιπτώσεις μόλυνσεων το χειμώνα είναι σπάνιες. Πρέπει να τονιστεί ότι οι πολιοϊοί δεν σχετίζονται με υδατογενείς επιδημίες όπως άλλοι εντερικοί ιοί. Παρ'όλα αυτά επειδή μεταδίδονται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού, η πιθανότητα να ανιχνευθούν στα λύματα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, ιδιαίτερα στις περιοχές όπου ανεπαρκώς επεξεργασμένα λύματα καταλήγουν σε υδάτινους αποδέκτες και χρησιμοποιούνται για οικιακούς σκοπούς.

1.1.1.1 Λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων μη επεξεργασμένων επιφανειακών υδάτων

Η υγειονομική σημασία των εντερικών ιών στα επιφανειακά νερά τεκμηριώθηκε από τον Koopman (1982), ο οποίος μελέτησε μια επιδημία γαστρεντερίτιδας που οφείλονταν σε Νορο ιούς λόγω κολύμβησης σε νερά που είχαν μολυνθεί με λύματα.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μικρός αλλά υπαρκτός κίνδυνος πρόκλησης γαστρεντερίτιδας (κυρίως σε παιδιά 0-4 ετών), που οφείλεται σε εντερικούς ιούς, από την κολύμβηση σε περιοχές που έχουν μολυνθεί με λύματα (Shuval 1986, Cabelli 1989, Holmes 1989).

Επίσης σε άλλη μελέτη από τον Ρανλον και τους συνεργάτες του (2005) απομονώθηκαν πολιοιοί σε δείγματα υδάτων ποταμού στη Νότια Αφρική και τονίστηκε ο κίνδυνος πρόκλησης υδατογενούς επιδημίας λόγω της κατανάλωσης του νερού από μεγάλο αριθμό ατόμων.

Το 1996 στην Αλβανία σημειώθηκε σοβαρή επιδημία πολιομυελίτιδας κατά την οποία 140 άτομα ασθένησαν και το 12% απεβίωσε. Κατά τη διάρκεια της επιδημίας εξετάστηκαν δείγματα νερού από τον ποταμό Lana στα Τίρανα για την παρουσία ρολιοίων. Με την εφαρμογή της RT PCR και την τυποποίηση μέσω αλληλούχισης ανιχνεύθηκε πολιοϊός τύπου 1 (Divizia et al. 1999).

Ο Donalson και οι συνεργάτες του το 2001 εξετάζοντας επιφανειακά νερά στη Φλόριδα των Η.Π.Α. ανίχνευσαν διάφορους τύπους εντεροϊών (coxsakie A9, coxsakie A16 και ρολιο 1).

Άλλες πρόσφατες μελέτες που αποδεικνύουν την παρουσία εντερικών ιών στα επιφανειακά νερά παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Recent studies on the occurrence of enteric viruses in surface freshwaters

Location	Virus concentration/l or % positive	Remarks	Reference
United States (Arizona)	0–0.75 PFU enteroviruses	Recreational river	Rose et al. (1987)
United States	0–0.25 IFF rotaviruses		
United States	27.57% astroviruses ICC-PCR 27.5% enteroviruses ICC-PCR 37.9% adenoviruses ICC-PCR	Drinking water treatment plant intakes from across the United States	Chapron et al. (2000)
United States (Florida)	0.002–0.014 MPN/CPE	Lakes	Betancourt and Rose (2005)
Spain	15.5–16.2 MPNCU	Ripoll and Besos Rivers	Bosch et al. (1986)
Italy	Positive by cell culture in 3 of 5 samples	Tiber	Divizia et al. (1989)
Germany	0.5–56 MPNCU	Two rivers receiving poorly treated sewage	Walter et al. (1989)
Canada	0.1–29 MPNCU	St. Lawrence River	Payment et al. (2000)
Korea	33.3% enterovirus ICC-PCR 30.4% adenovirus ICC-PCR	Han River	Lee et al. (2005)
Netherlands	0.3–2 enteroviruses PFU 2–10 reovirus PFU 57–5386 rotavirus PCR 4–4900 PCR	Maal and Waal Rivers	Lodder and de Roda Husman (2005)
South Africa	13% rotavirus	Dam water	Van Zyl et al. (2004)
France	3% enteroviruses cell culture 88% enterovirus PCR 1.5% HAV PCR 1.5% norovirus group I PCR 0% norovirus group II PCR 3% astrovirus PCR 0% rotavirus PCR	Various rivers	Hot et al. (2003)
South Africa	35.3% HAV PCR (River) 37.3% HAV PCR Dam water)	River and dam water	Taylor et al. (2001)
Thailand	15% HAV PCR	Canals	Kittigul et al. (2000)

CPE, cytopathogenic effects; MPNCU, most probable number culturable unit; ICC-PCR, integrated cell-culture polymerase chain reaction; PFU, plaque forming unit.

Πίνακας 3 : Πρόσφατες μελέτες σχετικά με την εμφάνιση εντερικών ιών στα επιφανειακά νερά (Gerba, 2007).

1.1.1.2 Λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων, μη επεξεργασμένων υπόγειων υδάτων

Έχει παρατηρηθεί ότι υπό κατάλληλες συνθήκες, οι ιοί ταξιδεύουν σε μεγάλη απόσταση (100 m) στο χώμα και τα υπόγεια νερά και μάλιστα λόγω του μικρού τους μεγέθους (23-38nm) μεταφέρονται ταχύτερα σε σχέση με τα βακτήρια (0.5-3μm) και τα πρωτόζωα (4-15μm) (Abbaszadegan et al. 2003).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής κατά την περίοδο 1971-1994 το 58% των υδατογενών λοιμώξεων σχετιζόνταν με τη μόλυνση των υπόγειων υδάτων από εντερικούς ιούς (Craun & Calderon, 1996). Στον πίνακα 4 φαίνονται χαρακτηριστικά παραδείγματα εμφάνισης εντερικών ιών στα υπόγεια ύδατα.

Virus occurrence in groundwater

Location	Virus concentration/l or % positive	Remark	Reference
Israel	20%	Cell culture; 99 samples	Marzouk et al. (1979)
United States	30.1% enterovirus PCR 8.6% HAV PCR 8.6% rotavirus PCR 8.7% CPE	139 samples of water supply wells used by utilities from across the United States	Abbaszadegan et al. (1999)
United States (Wisconsin)	50% for enteroviruses, rotavirus, HAV and norovirus	48 samples from municipal drinking water supply wells	Borchardt et al. (2004)
United States	72% overall 62% reovirus PCR 38% enterovirus PCR 0% rotavirus PCR 4% HAV PCR 21% norovirus PCR	21 water supply wells; 321 samples	Fout et al. (2003)
United States	4.8% CPE 31.5% overall PCR 15.2% enterovirus 13.8% rotavirus PCR 6.9% HAV PCR 0.9% norovirus	448 sites from 35 states	Abbaszadegan et al. (2003)
United States (Wisconsin)	8% overall PCR 6% HAV PCR 2% rotavirus PCR 2% enterovirus PCR 2% norovirus PCR	50 individual home owner wells	Borchardt et al. (2003)
United States (Florida)	0.0002–0.0011 MPN	5 wells	Betancourt & Rose (2005)
Italy	6% CPE	35 samples	Carducci et al. (2003)
United Kingdom	40% norovirus, enterovirus PCR, and CPE	5 wells	Powell et al. (2003)
South Africa	0% rotavirus PCR	30 samples	Van Zyl et al. (2004)

CPE. cytopathogenic effects.

Πίνακας 4: Εμφάνιση εντερικών ιών στο υπόγειο νερό (Gerba, 2007).

1.1.1.3 Λοιμώξεις από την κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού

Πολλές μελέτες αναφέρουν την παρουσία εντερικών ιών σε δείγματα πόσιμου νερού και την πρόκληση υδατογενών επιδημιών από την κατανάλωσή του (Kukkula et al. 1997). Ενδεικτικά τον Αύγουστο του 1998 σε περιοχή της Ελβετίας αναφέρθηκε επιδημία γαστρεντερίτιδας οφειλόμενη στην κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού και στα δείγματα που εξετάστηκαν ανιχνεύθηκαν ιοί Noro (Hafliger et al. 2000).

Ο Ehler και οι συνεργάτες του το 2005 απομόνωσαν εντεροϊούς από δείγματα λυμάτων και πόσιμου νερού από περιοχές της Νοτίου Αφρικής κατά την περίοδο Ιούλιος 2000 – Ιούνιος 2002. Οι ιοί τυποποιήθηκαν και ανιχνεύτηκαν ως coxsakie B, coxsakie A και echo ιοί. Σε μεγαλύτερο ποσοστό βρέθηκε ο ιός coxsakie B5 (22,7%).

Ο Grabow και οι συνεργάτες του το 2004 εξέτασαν 172 δείγματα πόσιμου νερού για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση εντεροϊών. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στη Νότια Αφρική και τα δείγματα συλλέχθηκαν από δύο σταθμούς επεξεργασίας νερού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ανιχνεύθηκαν εντεροϊοί coxsakie B σε ποσοστό 88% (τύποι B3 και B5) και polio ιοί σε ποσοστό 12% (τύπου 1 – κλινικό στέλεχος).

Ο SeungHoon Lee (2002) και οι συνεργάτες του εξετάζοντας δείγματα πόσιμου νερού από αστικές περιοχές στην Κορέα απομόνωσαν polio ιούς τύπου 1, Coxsakie B και echo 6.

1.1.1.4 Λοιμώξεις από την κατανάλωση μολυσμένων οστρακοειδών

Ένα μεγάλο ποσοστό των εντερικών ιών συγκεντρώνεται στους ιστούς διάφορων υδρόβιων οργανισμών (μύδια, στρείδια κ.α) που τρέφονται διηθώντας μεγάλες ποσότητες θαλασσινού νερού. Αυτοί οι οργανισμοί καταναλώνονται ωμοί ή ελάχιστα μαγειρεμένοι με αποτέλεσμα την πρόκληση λοιμώξεων στον άνθρωπο (Sair A.I. et al. 2002).

Οι εντερικοί ιοί που σχετίζονται με την κατανάλωση οστρακοειδών και ενοχοποιούνται για την πρόκληση τροφιμογενών λοιμώξεων είναι ο ιός της ηπατίτιδας A και ο ιός Norwalk (De Leon et Jaykus 1997, Lees 2000).

Πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν τη σημασία των επιδημιών από την κατανάλωση μολυσμένων οστρακοειδών γιατί αφορούν μεγάλο αριθμό ατόμων και πολλές περιοχές σε όλο τον κόσμο (Halliday et al. 1991, Sanchez et al. 2002).

1.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των ιών στο περιβάλλον

Η επιβίωση των εντερικών ιών στο περιβάλλον επηρεάζεται από διάφορους φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς παράγοντες πολλοί από τους οποίους εξαρτώνται από τον τύπο τη δομή και τη σύσταση του ιού. Για παράδειγμα οι εντεροϊοί είναι ανθεκτικοί σε πολλούς χημικούς παράγοντες όπως η αλκοόλη , η αμμωνία, διάφορα απολυμαντικά, ο αιθέρας και το δεσοξυχολικό οξύ . Εντούτοις απενεργοποιούνται εύκολα από φαινόλη , φορμαλδεΰδη ή ιονισμένη ακτινοβολία που καταστρέφουν το καψίδιο ή το ενσωματωμένο σε αυτό νουκλεϊκό οξύ.

Σε γενικές γραμμές οι κύριοι παράγοντες που καθορίζουν την επιβίωση των ιών στο περιβάλλον και ειδικότερα στο νερό και στο έδαφος είναι η θερμοκρασία ,το pH, το φως, η προσρόφηση τους στο έδαφος και η παρουσία άλλων μικροοργανισμών (Guardabassi et al. 2003). Η επιβίωση τους στο περιβάλλον εξαρτάται από την επίδραση που έχουν οι παράγοντες που προαναφέρθηκαν στο γενετικό τους υλικό, αλλά και τις πρωτεΐνες του καψιδίου (Sobsey et al. 2003). Μέσα στο υδάτινο περιβάλλον οι εντερικοί ιοί σπάνια είναι ελεύθεροι και απομονωμένοι αφού συνήθως τείνουν να είναι συσσωματωμένοι ή να συνδέονται με την οργανική ύλη ή τα αιωρούμενα σωματίδια. Ως εκ τούτου αποτελούν μια συγκεκριμένη δομή η οποία ονομάζεται "hydrovirus" (Federal –Provincial- Territorial Committee, 2002)

1.1.2.1 Θερμοκρασία

Αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα επιβίωσης των ιών και οι μεταβολές της θερμοκρασίας επηρεάζουν δυσμενώς τη διάρκεια ζωής των ιών. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι σε υψηλές θερμοκρασίες καταστρέφεται το καψίδιο των ιών λόγω μετουσίωσης των πρωτεϊνών που το αποτελούν.

Διάφορες εργαστηριακές μελέτες που αφορούν στην επιβίωση των ιών αναφέρουν πως οι ιοί είναι περισσότερο ανθεκτικοί στις χαμηλές θερμοκρασίες (-20–1 °C) παρά στις υψηλές (πάνω από 22 °C) (Hurst et al. 1988).

Όταν ο πολιοϊός 1 και ο ιός της ηπατίτιδας A, που απομονώθηκαν σε διάφορα δείγματα νερού (υπόγεια ύδατα, θαλασσινό νερό και λύματα), εξετάστηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (10 °C, 20 °C και 30 °C) διαπιστώθηκε ταχύτατη απενεργοποίησή τους στους 30 °C. Ο Chung και οι συνεργάτες του το 1993 μελέτησαν

την επιβίωση του πολιοιού, του ιού της ηπατίτιδας Α και του ρότα ιού σε δείγματα θαλασσινού νερού στους 25 °C και τους 4 °C καταλήγοντας στα ίδια συμπεράσματα. Οι ρότα ιοί εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα στους 4 °C, μικρότερη στους 20 °C και ελάχιστη στους 37 °C (Moe et al. 1982). Σε θερμοκρασία πάνω από 55 °C οι πολιοιοί στα λύματα απενεργοποιούνται σε λιγότερο από 30 λεπτά (Clarke et al. 1961), ενώ στην ενεργό ιλύ στους 4 °C η διάρκεια ζωής τους ξεπερνά τις 66 ημέρες (Wellings et al. 1976).

1.1.2.2 Φως Ακτινοβολία

Το φως επιδρά άμεσα ή έμμεσα στην επιβίωση των ιών στο νερό. Η άμεση επίδραση του φωτός εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Είναι γνωστό ότι η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να απενεργοποιήσει τους ιούς ως αποτέλεσμα του σχηματισμού διμερών θυμίνης και της αποδιάταξης των πρωτεϊνών του καψιδίου. Γι' αυτό το λόγο, προτείνεται η χρήση της υπεριώδους ακτινοβολίας για την απομόλυνση των ιών στα λύματα και το θαλασσινό νερό (Wilhelm et al. 2002).

Η έμμεση επίδραση του φωτός αφορά στην ενεργοποίηση χημικών ουσιών που είναι τοξικές για τους ιούς καθώς και στην πιθανή αύξηση των μικροοργανισμών που ανταγωνίζονται τους ιούς ως προς την επιβίωσή τους (Fukada et al. 1968 και Jocksch et al. 1996).

1.1.2.3 pH

Το pH του μέσου διάλυσης επηρεάζει την επιβίωση των ιών είτε άμεσα προκαλώντας αποδιάταξη των πρωτεϊνών του καψιδίου είτε έμμεσα εμποδίζοντας την προσρόφηση τους σε διάφορες επιφάνειες, που ως γνωστόν ευνοεί την επιβίωση τους (Fujioaka et al. 1975, Mandel et al. 1971 και Bitton et al. 1980). Οι περισσότεροι ιοί εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα σε τιμές pH από 5 έως 9. Μελέτες έδειξαν ότι η απενεργοποίηση των ρότα ιών σε δείγματα νερού σχετίζεται με την τιμή του pH (Pancorbo et al. 1987). Επιπλέον, έχει μελετηθεί η επίδραση διαφόρων χημικών ουσιών στην επιβίωση των που εξαρτώνται από το pH. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της αμμωνίας η οποία σε pH 8.5 - 9.5 προκαλεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών του περιβλήματος των ιών σε αντίθεση με το ιόν του αμμωνίου που δεν επιδρά στην μολυσματικότητα των εντεροϊών (Ward et al. 1977).

1.1.2.4 Προσρόφηση ιών στις επιφάνειες

Έχει διαπιστωθεί ότι η απορρόφηση των ιών από το έδαφος και η προσκόλληση τους σε ιζήματα ενισχύει την επιβίωση τους δρώντας προστατευτικά έναντι αντίξοων περιβαλλοντικών συνθηκών, τοξικών παραγόντων και ανταγωνιστικών μικροοργανισμών (Gerba et al. 1975, Liew et al. 1980, Hejkal et al. 1981, Draft OSRAS Rev A 2001).

Ο Nagajima και οι συνεργάτες του το 2003 μελετώντας λύματα, επιβεβαίωσαν ότι η προσρόφηση του ρολιϊού σε σωματίδια ενεργού λάσπης (σε 1 γραμμάριο λάσπης προσρόφηση 10^8 σωματιδίων ρολιϊών) συνεπάγεται ενίσχυση της ενεργότητάς του για διάστημα μεγαλύτερο των 28 ημερών προστατεύοντας τον παράλληλα από τις μεταβολές της θερμοκρασίας. Η προσκόλληση του παραπάνω ιού και του echoϊού σε ιζήματα παράκτιων περιοχών αυξάνει το χρόνο επιβίωσης τους από 1 ώρα σε 4 ημέρες και από 1 ημέρα σε 6 ημέρες αντίστοιχα (LaBelle et al. 1980).

1.1.2.5 Παρουσία άλλων μικροοργανισμών

Η επίδραση που έχει η παρουσία άλλων μικροοργανισμών στην επιβίωση των ιών στα επιφανειακά λύματα και το έδαφος έχει μελετηθεί διεξοδικά. Τα βακτήρια και οι άλλοι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση των ιών παράγοντας πρωτεολυτικά και άλλα ένζυμα που τους καταστρέφουν (O'Brien et al. 1977, Katayoshi et al. 1983 και Girones et al. 1989). Ο Deng και οι συνεργάτες του το 1995 απέδειξαν ότι ο ιός της ηπατίτιδας Α απενεργοποιείται ταχύτατα σε μη επεξεργασμένα λύματα τα οποία περιέχουν πληθώρα μικροβίων σε σχέση με αποστειρωμένα δείγματα αποβλήτων (Deng et al. 1995). Στο θαλασσινό νερό πολλές μελέτες αναφέρουν αδρανοποίηση των εντεροϊών που σχετίζεται με τον ανταγωνισμό που αναπτύσσεται με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Τα παραπάνω στοιχεία οδήγησαν στην ευρεία χρήση μικροοργανισμών στα διάφορα στάδια επεξεργασίας των λυμάτων ώστε να απενεργοποιηθούν οι ιοί.

1.2 Εντεροϊοί

1.2.1 Ταξινόμηση εντεροϊών

Οι Picorna ιοί (Pico:μικρός +RNA), αποτελούν μια ευρεία οικογένεια μικρών, μη ελυτροφόρων RNA-ιών θετικής πολικότητας, στην οποία περιλαμβάνονται αρκετά παθογόνα για τον άνθρωπο και για άλλα είδη θηλαστικών στελέχη και περιλαμβάνει 230 οροτύπους που ομαδοποιούνται σε εννέα γένη ιών (Pringle, 1999). Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται τόσο στα αντιγονικά τους χαρακτηριστικά όσο και στους ξενιστές και τα όργανα τα οποία προσβάλλουν καθώς και στις φυσικοχημικές ιδιότητες τους. Σύμφωνα, λοιπόν, με αυτές τις διαφοροποιήσεις, διακρίνονται τα γένη των Εντεροϊών (Enterovirus), των Ρινοϊών (Rhinovirus), των ιών της Ηπατίτιδας Α (Hepatitis A), των Καρδιοϊών (Cardiovirus), των Παρεκοϊών (Parvovirus) και των Κομπουϊών (Kobovirus), τα οποία παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια καθώς και τα τρία γένη των Ερμποϊών (Erbovirus), των Αφθοϊών (Aphthovirus) και των Τεσκοϊών (Teschovirus), τα οποία δεν παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Επίσης σε ξεχωριστή κατηγορία κατατάσσονται τα γένη των μη ταξινομημένων Picorna ιών (King et al., 2000).

Οι εντεροϊοί είναι το σημαντικότερο γένος της οικογένειας των Picorna ιών ως προς την παθογένεια των μελών του αναφορικά με τον άνθρωπο.

Αρχικά το γένος των εντεροϊών χωρίστηκε σε τέσσερις κατηγορίες : (i) στους πολιοϊούς (PV1-3), (ii) στους coxsackie A ιούς (CAV), (iii) στους coxsackie B ιούς (CBV) και (iv) στους echo-ιούς (Melnick J.L., 1996). Μετέπειτα, όμως με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, η γενωμική ανάλυση διαδέχτηκε την οροτυποποίηση, ως μέσο ανίχνευσης και ταξινόμησης των εντεροϊών. Το 1999, η αναταξινόμηση των εντεροϊών με βάση την πρωτοταγή τους οργάνωση (νουκλεοτιδική και αμινοξική) έγινε αποδεκτή από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV). Σύμφωνα, λοιπόν, με τα σύγχρονα μοριακά δεδομένα, το γένος των εντεροϊών χωρίζεται σήμερα σε 5 είδη που παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια (King et al., 2000). Βάσει αναλύσεων της πρωτοταγούς τους δομής και της VP1 περιοχής τους οι 65 ορότυποι, που αποτελούν το σύνολο των ανθρώπινων εντεροϊών, κατατάσσονται : (i) στους πολιοϊούς που περιλαμβάνουν τους PV1-3, (ii) στους ανθρώπινους εντεροϊούς Α

(HEV-A), στους οποίους ανήκουν οι CAV2-8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16, EV71, (iii) στους ανθρώπινους εντεροϊούς B (HEV-B), που ανήκουν οι CAV9, CBV1-6, E1-7, E9, E11-21, E24-27, E29-33, EV69, EV73, (iv) στους ανθρώπινους εντεροϊούς C (HEV-C), που ανήκουν οι CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17-22, CAV24, (v) και στους ανθρώπινους εντεροϊούς D (HEV-D), όπου ανήκουν οι EV68 και EV70 (King et al., 2000). Πρόσφατες μελέτες προτείνουν την ταξινόμηση των πολιοϊών μαζί με τους εντεροϊούς της ομάδας HEVC, επειδή παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα στην δομή του γενώματός τους (Brown et al., 2003).

Στη συνέχεια ανακαλύφθηκαν και νέοι εντεροϊοί όπως ο EV73 (Oberste et al., 2001), ο οποίος ομαδοποιείται στους HEVB (Norder et al., 2003), οι EV74, EV75 που ομαδοποιούνται στους Human Enterovirus B (Oberste et al., 2004a), οι EV77, EV78 που κατατάσσονται στους Human Enterovirus B (Norder et al., 2003), οι EV76, EV89, EV90, EV91 που κατατάσσονται στους HEVA και τέλος οι EV79-88, EV97, EV100-101, οι οποίοι και ομαδοποιούνται στους Human Enterovirus B (Oberste et al., 2007).

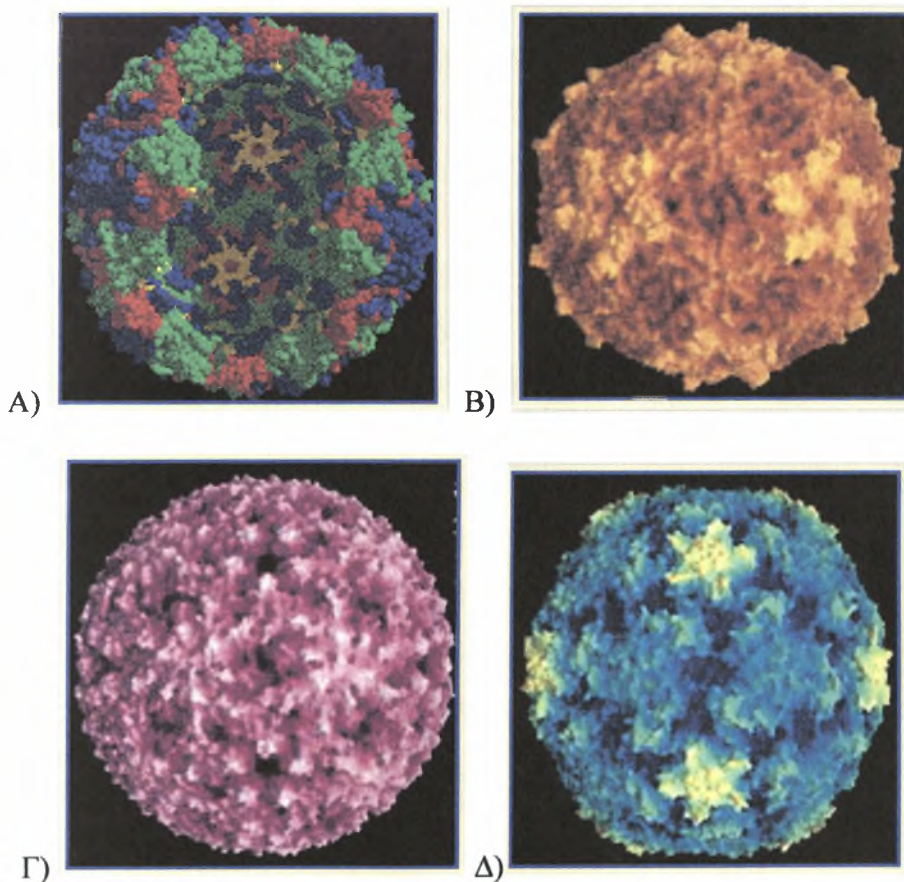
Γενικότερα η ταξινόμηση των εντεροϊών συνεχώς αναβαθμίζεται εξαιτίας της συνεχούς εύρεσης νέων οροτύπων, ενώ ακόμη και σήμερα, υπάρχει ένας αριθμός στελεχών, τα οποία φέρουν τον τίτλο «μη ταυτοποιημένα».

ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ		
Ομάδα I	πολιοϊούς	PV1-3.
Ομάδα II	εντεροϊούς A (HEV-A)	CAV2 έως CAV8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16, EV71, EV76, EV89, EV90, EV91.
Ομάδα III	εντεροϊούς B (HEV-B)	CAV9, CBV1 έως CBV6, E1 έως E7, E9, E11 έως E21, E24 έως E27, E29 έως E33, EV69, EV73, EV77, EV78, EV79 έως EV88, EV97, EV100 και EV101.
Ομάδα IV	εντεροϊούς C (HEV-C)	CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17 έως CAV22 και CAV24.
Ομάδα V	εντεροϊούς D (HEV-D)	EV68 και EV70.

Πίνακας 5: Ταξινόμηση του γένους των Εντεροϊών.

1.2.2 Δομή των εντεροϊών

Οι εντεροϊοί, όπως και όλοι οι Picorna ιοί είναι RNA ιοί ,θετικής πολικότητας, οι οποίοι περιβάλλονται από ένα μη ελκτροφόρο καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας (Rueckert, 1985). Οι Picorna ιοί έχουν ένα σχετικά μικρό γενετικό υλικό και επομένως μπορούν να μελετηθούν άμεσα σε μοριακό επίπεδο. Η δυνατότητα κρυσταλλοποίησης και η εφαρμογή της κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X οδήγησε στην μεγαλύτερη κατανόηση της δομής τους.



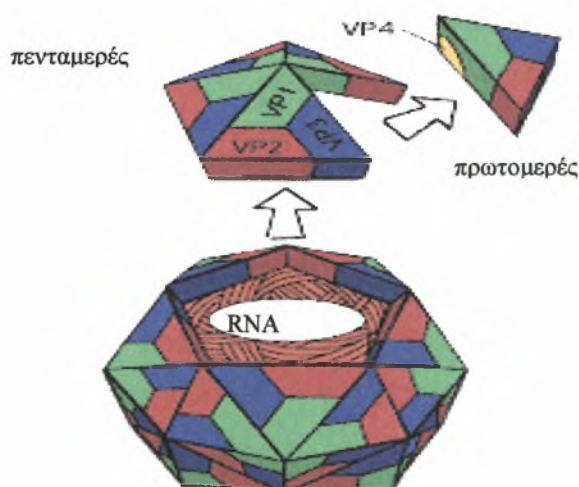
Εικόνα 3. Κρυσταλλογραφική δομή με ακτίνες X διαφόρων Picorna ιών. Α) Ρινοϊός 16, Β) Mengovirus, Γ) Ιός FMDV (γένος Αφθοϊών), Δ) Μοριακή επιφάνεια του Ρινοϊού 14. Ανατύπωση από την ιστοσελίδα www.virology.net/Big_Virology/BVRNAPicorna.html

1.2.2.1 Το καψίδιο

Η θεμελιώδης δομή του καψιδίου είναι η ίδια για όλα τα μέλη της οικογένειας Picornaviridae. Το καψίδιο των εντεροϊών έχει διάμετρο 25 - 35nm και αποτελείται από 60 αντίγραφα 4 πρωτεϊνών VP1- VP2- VP3-VP4 (Rueckert, 1985). Η βασική δομική μονάδα του εικοσαεδρικού καψιδίου είναι ένα πενταμερές, το οποίο αποτελείται από πέντε αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης VP0. Κατά την συγκρότηση του καψιδίου, δώδεκα τέτοια πενταμερή ενώνονται για να σχηματίσουν το ώριμο εικοσαεδρικό καψίδιο πενταμερούς συμμετρίας.

Οι VP1, VP2 και VP3 εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου του ιού, ενώ η VP4 στην εσωτερική. Συγκεκριμένα, οι αναλύσεις δείχνουν, ότι στην επιφάνεια, η VP1 συγκεντρώνεται εξωτερικά σε μία περιοχή, η οποία περιβάλλει τον άξονα πενταμερούς συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 είναι τοποθετημένες η μία δίπλα στην άλλη σε μεγαλύτερη απόσταση από τον άξονα.

Η VP4 διαμορφώνει μία εκτεταμένη δομή, η οποία εντοπίζεται εσωτερικά κάτω από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες έχοντας το N-τελικό της άκρο κοντά στον πενταμερή άξονα και το C-τελικό, κοντά στον άξονα τριμερούς συμμετρίας. Τα πενταμερή σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων του N-τελικού και του C-τελικού άκρου των VP1, VP3 και VP4. Τα γειτονικά πενταμερή, συνδέονται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ τμημάτων των VP2 και VP3 πρωτεϊνών και πιστεύεται, ότι αυτή η χαλαρή σύνδεση διευκολύνει την αποδιάταξη του καψιδίου για την απελευθέρωση του ιϊκού RNA κατά την είσοδο στο κύτταρο ξενιστή (Stanway, 1990).



Εικόνα 4: Αναπαράσταση της δομής του ιϊκού καψιδίου. Παρουσιάζεται η δομή του πρωτομερούς και του πενταμερούς.

Ένα όμως από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά των εντεροϊών είναι η ύπαρξη μιας βαθιάς «αυλάκωσης» που βρίσκεται σε σταθερή ακτίνα γύρω από τον άξονα πενταπλούς συμμετρίας και στα πλάγια της βρίσκονται τμήματα των VP1 και VP3 (Rossmann et al., 1985). Έχει προταθεί ότι αυτή η αυλάκωση εμπλέκεται στην προσκόλληση του ιού σε υποδοχείς των κυττάρων-ξενιστών. Η λογική πίσω από το ρόλο της αυλάκωσης αυτής, πιστεύεται ότι βρίσκεται στο ότι είναι αρκετά μικρή ώστε να αποφύγει την προσκόλληση στο εσωτερικό της των αρκετά ογκωδών για αυτή αντισωμάτων. Παράλληλα όμως, στο εσωτερικό της υπάρχουν οι κατάλληλες περιοχές που μπορούν να ενωθούν με μικρά, συγκεκριμένα τμήματα που προεξέχουν από τους κυτταρικούς υποδοχείς, επιτρέποντας την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Πολλές φαρμακευτικές ουσίες για την καταπολέμηση μολύνσεων από ιούς προκαλούν μια αλλαγή στην στερεοδιάταξη της θέσης αυτής και έτσι εμποδίζεται η δέσμευση του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα.

1.2.2.1.1 Δομικές πρωτεΐνες

Οι δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου κωδικοποιούνται προς το 5' άκρο του γονιδιώματος των εντεροϊών (σχήμα 2). Οι 3 από αυτές (VP1, VP2, VP3) έχουν παρόμοιο μέγεθος (200-300 αμινοξέα) σε διαφορετικούς ριζομα ιούς και σχηματίζουν το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου ενώ η VP4 είναι σημαντικά μικρότερη σε μήκος (68-85 αμινοξέα σε όλα τα γένη των ριζομα ιών εκτός από αυτό των ιών της ηπατίτιδας Α) και βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου (Stanway G., 1990). Οι καψιδικές πρωτεΐνες είναι ποικιλόμορφες και οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ορότυπων είναι ως επί το πλείστον συγκεντρωμένες σε συγκεκριμένα σημεία των τριών κυρίων πρωτεϊνών, συχνά σε υδρόφιλες περιοχές.

Ο πρωταρχικός ρόλος αυτών των πρωτεϊνών έγκειται στο να προσδίδουν στους εντεροϊούς τις αντιγονικές αλλά και άλλες ιδιότητές τους, όπως π.χ. ιδιότητες, που αφορούν στον τρόπο προσκόλλησης στους υποδοχείς των κυττάρων ξενιστών (Stanway, 1990). Πιστεύεται, ότι η VP4, μέσω λειτουργικής τροποποίησης, που περιλαμβάνει σύνδεση με το μυριστικό οξύ στο αμινοτελικό της άκρο (Chow et al., 1987) και δυνατότητα φωσφορυλίωσης από κινάσες (Ratka et al., 1989), συμβάλλει στην

προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, στην αποδιάταξη του καψιδίου και στην απελευθέρωση του ιού στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Επίσης, η VP4 παίζει λειτουργικό ρόλο και κατά τη συγκρότηση του καψιδίου των νεοσχηματισθέντων ιών (Chow et al., 1987).

Τέλος, στην αποδιάταξη του καψιδίου για την απελευθέρωση του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, πιστεύεται ότι συμμετέχει και η VP2, η οποία επίσης παρουσιάζει δυνατότητα φωσφορυλίωσης από κυτταρικές κινάσες (Ratka et al., 1989).

1.2.2.1.2 Λειτουργικές πρωτεΐνες

Οι λειτουργικές πρωτεΐνες των Picorna ιών κωδικοποιούνται από το 3' μισό του γονιδιώματός τους και είναι επτά, οι 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D, αν και σε μερικές περιπτώσεις, φαίνεται ότι και κάποια πρόδρομα μόρια αυτών είναι λειτουργικά. Έτσι, έχειδειχθεί ότι στους πολιοϊούς η πρόδρομος πρωτεΐνη 3 CD^{pro} συμμετέχει στην επεξεργασία των πρόδρομων μορίων των πρωτεϊνών του καψιδίου (Yrma-Wong et al., 1988a). Οι λειτουργικές πρωτεΐνες διαφόρων εντεροϊών είναι πιο συντηρημένες σε σχέση με τις δομικές πρωτεΐνες, γεγονός που εκφράζει, πιθανότατα, έλλειψη ανοσολογικής πίεσης και ανάγκη διατήρησης αμετάβλητων ορισμένων τμημάτων με σημαντική λειτουργία, όπως είναι τα ενεργά κέντρα των ενζύμων.

Οι λειτουργικές πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού RNA, σχετίζονται με διάφορες μεταβολές στον μεταβολικό κύκλο και στην μορφολογία του κυττάρου ξενιστή (Porter, 1993). Ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνονται η αναστολή της μεταγραφής και της μετάφρασης, που εξαρτάται από το σύμπλοκο cap (cap-dependent translation), η διαταραχή της επικοινωνίας μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος και η αναστολή - αναδιαμόρφωση του κυστιδιακού συστήματος μεταφοράς (vesicular transport system). Οι παραπάνω αλλαγές εξυπηρετούν την δημιουργία κατάλληλων συνθηκών για την πραγματοποίηση του ιϊκού πολλαπλασιασμού.

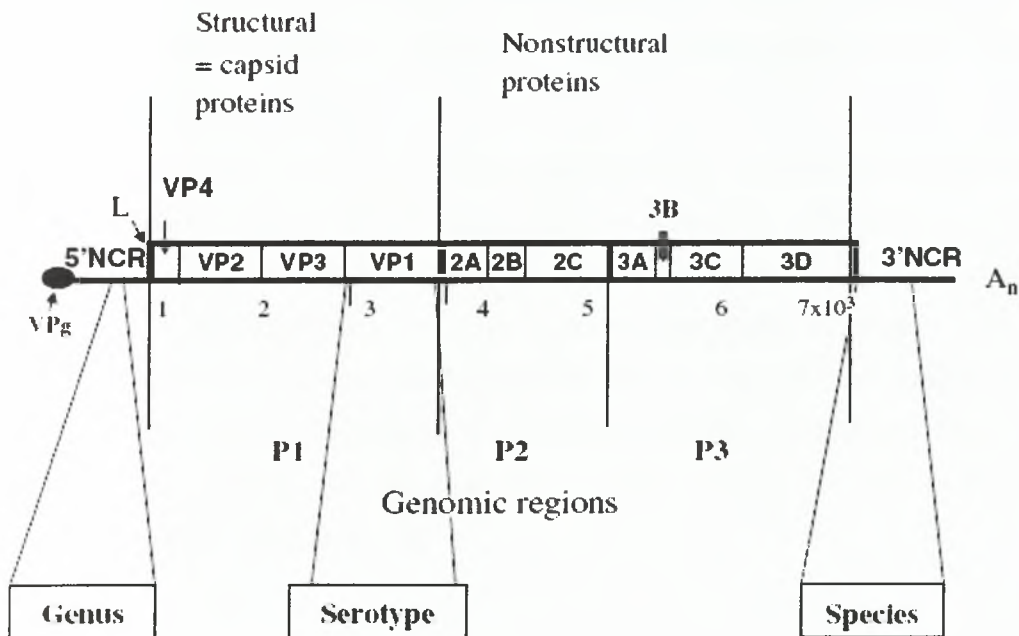
1.2.2.2 Το γονιδίωμα

Οι Picorna ιοί ανήκουν στους μικρότερους RNA ιούς θηλαστικών, που είναι μέχρι σήμερα γνωστοί. Το γονιδίωμα όλων των Picorna ιών είναι ένα μονόκλωνο RNA μόριο, θετικής πολικότητας, το οποίο έχει μήκος 7200 – 8500 νουκλεοτίδια, είναι μεταγραφικά ενεργό και κωδικοποιεί για όλες τις πρωτεΐνες των ιών. Στους εντεροϊούς, διακρίνονται, από το 5' άκρο προς το 3' άκρο:

- **η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR)** των εντεροϊών περιέχει σημαντικά στοιχεία τα οποία συμμετέχουν στην αντιγραφή, μετάφραση και μολυσματικότητα των ιών αυτών και ακριβώς λόγω αυτής της λειτουργικής της σημασίας, δείχνει το χαμηλότερο ρυθμό εξέλιξης μέσω των διαδικασιών δημιουργίας γενετικής ποικιλομορφίας (π.χ μεταλλάξεις) από οποιαδήποτε άλλη περιοχή του γενώματος των εντεροϊών. Το μέγεθος της είναι περίπου 750 νουκλεοτίδια. Τα πρώτα 88 νουκλεοτίδια σχηματίζουν μια δομή σχήματος τριφυλλιού (cloverleaf), ενώ τα νουκλεοτίδια 127 έως 608 αναδιπλώνονται σχηματίζοντας ένα στοιχείο IRES (Internal Ribosome Entry Site) το οποίο είναι υπεύθυνο για την μετάφραση του γενώματος του ιού όπως και για την μολυσματικότητά του (Wimmer et al., 1993). Η 5' UTR των εντεροϊών είναι ασυνήθιστα μεγάλη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των περισσότερων άλλων ιών (αποτελεί το 8-12% του γενώματός τους) και διατηρείται φυλογενετικά σε υψηλό ποσοστό μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων και στελεχών.
- **ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame - ORF)**, μήκους περίπου 2100 κωδικονίων, από το οποίο κωδικοποιούνται όλες οι (δομικές και λειτουργικές) πρωτεΐνες των ιών. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) μεταφράζεται σε μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη η οποία διασπάται αυτοκαταλυτικά από δύο κύριες ιικές πρωτεάσες. Η 2Apro κόβει μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου της VP1 και του δικού της αμινοτελικού άκρου, ξεχωρίζοντας έτσι τις δομικές από τις μη δομικές πρωτεΐνες. Η υπόλοιπη επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης πραγματοποιείται από την πρωτεάση 3C ή από την πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD (Baxter et al., 2006).

- μια 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR), που ποικίλλει σε μήκος μεταξύ των μελών της οικογένειας Picornaίων (από 40 νουκλεοτίδια στους ρινοϊούς έως 126 νουκλεοτίδια στους καρδιοϊούς). Η 3'-μη κωδική περιοχή είναι το σημείο της έναρξης για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού RNA (Oberste et al., 2006). Ενώ η αλληλουχία της 3'-NTR ποικίλει μεταξύ των διαφόρων στελεχών των εντεροϊών, η ύπαρξη πολύ συντηρημένων δευτεροταγών δομών υποδηλώνει ότι αυτές οι δομές είναι οι λειτουργικές μονάδες που εμπλέκονται στην αντιγραφή.

Οι περισσότερες πληροφορίες, σχετικά με την οργάνωση και πιθανή λειτουργία του γονιδιώματος των εντεροϊών προέρχονται από μελέτες, οι οποίες έγιναν εφικτές μετά τον καθορισμό της πρωτοδιάταξης κάποιων μελών, με πρώτο το στέλεχος Mahoney του πολιοϊού τύπου 1 (Kitamura et al., 1981). Σήμερα, ολόκληρο το γονιδίωμα όλων των προτύπων ιών Εντεροϊών έχει προσδιοριστεί και διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο, μέσω των διεθνών τραπεζών δεδομένων, ενώ επιπρόσθετα, διατίθεται η πλήρης ή μερική αλληλουχία πολλών κλινικών στελεχών.



Εικόνα 5. Το γονιδίωμα των εντεροϊών. Διακρίνονται από το 5' προς το 3' άκρο η 5' αμετάφραστη περιοχή (5' NCR), το δομικό (P1) και το λειτουργικό (P2 & P3) γονιδίωμα και η 3' αμετάφραστη περιοχή (3' NCR), με την πολυ-A απόληξη (Baxter et al., 2006).

1.2.3 Υποδοχείς εντεροϊών

Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και γλυκολιπίδια. Πολλές φορές, οι ιοί εισέρχονται στο κύτταρο ξενιστή, μέσω της σύνδεσής τους σε κάποιο μόριο υποδοχέα, αλλά αποτυγχάνουν να ξεκινήσουν τον κύκλο ζωής τους (Evans et al., 1998). Επιτυχημένη μόλυνση προκύπτει μόνο όταν ένας υποδοχέας μπορεί να ξεκινήσει ολόκληρο τον κύκλο ζωής του ιού, από την αναγνώρισή του μέχρι την απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κυτταρόπλασμα. Ένα μόνο μόριο υποδοχέα μπορεί να συμμετέχει σε αυτή τη διαδικασία ή μπορεί να χρειάζονται και άλλα βοηθητικά μόρια για τα διάφορα στάδια.

Συνήθως, στους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στην σχηματιζόμενη αυλάκωση (Rossmann et al., 1985). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν παρόμοια δομή και περιέχουν μια σειρά από περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών .

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο και η απελευθέρωση του γενετικού υλικού ξεκινάει όταν ο κατάλληλος υποδοχέας συνδεθεί με τον αντίστοιχο ιό. Σε πολλές περιπτώσεις, οι υποδοχείς μετατρέπουν τα μολυσματικά καψίδια σε σωμάτια 'Α' , τα οποία έχουν χάσει την πρωτεΐνη VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 βρίσκεται εξωτερικά (Huang et al., 2000).

Μετά την πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς, το ιικό καψίδιο πρέπει να αποδομηθεί προκειμένου να απελευθερώσει το RNA το οποίο στη συνέχεια θα εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, όπου θα ακολουθήσει ο πολλαπλασιασμός του ιού. Για κάποιους picorna-ιούς, η αλληλεπίδραση με τον κυτταρικό υποδοχέα εξυπηρετεί μόνο τη συγκέντρωση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια. Η απελευθέρωση του γενώματος του ιού είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συνυποδοχέα. Για άλλους picorna-ιούς, ο κυτταρικός υποδοχέας επάγει την έναρξη δομικών αλλαγών προκειμένου να απελευθερωθεί το γένωμα του ιού.

1.2.4 Κύκλος Ζωής των εντεροϊών

Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών αρχίζει με την προσκόλληση του καψιδίου στους κατάλληλους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή. Η προσκόλληση αυτή δίνει τα ερεθίσματα για αλλαγές στη χωροδιάταξη του καψιδίου, οδηγώντας στο σχηματισμό των σωματιδίων A (προέρχονται από το καψίδιο έχοντας χάσει την πρωτεΐνη VP4). Το γενετικό υλικό των εντεροϊών δρα ως mRNA και η μετάφρασή του οδηγεί στη δημιουργία της πολυπρωτεΐνης, η οποία διασπάται πρωτεολυτικά δίνοντας τις δομικές και τις μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού (Hellen et al., 1991).

Μετά την μετάφραση του ιικού γενώματος ξεκινάει η αντιγραφή του. Το πρώτο στάδιο της αντιγραφής είναι η δημιουργία του αρνητικού κλώνου ο οποίος χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την σύνθεση του θετικού κλώνου. Στη συνέχεια ακολουθεί ο εγκλεισμός του γενετικού υλικού σε πρώιμη μορφή ιϊκού σωματιδίου το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3. Όταν πραγματοποιηθεί ο εγκλεισμός αυτός του γενώματος, η VP0 διασπάται στις VP2 και VP4 δίνοντας πλέον ένα ώριμο ιϊκό σωματίδιο. Λόγω της αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης από την μόλυνση του ιού, τελικά ο ξενιστής καταστρέφεται, επιτρέποντας την τελική απελευθέρωση των ιών.

1.2.4.1 Μετάφραση

Τυπικά για την μετάφραση ενός ευκαριωτικού mRNA, σχηματίζεται ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, γνωστό ως 43S προεναρκτήριο σύμπλοκο (Wells et al., 1998). Σε αυτήν τη δομή αλληλεπιδρά το 5'-άκρο, το οποίο, κατά κανόνα, περιέχει μια δομή καλύματος, με την πολυαδενυλιωμένη ουρά στο 3'-άκρο. Σε αυτό το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο συμμετέχουν διάφοροι παράγοντες έναρξης της αντιγραφής.

Η έναρξη της μετάφρασης του ιού γενώματος, σηματοδοτεί και μια σειρά αλλαγών μέσα στο κύτταρο ξενιστή, όπως για παράδειγμα τροποποίηση των κανονικών μεταφραστικών παραγόντων (Lloyd, 1988).

Έτσι από τη μετάφραση του γενετικού υλικού του ιού δημιουργείται η ιϊκή πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια θα υποστεί πρωτεόλυση ώστε να προκύψουν όλες οι ιϊκές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Οι πρωτεΐνες των ribonucleoprotein-ιών συντίθενται από τη μετάφραση ενός επιμήκους ανοιχτού πλαισίου

ανάγνωσης του θετικής πολικότητας μονόκλωνου RNA, η οποία ακολουθείται από την πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης από τις ιικές πρωτεάσες .

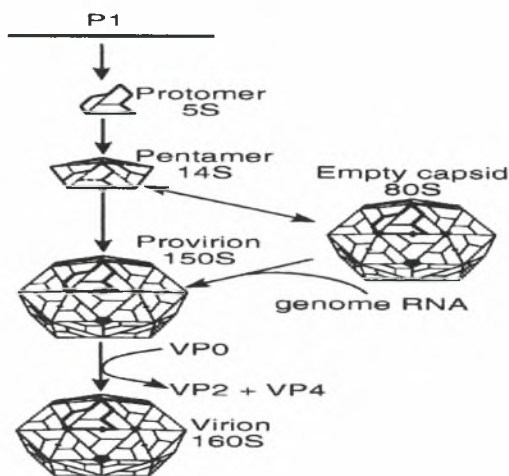
1.2.4.2 Αντιγραφή

Η διαδικασία της αντιγραφής λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) του ξενιστή, όπου συμμετέχουν όλες οι ιϊκές πρωτεΐνες καθώς και οι κυτταρικές πρωτεΐνες του ξενιστή.

Στους εντεροϊούς , το θετικής πολικότητας RNA γένωμα πολλαπλασιάζεται μέσω ενός ενδιάμεσου αρνητικής πολικότητας μορίου (-RNA) από το οποίο θα σχηματιστεί με αντιγραφή το +RNA της θυγατρικής γενιάς. Στη φάση του πολλαπλασιασμού τρεις μορφές RNA απαντούν στο κύτταρο: μονόκλιωνα RNA, replicative intermediate (RI) και replicative form (RF). Το μονόκλιωνα RNA απαντά ως η πιο άφθονη μορφή και είναι αποκλειστικά θετικής πολικότητας. Στην RI μορφή απαντούν συνδεδεμένες στο αντιγραφόμενο μόριο 6-8 αναπτυσσόμενες αλυσίδες αρνητικής πολικότητας. Η RF μορφή είναι μια δίκλιωνα δομή που απαρτίζεται από ολόκληρο το ιικό RNA συνδεδεμένο με το συμπληρωματικό του αντίγραφο. Η αναπαραγωγή του ιικού RNA είναι ασύμμετρη, καθώς η σύνθεση του +RNA είναι 25 έως 65 φορές μεγαλύτερη από αυτή των -RNA (Giachetti and Semler, 1991, Novak et al., 1991).

1.2.4.3 Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων

Ο σχηματισμός των νέων ιικών σωματιδίων ή καψιδίωση φαίνεται πως είναι συζευγμένη με την αντιγραφή του RNA εφόσον και τα δύο γεγονότα συμβαίνουν στην επιφάνεια μεμβρανικών κυστιδίων που επάγονται από τον ιό και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (Ansardi et al. 1996). Στο πρώτο στάδιο της καψιδίωσης, το μυριστιλιωμένο P1 πολυπεπίδιο τεμαχίζεται από την 3CD^{pro} και δίνει τις VP0, VP3 και VP1 οι οποίες τότε συσσωματώνονται ώστε να σχηματίσουν ένα πρωτομερές. Πέντε πρωτομερή συνδυάζονται ώστε να σχηματίσουν ένα πενταμερές και τελικά 12 πενταμερή συνδέονται μεταξύ τους και δίνουν το προκαψίδιο (Pfister et al. 1999). Υπάρχουν δύο μοντέλα όσον αφορά το σχηματισμό του ιικού σωματιδίου: i) το ιικό RNA εισέρχεται στο προκαψίδιο μέσω ενός πόρου, ii) τα πενταμερή συσσωματώνονται γύρω από το ιικό RNA. Κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου της καψιδίωσης, η VP0 τεμαχίζεται στις VP2 και VP4 (πιθανόν αυτοκαταλυτικά) δίνοντας έτσι το ώριμο ιικό σωματίδιο (Basavappa et al. 1994).



Εικόνα 6 : Μορφογένεση των picorna-ίων. Ανατύπωση από Melnick, 1996

1.2.5 Εξέλιξη των εντεροϊών

Κατά την εξέλιξη τους οι εντεροϊοί παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και προσαρμοστικότητα, λόγω των υψηλών ρυθμών ανάπτυξής τους. Αυτή η ποικιλομορφία οφείλεται σε δυο μηχανισμούς, τη μεταλλαξιγένεση και τον γενετικό ανασυνδιασμό (Domingo E. and Holland J.J. 1997).

A. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ: Η δημιουργία μεγάλου αριθμού σημειακών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό των εντεροϊών οφείλεται στο υψηλό ποσοστό λάθους της ιϊκής RNA πολυμεράσης, λόγω της απουσίας μηχανισμού ελέγχου της πιστότητας της αντιγραφής (μηχανισμός proof-reading). Η συχνότητα λάθους ανά κύκλο αντιγραφής υπολογίστηκε περίπου 10^{-4} έως 10^{-5} ανά βάση (Ward et al., 1992), ενώ η αντίστοιχη πιθανότητα λάθους για τις DNA πολυμεράσες είναι μεταξύ 10^{-8} και 10^{-11} (Parvin et al., 1986). Η μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων οδηγεί στην δημιουργία μεγάλων πληθυσμών ιών με διαφορετικούς γονοτύπους και στην ανάγκη εισαγωγής του όρου quasi-species (σχεδόν είδος). Ένα άγριο στέλεχος ορίζεται σαν quasi-species όταν ο πληθυσμός του δεν έχει μια μοναδική αλληλουχία αλλά έχει μια κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων (Domingo et al., 1985). Υπάρχουν κυρίως δυο μηχανισμοί για την επικράτηση των μεταλλάξεων, η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή (Gavrilin et al., 2000). Μια μετάλλαξη μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει τα επίπεδα της ικανότητας του ιού για τον ιδιαίτερο οικολογικό του θώκο ή να τον αφήσει ανεπηρέαστο.

Οι μεταλλάξεις κυρίως εντοπίζονται στις κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3, καθώς και στη 5'- μη κωδική περιοχή. Αυτές οι μεταλλάξεις πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνες για την μολυσματικότητα και τη μεταστροφή των εμβολιακών στελεχών σε παθογόνους ιούς (Georgescu et al., 1997; Friedrich, 2000; Martin and Minor, 2002). Από τις δομικές πρωτεΐνες, η VP1 είναι αυτή που εμφανίζει τις περισσότερες μεταλλάξεις. Αυτό μάλλον συμβαίνει, διότι το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζει τις περισσότερες αντιγονικές θέσεις του ιού, έναντι των οποίων εξασκείται η ανοσολογική πίεση του ξενιστή.

B. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΟΣ : Ο γενετικός ανασυνδυασμός είναι το κυριότερο εργαλείο του εξελικτικού μηχανισμού γενικά όλων των ιών. Με τον ανασυνδυασμό οι ιοί επιτυγχάνουν να αποκτούν νέα χαρακτηριστικά (από τους προγονικούς τους δότες), που τους προσδίδουν εξελικτικό πλεονέκτημα. Ο ανασυνδυασμός που γίνεται είναι ομόλογος (Kirkgaard, K., and Baltimore, D., 1986). Στις περιπτώσεις μη ομόλογων ανασυνδυασμών τα νέα στελέχη δεν είναι βιώσιμα. Οι ανασυνδυασμοί κυρίως παρουσιάζονται στις περιοχές των λειτουργικών πρωτεϊνών, και συγκεκριμένα πιο συχνά στις κωδικές περιοχές 2C και 3D (Georgopoulou, A. and Markoulatos, P., 2001).

Υπάρχουν πρόσφατες μελέτες, οι οποίες προτείνουν, ότι τα είδη των εντεροϊών υφίστανται ως ένα πεδίο από καψιδικά γονίδια και μία δεξαμενή από λειτουργικά γονίδια και 5' μη κωδικές περιοχές (Lukashev et al., 2003a, Oberste et al., 2004c, Santti et al., 1999). Αυτά τα τμήματα γενετικής πληροφορίας εξελίσσονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, ακόμη και σε μικροεξελικτικό επίπεδο, και ανασυνδυάζονται ελεύθερα, παρέχοντας, έτσι, τη δυνατότητα παραγωγής ποικιλιών μιας αρχικής δομής, με μη προβλέψιμες ιδιότητες.

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ένα μοντέλο μοριακής επιδημιολογίας των εντεροϊών, το οποίο παρουσιάζει μία προσαρμοστικότητα με χαρακτήρα παγκοσμίου εμβέλειας, μιας και έχει πολλές φορές παρατηρηθεί, ότι υπότυποι ή γενότυποι εντεροϊών προκαλούν επιδημίες, εξαπλώνονται διεθνώς εντός μερικών χρόνων, κυκλοφορούν για κάποια επιπρόσθετα χρόνια και στη συνέχεια εξαφανίζονται, δίνοντας τη θέση τους σε νέες ποικιλίες. Κατά συνέπεια, μπορεί να υποστηριχθεί, ότι το γένος των εντεροϊών υφίσταται ως μία παγκόσμια δεξαμενή γενετικού υλικού, η οποία εξελίσσεται χρησιμοποιώντας ως μέσα τις μεταλλάξεις και τους ανασυνδυασμούς (Lukashev et al., 2005a).

1.2.6 Μέθοδοι συγκέντρωσης ιών από το νερό

Οι ιοί βρίσκονται συνήθως στο νερό σε συγκεντρώσεις υπερβολικά χαμηλές με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει άμεση ανίχνευση . Η ιολογική έρευνα σε δείγματα νερού είναι μία διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει τη συγκέντρωση των υπάρχοντων ιών και ακολουθεί μια κατάλληλη διαδικασία ανίχνευσης αυτών. Εξαιρεση αποτελεί η ανάλυση των λυμάτων, όπου οι ιοί ενδέχεται να βρίσκονται σε αρκετά υψηλό αριθμό και μπορούν να ανιχνεύονται και χωρίς την διαδικασία της συγκέντρωσης. Ο όγκος του νερού που χρειάζεται για ανάλυση και ο βαθμός συγκέντρωσης που απαιτείται ,θα εξαρτάται από τον αριθμό των ιών που ενδέχεται να υπάρχουν στο δείγμα. Ενώ για τους ιούς στα λύματα απαιτείται ελάχιστη συγκέντρωση για να είναι ανιχνεύσιμοι, στο πόσιμο νερό ή στα υπογεία υδάτα μπορεί να απαιτηθούν πολλές χιλιάδες φορές συγκεντρώσεις για να καταστούν ανιχνεύσιμοι. Είναι συχνά δυνατόν να βρεθούν ιοί σε 100 ml μη συγκεντρωμένου δείγματος σε εισόδους εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, ενώ να απαιτούνται αρκετές εκατοντάδες λίτρα για να ανιχνευτούν στο πόσιμο νερό. Ο τελικός όγκος που προκύπτει από την διαδικασία της συγκέντρωσης συνήθως κυμαίνεται στα 5-10 ml.

Σύμφωνα με τους Block και Schwartzbrod (1989) ορίζεται μια σειρά από κριτήρια που μια ιδανική μέθοδος συγκέντρωσης πρέπει να πληροί για να είναι πρακτική και εύχρηστη. Η μέθοδος θα πρέπει:

- να είναι τεχνικά εύκολη ώστε να επιτευχθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα
- να έχει υψηλό ποσοστό ανάκτησης του ιού
- να μπορεί να συγκεντρώσει ένα εύρος ιών
- να παρέχει ένα μικρό όγκο τελικής συγκέντρωσης
- δεν πρέπει να είναι δαπανηρή
- να είναι σε θέση να επεξεργάζεται μεγάλους όγκους νερού και
- να είναι επαναλήψιμη τόσο ενδοεργαστηριακά όσο και μεταξύ των εργαστηρίων.

Δεν υπάρχει μία μέθοδος που να πληροί όλες αυτές τις απαιτήσεις.

Πολλές μέθοδοι που βασίζονται σε αυτές τις προσεγγίσεις έχουν σχεδιαστεί για τη συγκέντρωση των ιών από το νερό και οι κυριότερες από αυτές συνοψίζονται στον Πίνακα 6.

Summary of concentration techniques for viruses in water and related materials

Technique	Method	Water quality	Initial volume	Relative virus content	Recovery	Capital cost	Recurrent cost	Secondary concentration required?	Comments
Adsorption/elution	Gauze pads	Sewage or effluent	Large	High	Low to medium	Nil	Very low	No	Not quantitative
	Electronegative membranes	All waters	1-1000 l	Low to medium	50-60% with practise	Medium	Medium	Yes	High volumes require dosing pumps
	Electropositive membranes	All waters	1-1000 l	Low to medium	50-60% with practise	Medium	High	Yes	No pre-conditioning required
	Electronegative cartridges	Any low turbidity	1-50 l	Low to medium	Variable: higher with clean waters	Low	Low	Yes	Clogs more quickly than membranes
	Electropositive cartridges	All waters	1-1000 l	Low to medium	Variable	Medium	High	Yes	Wide range of viruses
	Glass wool	All waters	1-1000 l	Low to medium	Variable	Low	Very low	Yes	No pre-conditioning required
	Glass powder	All waters	< 100 l	Any	20-60%	Medium	Low	For volume > 100 l	Special apparatus
Entrapment: ultrafiltration	Alginate membranes	Clean only	Low	High	Good	Low	Low	No	Very slow. Clogs rapidly if turbid
	Single membranes	Clean	Low	Any	Variable	Medium	Low	No	Slow
	Tangential (= cross) flow and hollow fibres	Treated effluents or better	High	Low	Variable	High	Medium	Sometime	Pre-filter for turbid waters
Hydroextraction	Vortex flow	Treated effluents or better	High	Low	Unknown	High	Medium	Unknown	Undeveloped yet
	PEG or sucrose	Any	Low	High	Variable (toxicity)	Negligible	Very low	No	High virus loss in wastewaters
Ultracentrifugation	Clean	Clean	Low	High	Medium	High	Medium	No	Wide range, but usually impractical
	Iron oxide flocculation	All	Low	Any	Variable	Low	Low	No	
Other techniques	Biphasic partition	All	< 7 l	Any	Variable	Low	Low	No	Toxic to cells
	Immunoaffinity and magnetic beads	Unknown	Low	Low	High	High	Low	No	New method

Πίνακας 6 : Μέθοδοι συγκέντρωσης ιών στο νερό

Στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε μέθοδος συγκέντρωσης της κατηγορίας «απορόφηση / έκλουση ». Η ανάπτυξη αυτής της μεθόδου για την ανάκτηση των ιών από τα ύδατα, πηγάζει από το έργο του Melnick και των συνεργατών του στο Χιούστον του Τέξας (Wallis and Melnick, 1967a,b,c). Σε γενικές γραμμές, ένα δείγμα που περιέχει ιό έρχεται σε επαφή με ένα στερεό υπόστρωμα στο οποίο ο ιός θα προσροφηθεί υπό συγκεκριμένο pH και ιοντική ισχύ. Μόλις ο ιός προσροφηθεί, το νερό το οποίο είχε αρχικά χρησιμοποιηθεί, απορρίπτεται. Ο ιός στη συνέχεια με έκλουση συγκεντρώνεται σε μικρότερο όγκο υγρού. Το διάλυμα έκλουσης συνήθως περιλαμβάνει βασικά αμινοξέα (γλυκίνη, λυσίνη) .

Ανάμεσα στις ειδικές μεθόδους που βασίζονται σε αυτή την λογική επιλέχθηκε η προσρόφηση/ έκλουση σε ηλεκτροαρνητικές μεμβράνες (φίλτρα). Αυτές συνήθως κατασκευάζονται από οξική κυτταρίνη ή νιτρική σε διάφορα μεγέθη πόρων. Ο ιός συγκρατείται στο φίλτρο λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων και όχι λόγω μεγέθους . Συνήθως χρησιμοποιούνται μεμβράνες 142 και 293 χιλιοστών διαμέτρου και με μέση διάμετρο πόρων 0,45, 1,2 ή 5 mm . Τα δείγματα του νερού είναι προσαρμοσμένα σε pH 3,5 και μπορούν να προστεθούν Al^{3+} ή Mg^{2+} ιόντα.

1.2.7 Μέθοδοι ανίχνευσης εντεροϊών

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση εντεροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες:

A) στις παραδοσιακές καλλιεργητικές μεθόδους με τη χρήση κυτταρικών σειρών ανάλογα με το είδος του ιού και

B) στις μοριακές όπως η Αλυσιδωτή Αντίδραση της πολυμεράσης που απαιτεί την απομόνωση του RNA του ιού που εξετάζουμε.

Οι μοριακές τεχνικές με βάση έρευνες που έχουν γίνει αναφορικά με την παρουσία των ιών στο υδάτινο περιβάλλον αποδεικνύονται να είναι ταχύτερες , πιο ευαίσθητες και πιο ακριβείς σε σχέση με τις καλλιεργητικές. Επιπλέον με τη χρήση μοριακών τεχνικών είναι δυνατόν να ανιχνευθούν ιοί , που εξαιτίας της αργής τους ανάπτυξης είναι δύσκολο και σε κάποιες περιπτώσεις αδύνατο να καλλιεργηθούν.

- **Παραδοσιακές μέθοδοι για την ανίχνευση εντεροϊών (Peter Muir et al. 1998, Nikolaos Sifakas et al. 2001):**

- **απομόνωση του ιού:** η απομόνωση ενός εντεροϊού από μολυσμένα όργανα και υγρά του σώματος (π. χ μυοκάρδιο, περικαρδικό υγρό ή CSF) παρέχει την ισχυρότερη ένδειξη μόλυνσης από εντεροϊό. Ωστόσο, οι εντεροϊοί σπάνια απομονώνονται από το μυοκάρδιο. Η απομόνωση εντεροϊού από συστατικά του αίματος είναι επίσης χρήσιμη και παρέχει ένδειξη συστημικής μόλυνσης. Η απομόνωση εντεροϊού από τη θρεπτική οδό (εκκρίματα του λαιμού ή δείγματα κοπράνων) παρέχει μόνο περιστασιακή ένδειξη αιτιολογίας επειδή η ύπαρξη του ιού σε αυτές τις θέσεις μπορεί να συμβαίνει απουσία συμπτωμάτων, ιδιαιτέρως στα βρέφη και κατά τη διάρκεια επιδημιών. Παρόλα αυτά, τα κόπρανα είναι το πιο ευαίσθητο δείγμα για την ανίχνευση εντεροϊών και η καλλιέργεια πολιοϊών από κόπρανα συνίσταται για την διάγνωση μολύνσεων από πολιοϊούς. Η επιλογή των κυτταρικών τύπων που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των εντεροϊών είναι επίσης σημαντική. Μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί κάποια κυτταρική σειρά που να επιτρέπει την ανάπτυξη όλων των γνωστών οροτύπων των εντεροϊών. Γι' αυτό συνήθως χρησιμοποιούνται συνδυασμοί των διάφορων κυτταρικών σειρών. Κάτω από ιδανικές συνθήκες, η απομόνωση εντεροϊών μπορεί να είναι εμφανής (παρατήρηση CPE) μέσα σε λίγες μέρες ενώ ίσως χρειαστούν περισσότερες από 14 ημέρες όταν πρόκειται για δύσκολα στελέχη ή μίγματα ιών.

- **Μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση εντεροϊών (Peter Muir et al. 1998, Nikolaos Sifakas et al. 2001):**

-**RT-PCR:** Η ανάπτυξη της τεχνικής της αντίστροφης μεταγραφής και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR), παρέχει έναν εναλλακτικό τρόπο ανίχνευσης του γενετικού υλικού των εντεροϊών. Επίσης, οι δημοσιευμένες αλληλουχίες των εντεροϊών επιτρέπουν την δημιουργία πρωτοκόλλων τα οποία αναγνωρίζουν όλα τα γνωστά στελέχη των εντεροϊών. Έτσι τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν την τεχνική της RT-PCR για την ανίχνευση των εντεροϊών παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία, απαιτούν λιγότερη εργασία και λιγότερο χρόνο για την ολοκλήρωσή τους, μπορούν να ανιχνεύσουν τους περισσότερους αν όχι όλους τους γνωστούς εντεροϊούς (περιλαμβανομένων και αυτών των οποίων δεν είναι εφικτή η καλλιέργειά τους), ενώ κάποια από αυτά παρουσιάζουν και

δυνατότητα οροτυπικής ταυτοποίησης. Συνήθως, οι περιοχές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των εντεροϊών είναι η 5'-NTR και η περιοχή του γονιδίου της VP1 καψιδικής πρωτεΐνης.

Τα μειονεκτήματα των μοριακών τεχνικών όπως αναφέρονται στην πρόσφατη βιβλιογραφία είναι:

- Πρόκειται για δαπανηρές, μη ποσοτικές μεθόδους.
- Γίνεται ανίχνευση και των μη λοιμογόνων ιών.
- Απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και μηχανήματα ακριβείας.
- Υπάρχει ο κίνδυνος ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.
- Υπάρχει ο κίνδυνος αρνητικοποίησης των αποτελεσμάτων λόγω της παρουσίας αναστολέων.
- Δεν επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ μολυσματικών και μη μολυσματικών ιικών σωματιδίων, καθώς ανιχνεύεται μόνο η ύπαρξη του ιικού γονιδιώματος στο εξεταζόμενο δείγμα.

Οι κυριότερες παρατηρήσεις από συγκριτικές μελέτες των δύο παραπάνω μεθόδων ανίχνευσης εντεροϊών είναι :

α) μόνο μικρό ποσοστό των σωματιδίων των ιών που υπάρχουν στα περιβαλλοντικά δείγματα μπορούν να ανιχνευθούν με καλλιεργητικές τεχνικές ,

β) οι μοριακές τεχνικές παρά τα πλεονεκτήματα που εμφανίζουν έναντι των καλλιεργητικών τεχνικών συχνά είναι δύσκολο να εφαρμοστούν με επιτυχία εξαιτίας πληθώρας αναστολέων που υπάρχουν στα περιβαλλοντολογικά δείγματα, και

γ) με την καθιέρωση των μοριακών μεθόδων για την απομόνωση ιών από το περιβάλλον δίνεται η δυνατότητα στους ερευνητές να προχωρήσουν στην μοριακή τυποποίηση των ιών, που είναι ο απώτερος σκοπός των ερευνών, που διεξάγονται σήμερα σε παγκόσμια κλίμακα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψίες

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο του 2008 από διάφορες περιοχές της Θεσσαλίας, Μακεδονίας και Ηπείρου (πίνακας 7). Συλλέχθηκαν συνολικά 26 δείγματα εκ των οποίων τα 19 προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης (Δ.Υ), τα 4 ήταν εμφιαλωμένα νερά που κυκλοφορούσαν στο εμπόριο (ΕΜΦ.), τα 2 ήταν από εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων (Ε.Τ) και το 1 προέρχονταν από εν λειτουργία μηχανήμα ψύκτη νερού (Ψ).

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε πλαστικά αδιαφανή δοχεία χωρητικότητας 4 λίτρων τα οποία πριν την κάθε χρήση πλένονταν με απιονισμένο νερό. Η μεταφορά τους στο εργαστήριο γινόταν με ισοθερμικό δοχείο εντός 12 ωρών από τη δειγματοληψία και αμέσως χωρίς άλλη καθυστέρηση γίνονταν η περαιτέρω επεξεργασία τους.

	ΗΜΕΡΟ-ΜΗΝΙΑ	ΤΟΠΟΣ	ΝΟΜΟΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
1	23-6-08	ΤΥΡΝΑΒΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	NTR 1	Ε.Τ
2	24-6-08	ΠΑΛΑΜΑΣ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	PL 2	Δ.Υ
3	25-6-08	ΑΓΙΟΚΑΜΠΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	AGK 3	Δ.Υ
4	26-6-08	ΑΓΙΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	AG 4	Δ.Υ
5	27-6-08	ΑΡΜΕΝΙΟ	ΛΑΡΙΣΑΣ	ARM 5	Δ.Υ
6	28-6-08	ΚΑΡΔΙΤΣΑ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	KR 6	Δ.Υ
7	28-6-08	ΛΑΡΙΣΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	SX 7	Ψ
8	29-6-08	ΒΡΥΟΤΟΠΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	BRT 8	Δ.Υ
9	30-6-08	ΣΕΡΡΕΣ	ΣΕΡΡΩΝ	SER 9	Δ.Υ
10	30-6-08	ΚΑΤΕΡΙΝΗ	ΠΙΕΡΙΑΣ	KAT 10	Δ.Υ
11	1-7-08	ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	ΤΡΙΚΑΛΩΝ	KAL11	Δ.Υ
12	1-7-08	ΙΤΕΑ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	ΙΤΕΑ 12	Δ.Υ
13	2-7-08	ΟΜΟΡΦΟΧΩΡΙ	ΛΑΡΙΣΑΣ	OMRF 13	Δ.Υ
14	2-7-08	ΓΙΑΝΟΥΛΗ	ΛΑΡΙΣΑΣ	GIAN 14	Δ.Υ
15	4-7-08	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	ΙΟΑΝ 15	Δ.Υ
16	4-7-08	ΒΙΠΕ	ΛΑΡΙΣΑΣ	ΒΙΠΕ 16	Ε.Τ
17	5-7-08	ΕΜΦΙΑΛ. ΑΥΡΑ		ΑΥΡΑ 17	ΕΜ
18	5-7-08	ΕΜΦ. ΣΑΜΑΡΙΝΑ		SAM 18	ΕΜ
19	5-7-08	ΕΜΦ. ΖΑΓΟΡΙ		ZAG 19	ΕΜ
20	6-7-08	ΚΕΝΤΡΟ ΛΑΡΙΣΑΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	LAR 20	Δ.Υ
21	6-7-08	ΕΜΦ. ΛΟΥΤΡΑΚΙ		LOUT 21	ΕΜ
22	7-7-08	ΒΟΛΟΣ	ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	BOL 22	Δ.Υ
23	7-7-08	ΚΟΖΑΝΗ	ΚΟΖΑΝΗΣ	KOZ 23	Δ.Υ
24	8-7-08	ΣΚΑΛΟΧΩΡΙ	ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	SKAL 24	Δ.Υ
25	8-7-08	ΝΕΑΠΟΛΗ	ΚΟΖΑΝΗΣ	NEAP 25	Δ.Υ
26	9-7-08	ΘΕΡΜΗ	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	THES 26	Δ.Υ

Πίνακας 7 : Δείγματα πόσιμου νερού

2.2 Μέθοδοι συγκέντρωσης δειγμάτων

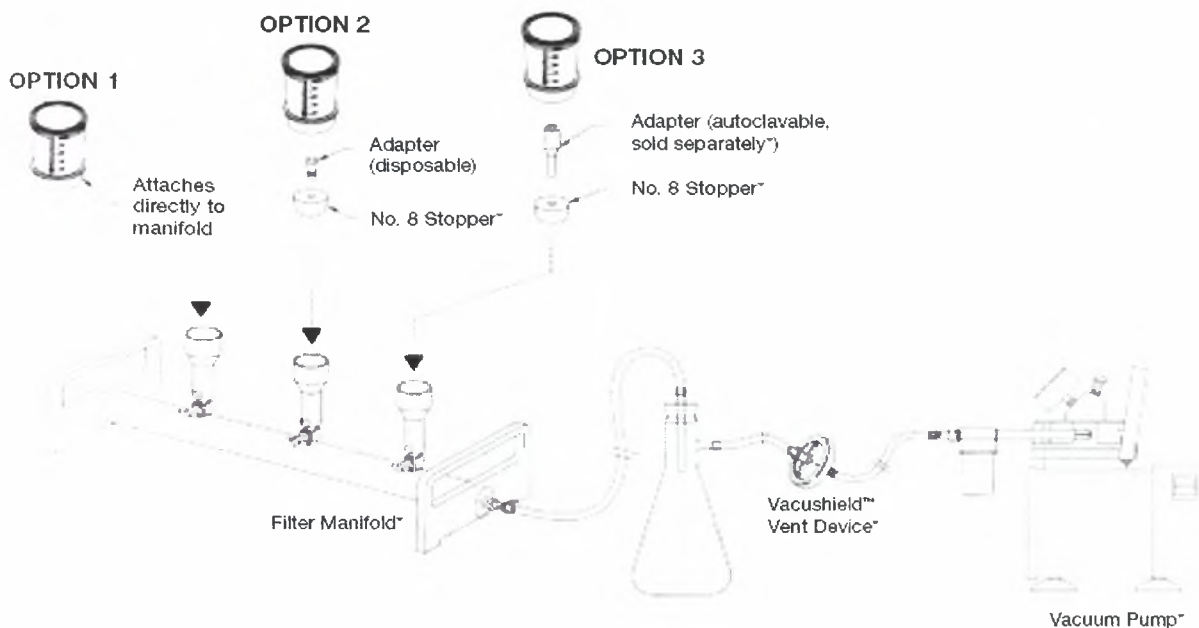
Λόγω του μεγάλου όγκου των δειγμάτων του νερού και της χαμηλής συγκέντρωσης ιόν σε αυτά, προηγούνται μέθοδοι συγκέντρωσής τους πριν την απομόνωση των ιόν. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή είναι η μέθοδος έκλουσης-προσρόφησης σε ηλεκτραρνητικά φίλτρα και η μέθοδος καθίζησης με PEG . Η επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο βιολογικής προστασίας (Biological Safety Cabinet, BSC) επιπέδου 2 (Biological Safety Level, BSL 2).

2.2.1 Μέθοδος προσρόφησης – έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα

Σε 4 λίτρα δείγματος νερού ρυθμίστηκε το PH στο 3,8 με την προσθήκη HCl 3N. Στη συνέχεια τα ικκά σωμάτια φορτίζονται θετικά παρουσία Mg^{2+} , με τη προσθήκη $Mg_2Cl_1.6H_2O$ (Merck, Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,05M και ακολούθησε αργή ανάδευση μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση .

Ακολούθως χρησιμοποιήθηκε μια συσκευή αρνητικής πίεσης (εικόνα 7) όπου τοποθετήθηκε ηλεκτραρνητικά φορτισμένο φίλτρο (MF-Millipore) διαμέτρου 47 mm και μέγεθος πόρου 3 μm και από όπου φιλτραρίστηκε ξεχωριστά το κάθε δείγμα με στόχο να προσροφηθούν στην επιφάνεια του φίλτρου τα ικκά σωμάτια. Ο χρόνος που χρειάστηκε για να ολοκληρωθεί το φιλτράρισμα του κάθε δείγματος ήταν διαφορετικός .

Το φίλτρο στη συνέχεια αφαιρέθηκε από τη συσκευή και τοποθετήθηκε σε τριβλίο petri όπου και υποβλήθηκε δυο φορές σε έκλυση με 10 ml διαλύματος που αποτελούνταν από: Tris 0.05M με PH=9 , εμπλουτισμένου με 3% BSA. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε με αργή ανάδευση για 10 λεπτά. Κατόπιν , το φίλτρο αφαιρέθηκε και φυλάχτηκε στους 4 °C ενώ το διάλυμα που προέκυψε με την ολοκλήρωση των παραπάνω διαδικασιών ρυθμίστηκε σε PH 7 με τη βοήθεια 3N HCl .



Εικόνα 7 : Συσκευή φιλτραρίσματος των δειγμάτων του νερού.

2.2.2 Μέθοδος καθίζησης με PEG

Η συγκέντρωση του υπερκείμενου έγινε μέσω της τεχνικής συγκέντρωσης με πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG), όπου προσθέσαμε στο διάλυμα που προέκυψε μετά την έκλυση 10% PEG6000 (w/v) και NaCl (Sigma, USA) σε τελική συγκέντρωση 0,5M . Ακολούθησε overnight ανάδευση στους 4 °C.

Την επόμενη ημέρα μοιράστηκε το διάλυμα σε tubes των 2ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 ώρα στους 4 °C στις 11.000 rpm. Με την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας δημιουργείται ίζημα σε κάθε tube . Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται σε θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας MEM (no cells) ώστε τελικά να προκύψει ένα διάλυμα 2ml από κάθε δείγμα νερού το οποίο εν συνεχεία φυλάσσεται στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στο επόμενο στάδιο που είναι η εκχύλιση του RNA.

2.3 Εκχύλιση RNA

Για την εκχύλιση του ιικού RNA ακολουθήθηκε η μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (Casas et al. 1995) το οποίο περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Σε eppendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300 μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25 mM sodium citrate (Merck, Germany) .
- Προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (100 mg/ml) (-20 °C) και 100 μl δείγματος.
- Ακολούθως έγινε ισχυρή ανάδευση (vortex) του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών και των ιικών σωματιδίων για την απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων .
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl ισοπροπανόλης (-20 °C) και αφού πραγματοποιήθηκε vortex , τοποθετήθηκε το μίγμα για επώαση στους -20 °C για τουλάχιστον 20 λεπτά.
- Μετά από φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 14000g και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο.
- Στο ίζημα που απέμεινε αναδιαλύθηκε με την προσθήκη 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε vortex για την διαλυτοποίηση του ιζήματος.
- Πραγματοποιήθηκε ξανά φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 14000g ενώ τέλος το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απιονισμένου νερού (ddH₂O) (Sigma, USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών. Τα eppendorf παρέμειναν στους -80 °C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής.

2.4 Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε προκειμένου το ιικό RNA να μετατραπεί σε cDNA έτσι ώστε να μπορέσει να ακολουθήσει PCR . Ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια:

- Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει **1μl/tube** random primers d(N9) (Takara) (50nmol/ μl) , **1μl/tube** 10mM dNTPs και **5μl/tube** ddH₂O .
- Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν **7μl/tube** του παραπάνω μίγματος και **5μl/tube** RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65 °C για 5 λεπτά . Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο.
- Προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει **4μl/tube** ρυθμιστικού διαλύματος 5X (M-MLV reaction buffer) , **2μl/tube** 0,1M DTT , **0,5μl/tube** αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV (200units/μl) , **0,5μl/tube** αναστολέα ριβονουκλεασών RNase out (40units/μl) και **1μl/tube** απεσταγμένο και αποστειρωμένο , ελεύθερο νουκλεασών νερό.
- Στη συνέχεια προστέθηκαν **8μl** του δευτέρου μίγματος σε κάθε eppendorf και πραγματοποιήθηκε ξανά φυγοκέντρηση .
- Ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 λεπτά στους 25 °C , 50 λεπτά στους 37 °C και 15 λεπτά στους 70 °C .
- Άμεση τοποθέτηση των δειγμάτων με το cDNA στον πάγο και φύλαξή τους στους -20 °C.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση PCR χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γενόματος με τη χρήση των ειδικών εκκινητικών μορίων (primers) . Τα εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση όλων των οροτύπων των εντεροϊών σχεδιάστηκαν σε συντηρημένα τμήματα της 5'UTR του γονιδιώματός τους (Πίνακας 8)

Primers	Πολικότητα	Θέση	Αλληλουχία 5' -3'
TS1	sense	66-85	TACC(CT)TTGTACGCCTGTTTT
TS3	antisense	582-599	TTCTCACCATAAGCAGCC
HEV-C-9	antisense	537-558	GGACACCCAAAGTAGTCGGTTC

Πίνακας 8 Εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση των εντεροϊών. Η θέση βασίζεται στο πρότυπο στέλεχος CBV1

Για τον έλεγχο παρουσίας αναστολέων της PCR χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που στοχεύουν το 16sRNA της *Escherichia coli* (Widjojoatmodjo et al., 1995) (πίνακας 9).

Primers	Πολικότητα	Θέση	Αλληλουχία 5' -3'
P11P	sense	1173-1192	GAGGAAGGTGGGGATGACGT
P13P	antisense	1370-1389	AGGCCCGGGAACGTATTAC

Πίνακας 9 Εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση *Escherichia coli*. Η θέση αναφέρεται στο 16sRNA της *Escherichia coli*

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 µl/ tube δείγματος που περιέχει:

Ρυθμιστικό διάλυμα (Taq Buffer 10x)	5 µl/ tube
Μείγμα νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs) , MgCl ₂ 2 mM	5 µl/ tube
Primers (1 µl από τον καθένα με συγκέντρωση 50 pmol)	2 µl / tube
Taq πολυμεράση 5units/ µl	0.5 µl/ tube
ddH ₂ O	34,5 µl/ tube.
Δείγμα cDNA	<u>3 µl/ tube</u>
Σύνολο:	50 µl/ tube

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

1 κύκλος	2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA
20 κύκλους	20 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA. 20 δευτερόλεπτα στους 54 °C για τον υβριδισμό των primers 30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλος	15 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

2.6 Semi -Nested PCR

Το προϊόν της PCR με τα εκκινητικά μόρια TS1-TS3 υποβλήθηκε σε semi-nested PCR χρησιμοποιώντας ως κωδικό εκκινητή τον TS1 και εσωτερικό αντικωδικό τον HEV-C-9.

Σε 47 μl μίγματος που αποτελείται από τις ίδιες (με την πρώτη PCR) συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος (Taq Buffer 10x) , dNTPs , Primers , Taq πολυμεράσης και ddH₂O προστέθηκαν 3 μl από το προϊόν της 1ης PCR . Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι ίδιες με την πρώτη PCR , μόνο που εδώ η θερμοκρασία υβριδισμού ήταν 40 °C και οι κύκλοι της αντίδρασης 45.

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases. Το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 2 χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας .

2.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της snPCR σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml . Από κάθε προϊόν της PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 5 μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης), μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα αγαρόζης . Για τον προσδιορισμό του μήκους των RT-PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους, στη συγκεκριμένη περίπτωση ο ΦΧ174 HaeIII (Invitrogen, UK) και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 120V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

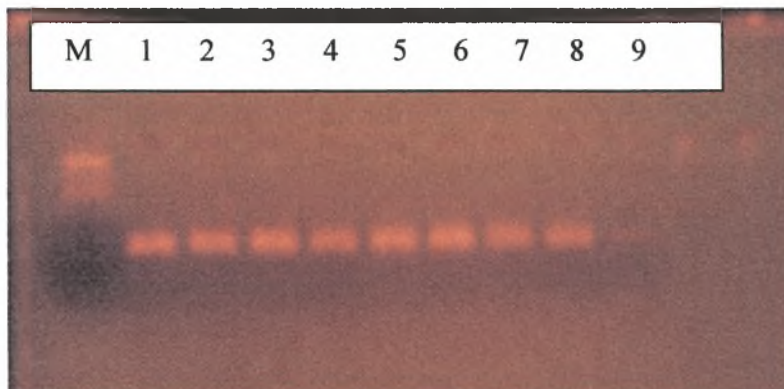
3.1 Επιλογή μεθόδου συγκέντρωσης και ανίχνευσης εντεροϊών

Για την απομόνωση εντεροϊών από το πόσιμο νερό επιλέχθηκε η μέθοδος προσρόφησης - έκλουσης με την χρήση ηλεκτραρνητικών φίλτρων. Προκειμένου να ελεγχθεί η ευαισθησία της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο νερό με γνωστές ποσότητες ιϊκού φορτίου από το εμβολιακό στέλεχος πολιοϊού Sabin2 και αφού ακολουθήθηκαν όλες οι τεχνικές που περιλαμβάνει η μέθοδος (φιλτράρισμα, έκλουση, εκχύλιση, αντίστροφη μεταγραφή, PCR, sp-PCR και ηλεκτροφόρηση) η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίστηκε στο 0,1TCID₅₀/0,1ml .

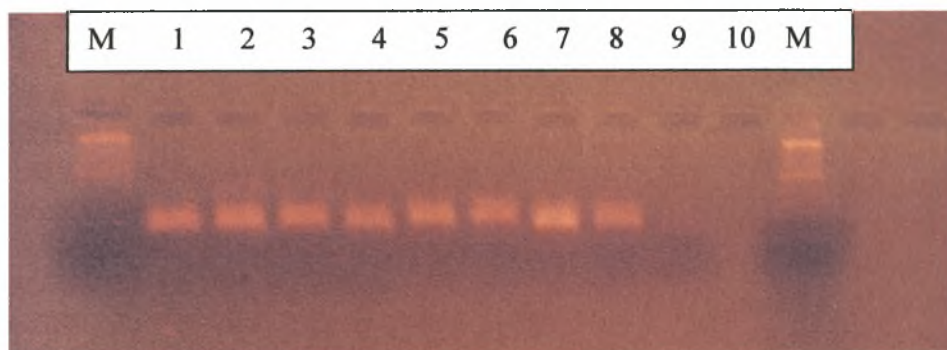
3.2 Έλεγχος αναστολέων

Στα περιβαλλοντικά δείγματα αλλά και στο νερό μπορεί να υπάρχουν τοξικές ενώσεις ή αναστολείς δηλαδή παράγοντες που δεν επιτρέπουν την εφαρμογή της PCR . Γιαυτό το λόγο έγινε έλεγχος για την ύπαρξη αναστολέων σε όλα τα δείγματα νερού χρησιμοποιώντας εκκινητικά μόρια τους P11P- P13P που στοχεύουν το 16sRNA της *Escherichia coli* σύμφωνα με την δημοσίευση των Widjoatmodjo et al .το 1995 .

Το αποτέλεσμα αυτών των ελέγχων ήταν ότι και τα 26 δείγματα πόσιμου νερού ήταν θετικά , πράγμα που σημαίνει από την μια ότι δεν υπήρξαν αναστολείς ή τοξικές ουσίες στα δείγματά μας που να αναστέλλουν την PCR και από την άλλη ότι η *Escherichia coli* ήταν παρούσα σε όλα τα δείγματα (εικόνες 8 και 9) . Τονίζεται, ότι η *Escherichia coli* αποτελεί δείκτη μικροβιολογικής μόλυνσης του πόσιμου νερού.



Εικόνα 8 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με ζεύγος εκκινητικών μορίων τα P11P-P13P. Ως M σημειώνεται μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους ΦΧ174 HaeIII . Στις θέσεις βρίσκονται 1-7 τα προϊόντα των δειγμάτων . Στη θέση 8 ο θετικός μάρτυρας και στη θέσεις 9 ο αρνητικός μάρτυρας.

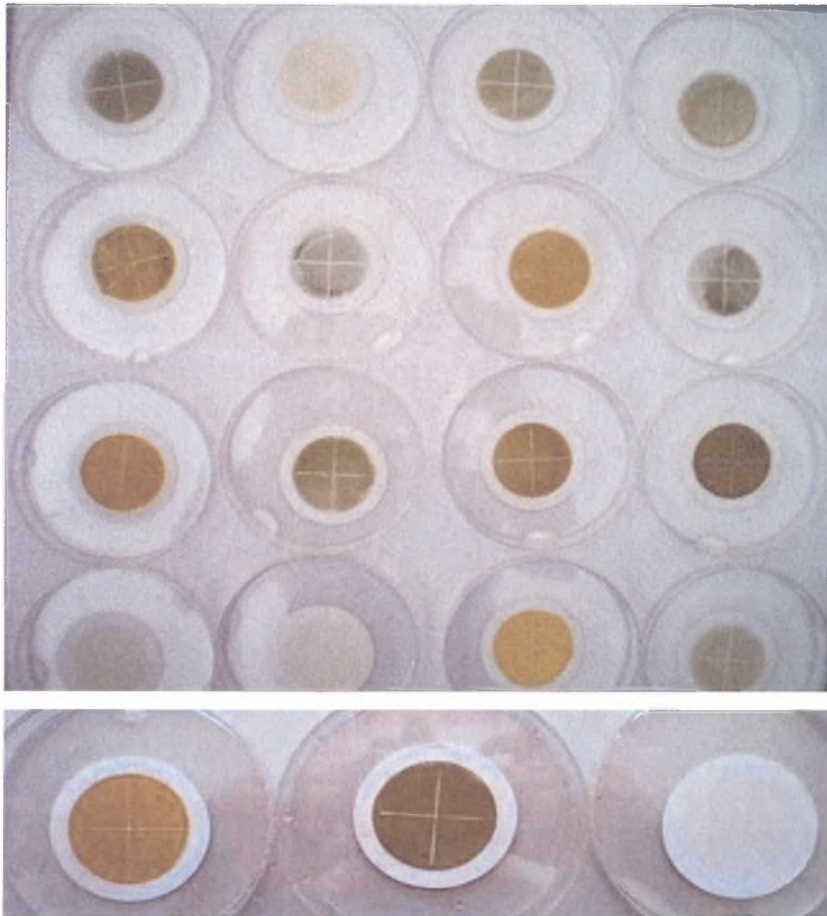


Εικόνα 9 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με ζεύγος εκκινητικών μορίων τα P11P-P13P. Ως M σημειώνεται μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους ΦΧ174 HaeIII . Στις θέσεις βρίσκονται 1-7 τα προϊόντα των δειγμάτων και στην θέση 8 ο θετικός μάρτυρας. Στις θέσεις 9 και 10 έχουμε δυο αρνητικούς μάρτυρες.

3.3 Προσρόφηση σε ηλεκτραρνητικά φορτισμένα φίλτρα

Η διαδικασία του φιλτραρίσματος πραγματοποιήθηκε εντός 12 ωρών από την συλλογή των δειγμάτων νερού. Ο χρόνος που χρειάστηκε για να ολοκληρωθεί το φιλτράρισμα των 4 λίτρων από κάθε δείγμα ήταν διαφορετικός και κυμάνθηκε από 30 λεπτά ως και 8 ώρες. Αυτό συνέβη διότι αν και όλα τα δείγματα προέρχονταν από επεξεργασμένα νερά που χαρακτηρίζονταν ως πόσιμα, εντούτοις ο διαφορετικός τρόπος επεξεργασίας τους κατά την απολύμανσή τους ή κατά την μεταφορά τους μέσω των δικτύων ύδρευσης τα έκανε να φέρουν διαφορετικό αριθμό σωματιδίων τα οποία εμπόδιζαν την γρήγορη ροή του νερού από τα φίλτρα.

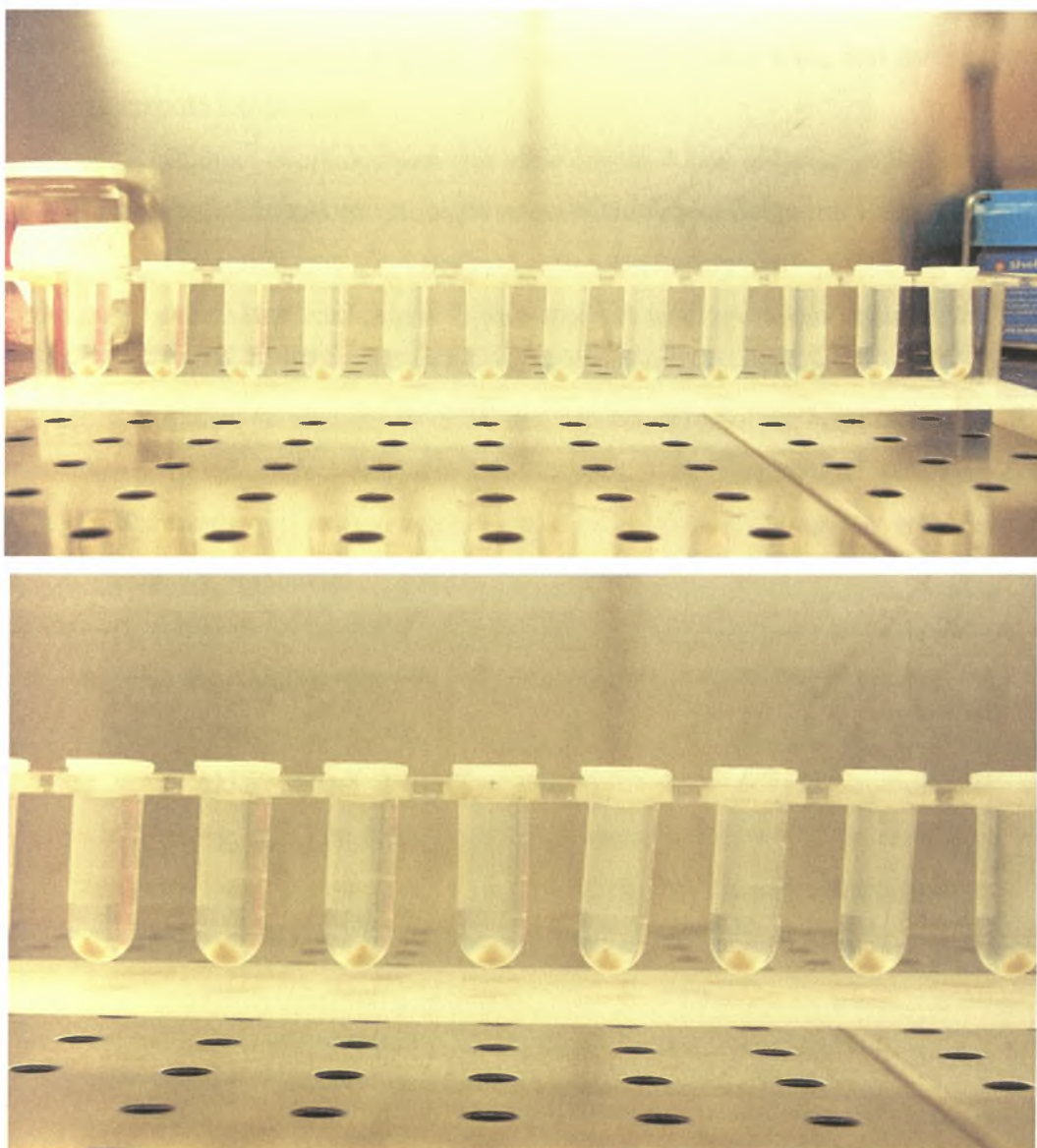
Αυτό αποτυπώνεται και στην μακροσκοπική οπτική παρατήρηση των φίλτρων στο τέλος της διαδικασίας φιλτραρίσματος όπου ο χρωματισμός αυτών ήταν διαφορετικός για κάθε δείγμα (εικόνα 10).



Εικόνα 10 Οπτική εικόνα των φίλτρων μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας του φιλτραρίσματος

3.4 Μέθοδος καθίζησης με PEG

Μετά το φιλτράρισμα των δειγμάτων και την έκλουση αυτών ακολουθήθηκε η μέθοδος καθίζησης με PEG προκειμένου να συγκεντρωθούν οι ιοί . Το τελικό στάδιο αυτής της διαδικασίας ήταν η παραγωγή ενός ιζήματος που μεταξύ των άλλων περιέχονται και οι ιοί. Η ποσότητα του ιζήματος που προέκυψε από το κάθε δείγμα ήταν και πάλι διαφορετική μεταξύ των δειγμάτων νερού (εικόνα 11).



Εικόνα 11 : Συγκέντρωση ιζημάτων μετά την εφαρμογή της μεθόδου καθίζησης με PEG

3.5 Ανίχνευση εντεροϊών

Αφού ολοκληρώθηκαν οι μέθοδοι συγκέντρωσης των ιών από τα δείγματα του νερού σε τελικό όγκο 2 ml, ακολούθησαν μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση των εντεροϊών που περιελάμβαναν τα στάδια της εκχύλισης, της αντίστροφης μεταγραφής, της PCR, της semi-Nested PCR και της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της semi-Nested PCR.

Για καθένα από τα 26 δείγματα νερού έγιναν τέσσερις επαναλήψεις όλων των παραπάνω σταδίων προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα ανίχνευσης εντεροϊού σε κάποιο δείγμα.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν $4 \times 26 = 104$ sn PCR και μόνο τρεις από αυτές έδωσαν θετικό σε εντεροϊό αποτέλεσμα.

Όπως προαναφέρθηκε εφαρμόστηκαν για κάθε δείγμα 4 επαναλήψεις χωρίς όμως καμία επανάληψη να επιβεβαιώσει τα τρία προαναφερθέντα θετικά δείγματα. Επιπρόσθετα από άλλη ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας τα τρία θετικά δείγματα εξετάστηκαν με καλλιεργητικές τεχνικές προκειμένου να ανιχνευθούν οι εντεροϊοί. Όμως πάλι δεν επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη εντεροϊών στα εξεταζόμενα δείγματα.

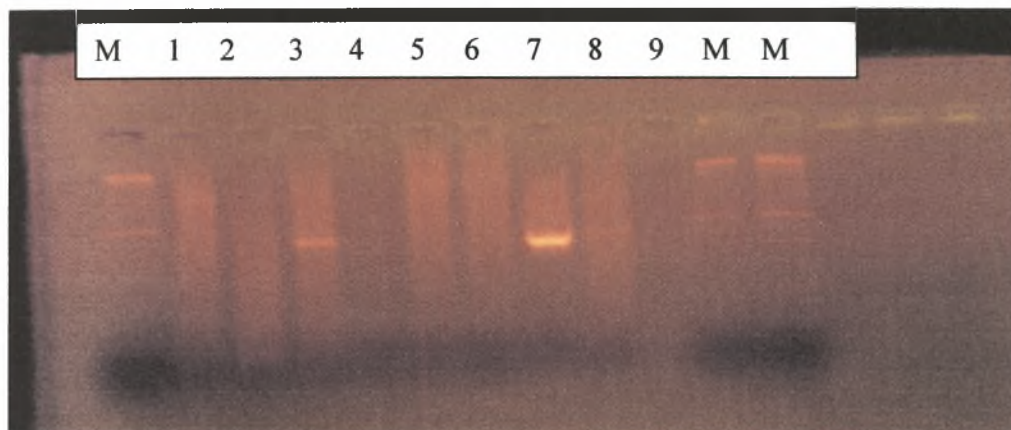
Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αλλά και την ευαισθησία της semi-Nested PCR σε επιμολύνσεις, τα τρία θετικά δείγματα θεωρούνται ως «ψευδώς θετικά» (εικόνα 12) και δεν είναι αξιόπιστα για να τεκμηριώσουμε την ανίχνευση εντεροϊών στα δείγματα πόσιμου νερού που εξετάσαμε.

Άρα σε κανένα από τα 26 δείγματα πόσιμου νερού που εξετάστηκαν με τις μεθόδους και τις τεχνικές που περιγράφησαν παραπάνω δεν ανιχνεύτηκε εντεροϊός. (εικόνα 13).

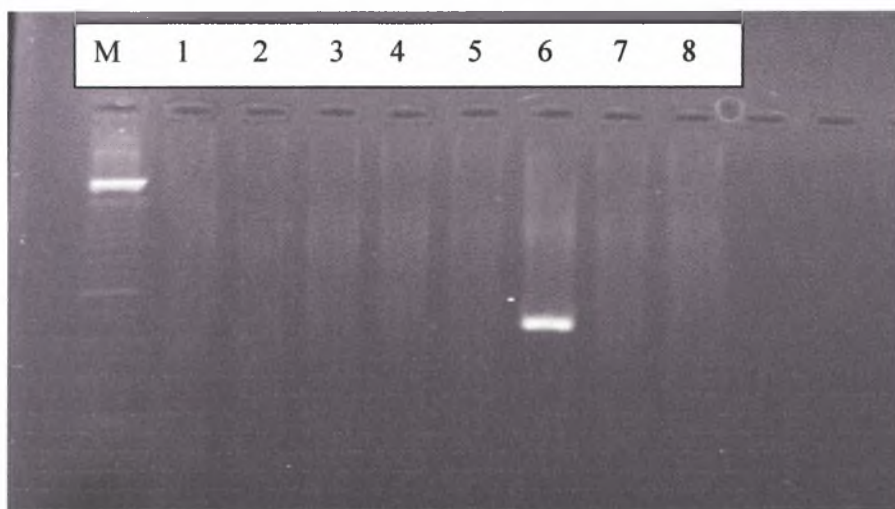
Η μη ανίχνευση παθογόνων εντεροϊών στο πόσιμο νερό τελικά δεν αποκλείει την παρουσία τους, αλλά μπορεί απλώς να οφείλεται στην έλλειψη ευαισθησίας των τεχνικών ανίχνευσης κάτι που δηλώνει ότι η προσπάθεια ανίχνευσης θα έπρεπε να γίνει σε πολλαπλάσιο του όγκου των 4 L και / ή την αντιπροσωπευτικότητα της δειγματοληψίας.

Δείγμα	Ημερομηνία δειγματοληψίας	1 snPCR	2 snPCR	3 snPCR	4 snPCR
NTR 1	23-6-08	-	-	-	-
PL 2	24-6-08	-	-	-	-
AGK 3	25-6-08	-	-	-	-
AG 4	26-6-08	-	-	-	-
ARM 5	27-6-08	-	-	-	-
KR 6	28-6-08	-	-	-	-
SX 7	28-6-08	-	-	-	-
BRT 8	29-6-08	-	+	-	-
SER 9	30-6-08	-	-	-	-
KAT 10	30-6-08	-	-	-	-
KAL11	1-7-08	-	-	-	-
ITEA 12	1-7-08	-	-	-	-
OMRF 13	2-7-08	-	-	-	-
GIAN 14	2-7-08	-	-	-	-
IOAN 15	4-7-08	-	-	-	-
BIPE 16	4-7-08	+	-	-	-
AVRA 17	5-7-08	-	-	-	-
SAM 18	5-7-08	-	-	-	-
ZAG 19	5-7-08	-	-	-	-
LAR 20	6-7-08	-	-	-	-
LOUT 21	6-7-08	-	-	-	-
BOL 22	7-7-08	-	-	-	-
KOZ 23	7-7-08	+	-	-	-
SKAL 24	8-7-08	-	-	-	-
NEAP 25	8-7-08	-	-	-	-
THES 26	9-7-08	-	-	-	-
Σύνολο θετικών δειγμάτων		2	1	0	0
Ποσοστό θετικών		7.7%	3.8%	0%	0%
Γενικό σύνολο θετικών από όλες τις sn PCR :				3	
Γενικό ποσοστό θετικών από όλες τις sn PCR :				2.9 %	

Πίνακας 10 : Αποτελέσματα ανίχνευσης εντεροϊών στα δείγματα νερού



Εικόνα 12 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων sn PCR με ζεύγος εκκινητικών μορίων τα TS1- HEVC9. Ως M σημειώνεται μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους . Στις θέσεις 1,3,5 βρίσκονται τα προϊόντα των δειγμάτων και στην θέση 7 ο θετικός μάρτυρας. Στις θέσεις 2,4,6,8,9 έχουμε τους αρνητικούς μάρτυρες. Σημειώνεται ότι το δείγμα στη θέση 3 χαρακτηρίζεται ως ψευδώς θετικό.



Εικόνα 13 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων sn PCR με ζεύγος εκκινητικών μορίων τα TS1- HEVC9. Ως M σημειώνεται μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους . Στις θέσεις 1,3 βρίσκονται τα προϊόντα των δειγμάτων και στην θέση 6 ο θετικός μάρτυρας. Στις θέσεις 2,4,5,7,8 έχουμε τους αρνητικούς μάρτυρες.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

4.1 Κατευθυντήριες Γραμμές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για το πόσιμο νερό

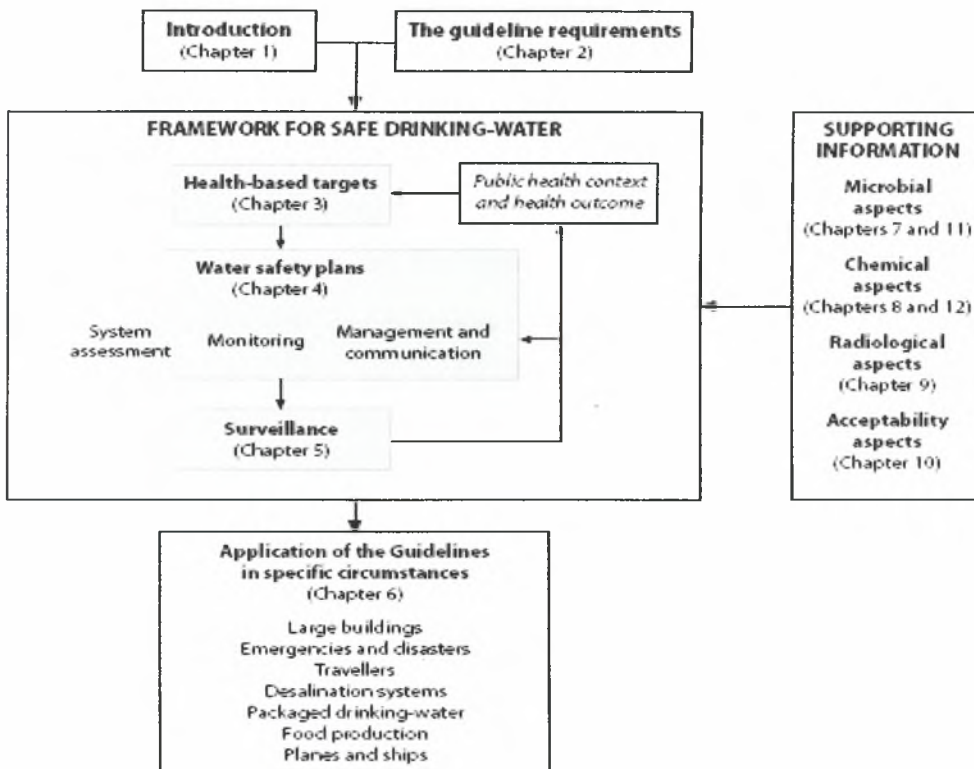
Η σημασία του νερού για την υγεία και την ανάπτυξη απασχόλησε τους λαούς διεθνώς και το 1977 διεξήχθη η Παγκόσμια Διάσκεψη για το νερό στη Mar del Plata, στην Αργεντινή ενώ το 1978 πραγματοποιήθηκε η πρώτη Διεθνής Διάσκεψη για την Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας, στην Άλμα Ατα στο Καζακστάν (πρώην Σοβιετικής Ένωσης). Οι αναπτυξιακοί στόχοι της χιλιετίας που αφορούν το νερό εγκρίθηκαν από η Γενική Συνέλευση των Ηνωμένων Εθνών (ΟΗΕ) το 2000 και υιοθετήθηκαν το 2002 στο Γιοχάνεσμπουργκ στην Παγκόσμια Διάσκεψη Κορυφής για την Αειφόρο Ανάπτυξη . Πιο πρόσφατα, η Γενική Συνέλευση του ΟΗΕ κήρυξε την περίοδο από το 2005 έως το 2015 ως τη Δεκαετία για τη Δράση "Νερό για τη ζωή."

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η πρόσβαση σε ασφαλές πόσιμο νερό είναι απαραίτητη για την υγεία, είναι ένα βασικό ανθρώπινο δικαίωμα και ένα στοιχείο αποτελεσματικής πολιτικής για την προστασία της υγείας σε εθνικό, περιφερειακό και τοπικό επίπεδο. Σε ορισμένες περιοχές, έχει αποδειχθεί ότι οι επενδύσεις στην ύδρευση και την αποχέτευση, μπορεί να αποφέρουν καθαρό οικονομικό όφελος, δεδομένου ότι οι μειώσεις των δυσμενών επιπτώσεων στην υγεία και το κόστος της υγειονομικής περίθαλψης υπερκαλύπτουν το κόστος των επενδύσεων. Η εμπειρία έχει επίσης δείξει ότι οι παρεμβάσεις που αποσκοπούν στη βελτίωση της πρόσβασης σε ασφαλές νερό ιδίως υπέρ των φτωχών, σε αγροτικές ή αστικές περιοχές μπορούν να αποτελέσουν ουσιαστικό μέρος της στρατηγικής για την καταπολέμηση της φτώχειας.

Κατά το 1983-1984 και 1993-1997, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας δημοσίευσε την πρώτη και τη δεύτερη έκδοση των κατευθυντήριων γραμμών για την ποιότητα του πόσιμου νερού βασιζόμενος στα Διεθνή Πρότυπα. Το 1995 ελήφθη απόφαση να επιδιώξει την περαιτέρω ανάπτυξη των κατευθυντήριων γραμμών και ορισμένες αναθεωρήσεις. Έτσι υπήρξαν προσθήκες , σχετικά με τις χημικές και μικροβιολογικές παραμέτρους το 1998, 1999 και 2002.

Το 2004 δημοσιεύτηκε η Τρίτη έκδοση των κατευθυντήριων γραμμών και περιέχει καθοδήγηση σχετικά με τις ορθές πρακτικές, την επιτήρηση, την παρακολούθηση και την αξιολόγηση του πόσιμου νερού (εικόνα 14). Το 2005 και το 2008 υπήρξαν προσθήκες σύμφωνα με τα νεότερα επιστημονικά δεδομένα. Υπάρχουν ουσιαστικές αναθεωρήσεις των προσεγγίσεων για την μικροβιακή ασφάλεια αφού έχουν ληφθεί υπόψη οι σημαντικές εξελίξεις στη μικροβιακή αξιολόγηση του κινδύνου συναρτήσει με τη διαχείριση του κινδύνου.

Οι κατευθυντήριες γραμμές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας αντιπροσωπεύουν τη θέση του ΟΗΕ σχετικά με τα προβλήματα της ποιότητας του πόσιμου νερού και της υγείας. Αυτές απευθύνονται κατά κύριο λόγο στις ρυθμιστικές αρχές και στους πολιτικούς υπευθύνους με σκοπό να βοηθήσουν στην ανάπτυξη εθνικών προτύπων.



Εικόνα 14: Οι σχέσεις των κεφαλαίων των κατευθυντήριων γραμμών του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για την ποιότητα του πόσιμου νερού.

Όσο αφορά τους εντεροϊούς ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συνιστά ότι το πόσιμο νερό πρέπει να είναι ουσιαστικά απαλλαγμένο από εντεροϊούς ενώ θέτονται και προδιαγραφές που αφορούν την επεξεργασία και την απολύμανση του πόσιμου νερού. Η Επιστημονική Ομάδα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η παρουσία ακόμα και ελαχίστων συγκεντρώσεων εντερικών ιών σε ένα μεγάλο όγκο πόσιμου νερού αποτελεί απειλή για

τη δημόσια υγεία (WHO, 2003) Έτσι τα μέτρα ελέγχου για τη μείωση των δυνητικών κινδύνων από εντεροϊούς θα πρέπει να επικεντρωθούν στην πρόληψη της μόλυνσης από τα ανθρώπινα απόβλητα, ακολουθούμενη από την κατάλληλη επεξεργασία και απολύμανση. Η αποτελεσματικότητα των διαδικασιών επεξεργασίας του νερού που χρησιμοποιούνται για την αφαίρεση απομάκρυνση των εντεροϊών απαιτεί επικύρωση. Επίσης οι συμβατικοί οργανισμοί δείκτες π.χ E. coli δεν είναι αξιόπιστοι δείκτες για την παρουσία / απουσία εντεροϊών στο πόσιμο νερό.

Σύμφωνα με την φιλοσοφία που διέπει τον Π.Ο.Υ αντί της καθιέρωσης υποχρεωτικών οριών, είναι προτιμότερο να υιοθετηθούν οι κατευθυντήριες γραμμές σε τοπικό ή εθνικό πλαίσιο ανάλογα με τις περιβαλλοντικές, κοινωνικές, οικονομικές και πολιτιστικές συνθήκες. Ο κύριος λόγος για τον οποίο δεν προωθεί την υιοθέτηση των διεθνών προτύπων για την ποιότητα του πόσιμου νερού είναι το πλεονέκτημα που παρέχει η προσέγγιση της χρήσης ενός μοντέλου «κινδύνου-οφέλους» για την συγκρότηση των εθνικών προτύπων και κανονισμών. Επιπλέον, οι κατευθυντήριες γραμμές εφαρμόζονται καλύτερα μέσω μιας ολοκληρωμένης διαχείρισης για την ασφάλεια του καταναλωτή.

Οι κατευθυντήριες γραμμές παρέχουν μια επιστημονική αφετηρία για τις εθνικές αρχές να αναπτύξουν Κανονισμούς και Πρότυπα εφαρμόσιμα και κατάλληλα για την εθνική κατάσταση. Στις αναπτυσσόμενες χώρες θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για να εξασφαλιστεί ότι οι σπάνιοι πόροι δεν θα γίνουν αντικείμενο άσκοπης εκμετάλευσης για την ανάπτυξη προτύπων και τον έλεγχο των ουσιών με σχετικά μικρή σημασία για τη δημόσια υγεία. Τα πρότυπα του πόσιμου νερού ενδέχεται να διαφέρουν μεταξύ των χωρών και δεν υπάρχει ανάγκη για ενιαία προσέγγιση η οποία θα είναι γενικής εφαρμογής όμως απαιτείται μια συνεχή προσπάθεια για την διατήρηση της ποιότητας του πόσιμου νερού σε όσο το δυνατόν υψηλότερο επίπεδο.

Για παράδειγμα η **Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (US EPA)** απαιτεί όλα τα συστήματα που χρησιμοποιούν τα επιφανειακά ή τα υπόγεια ύδατα να μειώσουν το επίπεδο των ιών κατά 99, 99% (4 log μείωση). Επιπρόσθετα στις 20 Ιουλίου 2003 προσδιορίστηκε ότι το επίπεδο των εντερικών ιών πρέπει να είναι μηδέν πριν από την ανθρώπινη κατανάλωση τόσο στο πόσιμο νερό όσο και στα υπόγεια ύδατα.

Οι Καναδικές κατευθυντήριες γραμμές υποστηρίζουν ότι ο καλύτερος τρόπος για την αποφυγή της παρουσίας των εντερικών ιών στο πόσιμο νερό βασίζεται στην αποτελεσματικότητα της απολύμανσης και την χρήση κατάλληλων δεικτών περιττωματικής μόλυνσης, όπως η *Escherichia coli*.

Οι Αιγυπτιακές οδηγίες και τα πρότυπα για το πόσιμο νερό ακόμα και σήμερα δεν περιλαμβάνουν τους ιούς στις παραμέτρους για την ποιότητα του νερού .

Στη Σαουδική Αραβία ιολογικά πρότυπα για ποιότητα των υδάτων δεν έχουν καθοριστεί αλλά η εθνική Νομοθεσία απλώς αναφέρει ότι η παραγωγή νερού χωρίς ιούς είναι προτιμότερη.

Δυστυχώς, οι ιοί δεν περιλαμβάνονται με αυστηρότητα στα πρότυπα για την ποιότητα του νερού στις περισσότερες περιοχές του πλανήτη για τους εξής λόγους:

- Ιολογική έρευνα στο νερό απαιτεί υψηλής στάθμης εξοπλισμένο εργαστήριο.
- Οι μέθοδοι συγκέντρωσης των ιών δεν έχουν υψηλό ποσοστό ανάκτησης.
- Οι μη καλλιεργήσιμοι ιοί απαιτούν μοριακές μεθόδους για την ανίχνευση τους και πιο σύνθετες μεθόδους για την τυποποίησή τους.
- Οι ιοί που βρίσκονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης στο νερό.
- Η ιολογική ανάλυση απαιτεί καλά εκπαιδευμένους εργαζόμενους και είναι δαπανηρή.
- Οι ιοί δεν πολλαπλασιάζονται στο νερό και δεν είναι σταθεροί σε συνθήκες περιβάλλοντος.

4.2 Γενική Πολιτική της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το Νερό

Το «νερό» είναι το πιο σφαιρικά νομοθετημένο αντικείμενο στον τομέα της νομοθεσίας του περιβάλλοντος στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η ανάπτυξη της ευρωπαϊκής πολιτικής για το νερό άρχισε στη δεκαετία του 70 με το «Πρώτο Πρόγραμμα Δράσης για το Περιβάλλον», το 1973 το ακολούθησε το πρώτο νομοθετικό πακέτο, αρχής γενομένης το 1975 με την Οδηγία για το Επιφανειακό Νερό και ολοκληρώθηκε το 1980 με την Οδηγία για το Πόσιμο νερό. Το πρώτο αυτό νομοθετικό πακέτο περιελάμβανε νομοθεσία για νερό ανάπτυξης ψαριών (1978), για νερό ανάπτυξης οστρακοειδών (1979), νερά κολύμβησης (1976) και υπόγεια νερά (1980).

Ένα δεύτερο πακέτο νομοθεσίας που ακολούθησε αναθεώρησε τις αρχικές Οδηγίες, συμπλήρωσε κενά και βελτίωσε συγκεκριμένα σημεία. Η φάση αυτή περιελάμβανε την Οδηγία Επεξεργασίας Αστικών Λυμάτων (1991) και την Οδηγία για τα Νιτρικά (1991). Γίνονται προτάσεις αναθεώρησης της Οδηγίας για το Πόσιμο Νερό (1994) και για την Οδηγία των Νερών Κολύμβησης (1995) και δρομολογούνται οι σχετικές διαδικασίες. Αναπτύσσεται το Πρόγραμμα Δράσης για τα Υπόγεια Νερά και το 1994 δημοσιοποιείται η πρόταση για Οδηγία για την Οικολογική Ποιότητα του Νερού.

Το 1996 ψηφίζεται η Οδηγία IPPC που αφορά την μόλυνση του νερού από μεγάλες βιομηχανικές εγκαταστάσεις.

Την περίοδο αυτή, μετά από εκτενείς συζητήσεις σε επίπεδο Κρατών Μελών και Κοινότητας, είχε γίνει σαφές ότι η αποτελεσματική προστασία του νερού απαιτούσε νομοθεσία τόσο για τις τιμές των ορίων εκπομπής καθώς και νομοθεσία για τα πρότυπα ποιότητας του νερού, δηλαδή μία συνδυασμένη προσέγγιση. Η συνδυασμένη προσέγγιση είναι σύμφωνη και με τις αρχές που υιοθετήθηκαν στην Συνθήκη, την αρχή της πρόληψης, την αρχή ότι η περιβαλλοντική βλάβη πρέπει κατά προτεραιότητα να διορθώνεται στην πηγή καθώς και την αρχή ότι πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι περιβαλλοντικές συνθήκες της κάθε περιοχής.

4.2.1 Η Οδηγία Πλαίσιο για το Νερό (Οδηγία 2000/60/EK)

Το 1995 τα Ευρωπαϊκά Όργανα συμφώνησαν ότι χρειαζόταν πλέον μια θεμελιακή αναθεώρηση της Κοινοτικής Πολιτικής για το νερό. Η Επιτροπή που εξέταζε την ανάγκη μιας σφαιρικής προσέγγισης αναφορικά με την Πολιτική Νερού εδέχθη σχετικές αιτήσεις από την Επιτροπή Περιβάλλοντος του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και το Συμβούλιο Υπουργών Περιβάλλοντος. Μετά από εκτενείς συζητήσεις με τα ενδιαφερόμενα μέρη, όπως τοπική και περιφερειακή διοίκηση, χρήστες νερού, εταιρίες ύδρευσης, βιομηχανία, καταναλωτές οικολόγους και μη κυβερνητικούς οργανισμούς, η Επιτροπή υιοθέτησε τον Φεβρουάριο του 1997 την Πρόταση για Οδηγία Πλαίσιο για το Νερό. Ο σκοπός της Οδηγίας αυτής είναι να θέσει ένα πλαίσιο προκειμένου να επιτύχει τους παρακάτω βασικούς στόχους μιας βιώσιμης πολιτικής νερού :

- επάρκεια πόσιμου νερού
- επάρκεια για άλλες οικονομικές δραστηριότητες
- προστασία του περιβάλλοντος
- αντιμετώπιση των δυσμενών επιπτώσεων από πλημμύρες και ξηρασίες.

Ο περιβαλλοντικός στόχος της Οδηγίας είναι να επιτύχει «καλή κατάσταση» για τα υπόγεια και επιφανειακά νερά το αργότερο το 2010.

Η εφαρμογή των παραπάνω συνεπάγεται ότι τα Κράτη Μέλη πρέπει:

1. να προσανατολίσουν την νομοθεσία τους με τις απαιτήσεις της Οδηγίας Πλαίσιο για το Νερό καθώς πρόκειται να αποτελέσει το μελλοντικό νομοθετικό πλαίσιο για τη πολιτική νερού της Ε.Ε. και πιθανότατα θα τεθεί σε εφαρμογή αμέσως μετά την αποδοχή του. Επιπλέον θα απορροφήσει και θα συμπεριλάβει παλαιότερη νομοθεσία

όπως η Οδηγία για το Επιφανειακό Νερό, η Οδηγία για τα Νερά ανάπτυξης Ψαριών και Οστράκων καθώς και η Οδηγία για τα υπόγεια νερά,

2. να οριοθετήσουν τις υδρολογικές λεκάνες και να ιδρύσουν τις αρμόδιες αρχές προκειμένου να επιτηρούν την ποσότητα και την ποιότητα του νερού,

3. να προσδιορίσουν τα υπόγεια και επιφανειακά νερά που προορίζονται για πηγές πόσιμου νερού,

4. να εκτιμήσουν τις ανθρωπογενείς επιπτώσεις στα επιφανειακά και υπόγεια νερά για κάθε υδρολογική λεκάνη λαμβάνοντας υπόψη τις επιπτώσεις μόλυνσης από σημειακές πηγές, μόλυνσης από διάσπαρτες πηγές, άντλησης νερού και άλλες ανθρώπινες δραστηριότητες με επίπτωση στην κατάσταση του νερού,

5. να αναπτύξουν διαχειριστικά σχέδια των υδρολογικών λεκανών βασισμένα στις ανάγκες για νερό, τις επιπτώσεις των ανθρώπινων δραστηριοτήτων στους υδάτινους όγκους και τους στόχους διαφύλαξης της ποιότητας και ποσότητας του νερού,

6. να κάνουν οικονομική ανάλυση για κάθε υδρολογική λεκάνη προκειμένου να προσδιοριστεί το πραγματικό κόστος για τις απαιτούμενες χρήσεις νερού (διαφοροποιήσεις επί της αρχής ότι πρέπει να πληρώνονται οι πραγματικές τιμές χρήσης νερού μπορεί να επιτραπούν σε εθνικό επίπεδο σε ειδικές περιπτώσεις που ορίζονται στην Οδηγία και ακολουθώντας συγκεκριμένη διαδικασία),

7. να ορίσουν και εφαρμόσουν προγράμματα μέτρων με υποχρεωτική νομική ισχύ προκειμένου να επιτευχθούν οι στόχοι. Τέτοια προγράμματα θα περιλαμβάνουν βασικά μέτρα (εφαρμογή της Κοινοτικής νομοθεσίας, χρέωση των πραγματικών τιμών νερού κλπ) καθώς και συμπληρωματικά μέτρα απαραίτητα για να επιτευχθεί η απαραίτητη καλή κατάσταση του υδάτινου συστήματος,

8. να εμπλέξουν τα ενδιαφερόμενα μέρη όπως άλλα σχετικά κυβερνητικά τμήματα, τοπική αυτοδιοίκηση, επιχειρήσεις ύδρευσης και αποχέτευσης, βιομηχανία και εμπόριο, γεωργία, καταναλωτές και οικολογικές ομάδες σε διάλογο για τα διαχειριστικά σχέδια των υδρολογικών λεκανών.

Με την Απόφαση αριθ. 2455/2001/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 20ης Νοεμβρίου 2001 η Οδηγία 2000/60/ΕΚ τροποποιήθηκε και συμπληρώθηκε με τη θέσπιση του καταλόγου ουσιών προτεραιότητας στον τομέα του νερού. Η Απόφαση ουσιαστικά ορίζει ένα κατάλογο 33 ενώσεων ή ομάδων ενώσεων που θεωρούνται ιδιαίτερα τοξικές για το περιβάλλον και ειδικότερα για τον άνθρωπο και αναθεωρεί ή συμπληρώνει το σχετικό πίνακα I της Οδηγίας 76/464/ΕΟΚ.

4.3 Κοινοτική Οδηγία 98/83 για το πόσιμο νερό

Η προστασία του πόσιμου νερού αποτελεί στόχο Εθνικής και Κοινοτικής πολιτικής και υπόκειται σε συμφωνίες υποχρεωτικού χαρακτήρα με σκοπό τη διατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του, ώστε να διασφαλίζεται η προστασία της Δημόσιας Υγείας. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ ορισμένων αποδεκτών ορίων, που αποτελούν και τα πρότυπα ποιότητας του νερού, θεσπίζονται δε νομοθετικά.

Τα πρότυπα αυτά έχουν καθορισθεί με την Οδηγία 98/83 Ε.Κ. και αναφέρονται στην Κοινή Υπουργική Απόφαση (ΚΥΑ) Υ2/2600/2001 (ΦΕΚ 892/ 11.7.2001).

Η Οδηγία αυτή υιοθετήθηκε για την αναπροσαρμογή της οδηγίας 80/778/ΕΟΚ (Υ.Δ. Α5/288/86, ΦΕΚ 53/Β/20-2-1986) που ίσχυε μέχρι τις 25/12/03, στην επιστημονική και τεχνολογική πρόοδο με βάση την εμπειρία που αποκτήθηκε με την εφαρμογή της και με στόχο να καταστεί εφικτή η τήρηση των απαιτητών βασικών ποιοτικών και υγειονομικών παραμέτρων. Σύμφωνα με την Οδηγία, ως «πόσιμο» νερό νοείται το νερό που χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση, είτε στη φυσική του κατάσταση, είτε μετά από επεξεργασία, ανεξάρτητα από την προέλευση του και από το εάν παρέχεται από δίκτυο διανομής, από βυτίο ή συσκευασμένο σε φιάλες ή δοχεία και περιλαμβάνει:

- Το νερό που διατίθεται για ανθρώπινη κατανάλωση (πόση, μαγείρεμα, προπαρασκευή τροφής ή άλλες οικιακές χρήσεις).
- Το νερό που χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών για την παρασκευή, επεξεργασία, συντήρηση ή εμπορία προϊόντων ή ουσιών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.
- Το νερό που επηρεάζει τον τελικό βαθμό υγιεινής των τροφίμων και ποτών.

Τα Κράτη Μέλη πρέπει να επιτηρούν την ποιότητα του πόσιμου νερού και να παίρνουν τα απαραίτητα μέτρα για τη συμβατότητα του με τα υποχρεωτικά πρότυπα. Η Οδηγία καθορίζει παραμέτρους και όρια, συχνότητα δειγματοληψιών και αναλύσεων και μεθόδους αναφοράς για τις αναλύσεις.

Η εφαρμογή των παραπάνω συνεπάγεται ότι τα Κράτη Μέλη πρέπει:

1. να καθιερώσουν σύστημα δειγματοληψιών και αναλύσεων για το πόσιμο νερό, συμπεριλαμβανομένων του εμφιαλωμένου και του νερού των δικτύων ύδρευσης καθώς και του νερού που χρησιμοποιείται στην παραγωγή τροφίμων. Ωστόσο, επαφίεται στη διακριτική ευχέρεια των Κρατών Μελών αν αυτό θα οργανωθεί σε εθνικό, περιφερειακό

ή τοπικό επίπεδο

2. να προσδιορίσουν τα συστήματα παροχής πόσιμου νερού που δεν πληρούν τις προδιαγραφές και αναπτύξουν προγράμματα μέτρων για την αντιμετώπιση των προβλημάτων όπως εύρεση και εξάλειψη της ρύπανσης, αλλαγή της πηγής ύδρευσης, επεξεργασία του νερού πριν τη διάθεση στο δίκτυο ύδρευσης,

3. να αναπτύξουν αναλυτικές επενδυτικές στρατηγικές προκειμένου να αντιμετωπίσουν τις απαιτούμενες δαπάνες για την βελτίωση, αντικατάσταση ή κατασκευή νέων δικτύων και μονάδων επεξεργασίας,

4. να δώσουν ιδιαίτερο βάρος στην αντιμετώπιση του προβλήματος των νιτρικών που προέρχονται από αγροτικές χρήσεις και του μολύβδου που προέρχεται από δίκτυα διανομής,

5. να εκτιμήσουν το κόστος για τους καταναλωτές και αναπτύξουν πολιτική ανάκτησης του κόστους

6. να εκτιμήσουν την ανάγκη για εκπαίδευση προσωπικού συντήρησης και λειτουργίας δικτύων ύδρευσης και εγκαταστάσεων επεξεργασίας νερού καθώς και στελεχών στην οικονομική διοίκηση και προγραμματισμό τέτοιων συστημάτων.

Επίσης με την Νέα Οδηγία οι παράμετροι και οι τιμές αυτών επανεξετάστηκαν και καθορίστηκαν νέες τιμές και ανώτατα επιτρεπτά όρια λαμβάνοντας υπ' όψη, μεταξύ άλλων, τους εξής παράγοντες:

- Τις πιο πρόσφατες καθοδηγητικές τιμές του Π.Ο.Υ για κάθε παράμετρο.
- Τις γνωμοδοτήσεις της συμβουλευτικής επιτροπής της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις χημικές ουσίες.
- Την επιστημονική γνώση, εξέλιξη και εμπειρία.

4.3.1 Μικροβιολογικές παράμετροι

Σύμφωνα με την Κοινοτική Οδηγία η εκτίμηση της ποιότητας του νερού, από μικροβιολογική άποψη, βασίζεται στην αναζήτηση μικροβίων δεικτών, κυρίως παρουσίας περιττωματικών ουσιών στο νερό. Οι δείκτες αυτοί είναι αλλόχθονοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι περνούν παροδικά μέσα στο υδάτινο οικοσύστημα, προερχόμενοι κυρίως από το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θερμοαίμων ζώων. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, αν υπάρχουν στο νερό, υπάρχουν σε πολύ

χαμηλότερο αριθμό από την κοινή φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου, για δε την απομόνωση τους απαιτούνται πολύπλοκες, χρονοβόρες και δαπανηρές εξετάσεις. Η αναζήτηση παθογόνων μικροοργανισμών δεν είναι κατάλληλη για έλεγχο ρουτίνας, δεδομένου ότι από άποψη Δημόσιας Υγείας μας ενδιαφέρει όχι τόσο εάν το νερό περιέχει πράγματι παθογόνους μικροοργανισμούς, όσο το αν μπορεί να περιέχει. Η αναζήτηση της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας παρέχει πολύ μεγαλύτερο όριο ασφαλείας.

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες είναι τα ολικά κωλοβακτηριοειδή, η *E.coli*, οι Εντερόκοκκοι, το *Cl. perfringens*, οι κοινοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί, η *Ps. aeruginosa*.

Ολικά κωλοβακτηριοειδή: Ανήκουν στην οικογένεια των Εντεροβακτηριακών. Τυπικά γένη συναντώμενα στα δίκτυα νερού είναι τα *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Klebsiella*. Δεν θεωρούνται σαν ειδικοί δείκτες κοπρανόδους μόλυνσης του νερού, δεδομένου ότι πολλά είδη είναι περιβαλλοντικής προέλευσης (έδαφος, φύλλα κ.λ.π.) Παρέχουν ενδείξεις για άλλης προέλευσης μικροβιακής μόλυνσης του νερού, συμπληρώνοντας έτσι τα στοιχεία που παρέχονται από άλλες παραμέτρους. Αποτελούν ενδεικτική παράμετρο.

E.coli: Ανήκει στα κωλοβακτηριοειδή, συνεπώς είναι μέλος της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών και θεωρείται ο βασικός δείκτης κοπρανόδους μόλυνσης, τόσο του πρωτογενούς, όσο και του κατεργασμένου νερού. Η *E.coli* αποτελεί μόνιμο ξενιστή του εντέρου των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων, όπου μπορεί να υπάρχει σε μεγάλους αριθμούς (μέχρι και 10^9 /gr κοπράνων) και μπορεί να αντιπροσωπεύει το 95% των Εντεροβακτηριακών που ανευρίσκονται στα κόπρανα. Τα χαρακτηριστικά επιβίωσης και η ευαισθησία της στα απολυμαντικά είναι όμοια με εκείνα πολλών παθογόνων μικροβίων, ιδιαίτερα δε με την *Σαλμονέλλα* και την *Σιγκέλλα*. Λόγω των ιδιοτήτων αυτών, η *E.coli* είναι ο καλλίτερος βιολογικός δείκτης κοπρανόδους μόλυνσης του νερού. Η απομόνωση της από δείγματα νερού, αποδεικνύει πέρα από κάθε αμφιβολία την πρόσμιξη του νερού με περιττωματικές ουσίες, υποδηλώνοντας ότι και οποιοσδήποτε άλλος μικροοργανισμός που τυχόν βρίσκεται στο έντερο των ανθρώπων και των ζώων μπορεί να εισχωρήσει στο νερό και κατ' επέκταση και παθογόνοι μικροοργανισμοί, επισημαίνοντας τους δυνητικούς κινδύνους μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων.

Εντερόκοκκοι: Ανήκουν στην οικογένεια των Στρεπτοκόκκων, στην ομάδα των D κατά Lancefield. Αποτελούνται από διάφορα είδη που υπάρχουν στα κόπρανα ανθρώπων και

θερμόαιμων ζώων. Στα κόπρανα ανθρώπων οι εντερόκοκκοι σπανίως υπερβαίνουν τους 10^6 /gr, ενώ στα κόπρανα των ζώων υπάρχουν σε μεγαλύτερο αριθμό από την E.coli. Σπανίως πολλαπλασιάζονται στο νερό και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα περιβαλλοντικά stress και στην χλωρίωση από την E.coli. Η παρουσία τους αποτελεί απόδειξη μόλυνσης του ύδατος με περιττωματικές ουσίες και δη παλαιότερης μόλυνσης. Ο κύριος λόγος αναζήτησης τους είναι η εκτίμηση της σημασίας της παρουσίας Ολικών Κωλοβακτηριοειδών επί απουσίας E.coli καθώς και η παροχή συμπληρωματικών πληροφοριών για την εκτίμηση της έκτασης πιθανής κοπρανώδους μόλυνσης.

Cl. perfringens (βλαστικές μορφές και σπόροι). Αποτελεί είδος του γένους των θειοαναγωγικών κλωστηριδίων. Παράγει σπόρους ανθεκτικούς στο περιβάλλον που επιζούν στο νερό και στο περιβάλλον για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από την E.coli. Στα κόπρανα ανευρίσκεται σε πολύ μικρότερους αριθμούς από ότι η E.coli και ο εντερόκοκκος. Ως εκ τούτου είναι λιγότερο ευαίσθητος δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης. Αναζητείται όταν το νερό προέρχεται ή επηρεάζεται από επιφανειακά νερά. Χρησιμοποιείται σαν δείκτης ελέγχου της αποτελεσματικότητας της επεξεργασίας του νερού. Σε περίπτωση μη τήρησης της παραμετρικής αυτής τιμής θα πρέπει να εξετάζεται η παροχή νερού για να εξασφαλισθεί ότι δεν υπάρχει ενδεχόμενος κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία λόγω παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών όπως π.χ. Κρυπτοσπορίδιο.

Pseudomonas aeruginosa: Βρίσκεται στα κόπρανα των ανθρώπων, αλλά σε μικρότερη ποσότητα από ότι τα κωλοβακτηριοειδή. Είναι ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός και δεν συνιστάται η αναζήτηση του σε επίπεδο ρουτίνας. Έχει σημασία όμως για τα εμφιαλωμένα νερά και για νερά ειδικών περιπτώσεων (νοσοκομειακά, παραγωγή φαρμάκων, κολυμβητικές δεξαμενές, spa κ.λ.π.).

Ολικός αριθμός κοινών αερόβιων μικροβίων στους 37°C και 22°C . Η παράμετρος αυτή, δεν παρέχει ακριβή στοιχεία για τη μικροβιολογική ποιότητα του νερού, δίνει όμως σημαντικές πληροφορίες ως προς τη σταθερότητα της ποιότητας του, καθώς και της αποτελεσματικότητας της χλωρίωσης και της σωστής λειτουργίας του υδραγωγείου. Αυξομειώσεις του ολικού αριθμού της τάξεως 1-2 λογαρίθμων αποτελούν ένδειξη επιμόλυνσης η οποία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (προβλήματα στη μονάδα επεξεργασίας του νερού, ανάπτυξη βιολογικού υμενίου στο δίκτυο, επιμόλυνση της πηγής υδροληψίας κ.λ.π).

Με την Νέα Οδηγία έχουν γίνει τροποποιήσεις σχετικά με τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά και έχουν καθορισθεί:

A. παραμέτροι που έχουν άμεση σημασία για την προστασία της ανθρώπινης υγείας (υποχρεωτικές παράμετροι) και περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς που δεν είναι παθογόνοι από μόνοι τους, αλλά η παρουσία τους επισημαίνει ενδεχομένως την παρουσία ή τη δυνατότητα παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών και

B. παραμέτροι που αναφέρονται σαν ενδεικτικές παράμετροι δηλαδή που από μόνες τους δεν εμφανίζουν κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, αλλά η παρουσία τους παρέχει σαφείς ενδείξεις μεταβολών στην ποιότητα του νερού και την ενδεχόμενη ανάγκη επανορθωτικών δράσεων κατά τρόπο ώστε να προστατεύεται η ανθρώπινη υγεία. Οι τιμές αυτές έχουν καθορισθεί μόνο για λόγους παρακολούθησης.

Υποχρεωτικές παραμέτροι σύμφωνα με τη νέα Οδηγία είναι, όπως φαίνεται και στον πίνακα 11, η *E. coli* και οι Εντερόκοκκοι, για δε το νερό που πωλείται σε φιάλες ή δοχεία είναι η *E. coli*, οι Εντερόκοκκοι, η *Ps. Aeruginosa* και οι κοινοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί στους 22 °C και 37 °C.

Ενδεικτικές παράμετροι είναι οι κοινοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί στους 37 °C και, 22 °C, τα ολικά κωλοβακτηριοειδή και το *Cl perfringens* (βλαστικές μορφές και σπόροι), όταν το νερό προέρχεται ή επηρεάζεται από επιφανειακά νερά (πίνακας 12).

Για το νερό	
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΤΙΜΗ
<u>E.coli</u>	0/100 ml
<u>Εντερόκοκκοι</u>	0/100 ml

Για το νερό που πωλείται σε φιάλες	
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΤΙΜΗ
E.coli	0/250 ml
Εντερόκοκκοι	0/250 ml
Ps. Aeruginosa	0/250 ml
Ολικός αριθμός κοινών αεροβίων μικροβίων 22 °C	100/ml
Ολικός αριθμός κοινών αεροβίων μικροβίων 37 °C	20/ml

Πίνακας 11. Υποχρεωτικές Μικροβιολογικές παράμετροι

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή	Μονάδα	Σημειώσεις
<i>Clostridium perfringens</i> (+ σπόρια)	0	αρ/100ml	
Κολοβακτηριοειδή	0	αρ/100ml	
Αριθμός αποικιών σε 22 ^ο C και 37 ^ο C	Χωρίς ασυνήθη μεταβολή		αρ/ml
Χρώμα	Αποδεκτό στους καταναλωτές και χωρίς ασυνήθη μεταβολή		
Αγωγιμότητα	2500	μS cm ⁻¹ /20° C	
Συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου	≥ 6,5 και ≤ 9,5	Μον. pH	
Σίδηρος	200	μg/l	
Μαγγάνιο	50	μg/l	
Οσμή	Αποδεκτή στους καταναλωτές και χωρίς ασυνήθη μεταβολή		
Οξειδωσιμότητα	5,0	mg/l O ₂	
Θειικά άλατα	250	mg/l	
Νάτριο	200	mg/l	
Γεύση	Αποδεκτή στους καταναλωτές και χωρίς ασυνήθη μεταβολή		
Ολικός οργανικός άνθρακας (TOC)	Χωρίς ασυνήθη μεταβολή		
Αργίλιο	200	mg/l	
Αμμώνιο	0,50	mg/l	
Χλωριούχα άλατα	250	mg/l	
Υπολειμματικό χλώριο		mg/l	
Θολότητα	Αποδεκτή στους καταναλωτές και χωρίς ασυνήθη μεταβολή		
ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ			
Τρίτιο	100	becquerel/l	
Ολική ενδεικτική δόση	0,10	mSv/χρόνο	

Πίνακας 12. Ενδεικτικές παράμετροι

Για το νερό που πωλείται σε φιάλες

Προστίθεται μία νέα παράμετρος αυτή της *Pseudomonas aeruginosa*, οι δε παραμετρικές τιμές για *E.coli*, Εντεροκόκκους, *Pseudomonas aeruginosa* και ολικά κολοβακτηριοειδή βασίζονται σε όγκο δείγματος νερού 250 ml για κάθε παράμετρο. Δίδονται δε παραμετρικές τιμές για την παράμετρο του ολικού αριθμού κοινών αεροβίων μικροβίων στους 37^ο C και 22^ο C. Οι αλλαγές αυτές έγιναν για την εξασφάλιση της άψογης ποιότητας του πόσιμου νερού που παραμένει για αρκετό χρονικό διάστημα στις φιάλες ή τα δοχεία. Δηλαδή οι τιμές αυτές είναι αυστηρότερες από αυτές που αφορούν τα περισσότερα νερά τα προοριζόμενα για ανθρώπινη κατανάλωση.

4.3.2 Επίπεδα παρακολούθησης ποιότητας νερού

Καθορίζονται τρία επίπεδα παρακολούθησης:

1. Δοκιμαστική παρακολούθηση

Σκοπός της είναι να παρέχονται σε τακτική βάση, στοιχεία για την οργανοληπτική, μικροβιολογική και χημική ποιότητα του νερού που διατίθεται για ανθρώπινη κατανάλωση καθώς και πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας του νερού, εφόσον γίνεται, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο το νερό τηρεί τις σχετικές παραμετρικές τιμές της Οδηγίας με βάση μερικές απλές δοκιμασίες (πίνακας 13).

Cl. perfringens	Αγωγιμότητα
Ολικά κωλ/δή	Συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου
E. coli	Θολότητα
Ps. Aeruginosa	Νιτρώδη άλατα
Κοινοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί 37 °C και 22 °C	Αμμώνιο
Χρώμα	Σίδηρος
Οσμή	Αργίλιο
Γεύση	Υπολειμματικό χλώριο

Πίνακας 13: Παράμετροι δοκιμαστικής παρακολούθησης

2. Ελεγκτική παρακολούθηση (audit monitoring)

Σκοπός της είναι να παρέχονται τα απαραίτητα πληροφοριακά στοιχεία που απαιτούνται για να διαπιστωθεί εάν όλες οι παραμετρικές τιμές της Οδηγίας τηρούνται ορθά.

Σε ελεγκτική παρακολούθηση υπόκεινται όλες οι παράμετροι που έχουν άμεση σχέση για την προστασία της Δημόσιας Υγείας (Χημικές– Μικροβιολογικές– Ενδεικτικές).

Τόσο για την Δοκιμαστική, όσο και την Ελεγκτική παρακολούθηση η ελάχιστη συχνότητα δειγματοληψίας και αναλύσεων του νερού καθορίζεται ανάλογα με τον όγκο του διανεμομένου ή παραγομένου νερού ημερησίως.

3. Συμπληρωματική παρακολούθηση

Διενεργείται κατά περίπτωση για ουσίες και μικροοργανισμούς για τους οποίους δεν καθορίζεται παραμετρική τιμή, όταν υπάρχουν λόγοι να πιστευτεί ότι οι ουσίες αυτές ή οι μικροοργανισμοί αυτοί ενδέχεται να υπάρχουν αποτελώντας ενδεχόμενο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία (πίνακας 14). Η παραμετρική τιμή των παραμέτρων αυτών είναι μηδέν.

Σαλμονέλλες	Παράσιτα (Κρυπτοσπορίδιο, Giardia lamblia)
Σταφυλόκοκκοι παθογόνοι	Φύκη
Βακτηριοφάγοι	Μορφοποιημένα στοιχεία (ζώαρια)
	Έντεροϊοί
	E. coli O:157
	Καμπυλοβακτηρίδιο

Πίνακας 14 Παράμετροι συμπληρωματικής παρακολούθησης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πόσιμο νερό αποτελεί το υπ' αριθμόν ένα είδος διατροφής και είναι υψίστης σημασίας για την ικανοποίηση των κοινωνικών αναγκών του ανθρώπου. Το νερό το προοριζόμενο για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να είναι από κάθε άποψη αβλαβές για την υγεία του ανθρώπου, οργανοληπτικά άμεμπτο και απολύτως καθαρό, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς και οποιεσδήποτε ουσίες σε αριθμούς και συγκεντρώσεις που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία.

Η υδατογενής μετάδοση των ιών είναι ένας πολύ αποτελεσματικός τρόπος για την ευρεία και ταυτόχρονη εξάπλωση ασθενειών σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Από όλους τους ιούς ιδιαίτερη σημασία για τη δημόσια υγεία έχουν οι εντερικοί ιοί, οι οποίοι εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της στοματικής οδού, πολλαπλασιάζονται και τελικά αποβάλλονται στα ούρα και στα κόπρανα. Ένας μεγάλος αριθμός ιών που εγκλείονται στα κόπρανα μπορούν να ανιχνευτούν σε υδάτινες μάζες, τέτοιοι είναι οι νοροϊοί, οι ρεοϊοί, οι αδενοϊοί, οι ροταϊοί και οι εντεροϊοί. Τα επεξεργασμένα αστικά λύματα με την απόρριψη τους τόσο σε ποτάμια και λίμνες όσο και στη θάλασσα και η χρησιμοποίησή τους σε άρδευση και λίπανση, όταν δεν έχει γίνει σωστά η επεξεργασία τους, μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία με τη διασπορά τους στο περιβάλλον και την είσοδο τους στην τροφική αλυσίδα. Η πιο μελετημένη ομάδα εντερικών ιών είναι οι εντεροϊοί.

Το γένος των εντεροϊών είναι το πιο σημαντικό της οικογένειας Picornaviridae, ως προς την παθογένεια των μελών του στον άνθρωπο. Αποτελείται από τουλάχιστον 65 οροτύπους οι οποίοι ταξινομούνται σε πέντε υποομάδες. Οι εντεροϊοί βρίσκονται συνήθως στο νερό σε συγκεντρώσεις υπερβολικά χαμηλές με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει άμεση ανίχνευση τους και να απαιτούνται πολλοί μεγάλοι όγκοι νερού. Η ιολογική έρευνα σε δείγματα νερού είναι μία διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει τη συγκέντρωση των υπάρχοντων ιών και ακολουθεί μια κατάλληλη διαδικασία ανίχνευσης αυτών.

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν 26 δείγματα πόσιμου νερού, από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, προκειμένου να ανιχνευτούν εντεροϊοί. Ορισμένα προβλήματα που δυσκολεύουν την ανίχνευση των ιών στο νερό έπρεπε να ληφθούν υπόψη όπως :

- Το μικρό μέγεθος των εντεροϊών
- Η μικρή συγκέντρωση των ιών στο νερό

- Η γενετική αστάθεια των ιών σαν βιολογικές οντότητες.
- Οι διάφορες διαλυμένες ουσίες στο νερό που δρουν ως αναστολείς των τεχνικών ανίχνευσης των ιών.

Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα επιλέχθηκε να επεξεργαστούν μεγάλοι όγκοι νερού από κάθε δείγμα (4 λίτρα) με την μέθοδο «προσρόφησης - έκλουσης με ηλεκραρνητικά φίλτρα». Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι ο ιός συγκρατείται στο φίλτρο λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων και όχι λόγω μεγέθους.

Με αυτή τη μέθοδο καταλήξαμε να συγκεντρωθούν τα 4 L σε όγκο 2 ml.

Ακολούθησε η τεχνική της Αντίστροφης Μεταγραφής-Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (RT-PCR), η οποία παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την ανίχνευση γενετικού υλικού των εντεροϊών και η εφαρμογή semi- Nested PCR όπου ενισχύθηκε συγκεκριμένη περιοχή του γενώματος με την χρήση εκκινητικών μορίων που ανιχνεύουν όλους τους ορότυπους των εντεροϊών σε συντηρημένα τμήματα της 5' UTR περιοχής του γονιδιώματος.

Τα αποτελέσματα ήταν να μην ανιχνευτούν εντεροϊοί σε κανένα από τα δείγματα πόσιμου νερού που εξετάστηκαν με τις προαναφερόμενες μεθόδους και τεχνικές. Υπήρξαν όμως τρία δείγματα στα οποία φάνηκε αρχικά να ανιχνεύονται εντεροϊοί αλλά τελικώς διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για «ψευδώς θετικά» αποτελέσματα. Αυτό προέκυψε αφού έγιναν άλλες τρεις επαναλήψεις των ακολουθούμενων μεθοδολογιών για όλα τα δείγματα και σε καμία από αυτές δεν υπήρξε ξανά θετικό αποτέλεσμα. Τα τρία αρχικώς «ψευδώς θετικά» δείγματα αποδίδονται σε επιμολύνσεις κατά την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής της semi- Nested PCR.

Έγινε επίσης έλεγχος για την ύπαρξη αναστολέων της PCR στα δείγματα του νερού χρησιμοποιώντας εκκινητικά μόρια που στοχεύουν το 16sRNA της *Escherichia coli*. Το αποτέλεσμα ήταν ότι δεν υπήρξαν παράγοντες ή τοξικές ουσίες στα δείγματα που να αναστείλουν την PCR. Όλα τα δείγματα ήταν θετικά στην *Escherichia coli*. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι πρόκειται για πόσιμα νερά που προέρχονται από το δίκτυο ύδρευσης αλλά και εμφιαλωμένα που κυκλοφορούν στο εμπόριο, τα παραπάνω θετικά αποτελέσματα αποτελούν μια ένδειξη των ελλειπών μεθόδων εξυγίανσης του νερού προκειμένου να δοθούν στην κατανάλωση.

Η ισχύουσα Κοινοτική Οδηγία 98/83/EK καθορίζοντας τις βασικές ποιοτικές προδιαγραφές τις οποίες πρέπει να ικανοποιούν τα νερά που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση θεωρεί ότι η *E. coli* και οι Εντερόκοκκοι είναι οι μόνες μικροβιολογικές υποχρεωτικές παράμετροι οι οποίες πρέπει να εξετάζονται για το πόσιμο νερό. Σύμφωνα

με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι αυτές οι παράμετροι είναι επαρκείς αφού δεν ανιχνεύτηκαν εντεροϊοί σε κανένα από τα δείγματά μας.

Μελέτες έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει πάντα θετική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία κοπρανοδών βακτηρίων, και κυρίως του κολοβακτηρίου *E. coli*, και την παρουσία εντεροϊών (Gerba et al., 1979, Vaughn et al., 1979, Ellender et al., 1980, Jofre, 1992), ιών *Noro*, και του ιού της *Ηπατίτιδας Α* (Wanke and Guerrant, 1990; Desenclos et al., 1991).

Επίσης πολλές μελέτες, τόσο αναλυτικές (Berg and Metcalf, 1978; Gerba et al., 1979; Marzouk et al., 1980; Goyal et al., 1978; Vaughn et al., 1980; Schwartzbrod et al., 1985), όσο και επιδημιολογικές (Portnoy et al., 1975; Craun G.F., 1978), επιβεβαιώνουν ότι νερό κατάλληλο από βακτηριακής πλευράς, στην πραγματικότητα περιέχει ανθρώπινους εντερικούς ιούς.

Έτσι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, καθώς η παρουσία βακτηρίων και ιών στο νερό δεν παρουσιάζει πάντα θετική συσχέτιση, υπάρχει ανάγκη εύρεσης άλλων δεικτών της ιογενούς περιττωματικής μόλυνσης προκειμένου να βελτιωθεί ο μικροβιολογικός έλεγχος των νερών (Vaughn, J.M. and T.G.Metcalf., 1974; Gerba C.P., 1979).

Τρεις κατηγορίες βακτηριοφάγων, δηλαδή ιών που μολύνουν βακτήρια, έχουν προταθεί ως πιθανοί δείκτες των ιών κοπρανώδους προέλευσης που μολύνουν τον άνθρωπο: οι σωματικοί κολιφάγοι, οι F-specific RNA βακτηριοφάγοι και οι βακτηριοφάγοι που μολύνουν τα βακτήρια του γένους *B.fragilis*.

Η παρουσία των σωματικών κολιφάγων στο νερό συνήθως φανερώνει κοπρανώδη μόλυνση ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης. Εντούτοις, δεν θεωρούνται κατάλληλοι δείκτες τόσο γιατί δεν παρουσιάζουν συσχέτιση με την παρουσία εντεροϊών, όσο και γιατί μπορούν να πολλαπλασιαστούν και εκτός ανθρώπινου εντερικού σωλήνα (Jiang et al., 2001).

Οι F-RNA βακτηριοφάγοι είναι μια ομάδα εικοσαεδρικών βακτηριοφάγων, οι οποίοι παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με αρκετές ομάδες ανθρώπινων εντερικών ιών στη μορφολογία, το μέγεθος, τη δομή και τη σύσταση και συνεπώς έχουν προταθεί ως πρότυπα εντερικών ιών (IAWPRC, 1991). Το γονιδίωμα και οι φυσιολογικές ιδιότητες αυτών των φάγων είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά των ιών *Noro* (NLV) και του ιού της ηπατίτιδας Α (Figueroa et al., 1978). Αυτή τους η ομοιότητα, σε συνδυασμό με την παρουσία τους σε περιβαλλοντικά δείγματα και στο νερό και την ευκολία στην ανίχνευσή τους, τους καθιστά πολύ καλούς δείκτες της ιϊκής μόλυνσης και προτείνονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για εργαστηριακές έρευνες και μελέτες αλλά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες που θα διασαφηνίσουν στην πράξη την αποτελεσματικότητά τους ως δείκτες στο πόσιμο νερό.

Η ανίχνευση των ιών σε δείγματα νερού μπορεί να χρησιμεύσει ως εργαλείο για την αξιολόγηση των κινδύνων που συνδέονται με τις χρήσεις του νερού, την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας του και τους κινδύνους για τη δημόσια υγεία. Κατά τη διάρκεια των ερευνών που εστιάζουν στον έλεγχο του πόσιμου νερού για ιούς, μπορούν να παραχθούν ανεκτίμητα δεδομένα για τους ερευνητές και τις αρχές δημόσιας υγείας.

Ως εκ τούτου, εκτός από τους ειδικούς επιστημονικούς στόχους, η άμεση ανίχνευση των εντερικών ιών στο πόσιμο νερό πρέπει να περιορίζεται σε εκείνα τα περιστατικά όπου επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι το πόσιμο νερό θα μπορούσε να είναι η πηγή της μόλυνσης. Αυτό πρέπει να γίνει και με την προϋπόθεση ότι αρνητικά αποτελέσματα (δηλαδή η μη ανίχνευση ιών) δεν πρέπει απαραίτητα να σημαίνουν ότι οι ιοί ήταν απώντες κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας ή κατά τη στιγμή έκθεσης του πληθυσμού (Payment and Franco 1993; Gerba et al. 1996; Payment et al. 1997, 2001; Hurst et al. 2001; Payment and Hunter 2001). Άρα η ισχύουσα Κοινοτική Οδηγία, η οποία περιλαμβάνει τους εντεροϊούς μόνο στα πλαίσια της συμπληρωματικής παρακολούθησης της ποιότητας του πόσιμου νερού δηλαδή μόνο όταν υπάρχουν ενδείξεις και λόγοι να πιστεύεται ότι αυτοί αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, βρίσκεται στην σωστή κατεύθυνση σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Abbaszadegan M., Lechevallier M. and Gerba C. 2003.** Occurrence of viruses in US groundwaters. *J AWWA* 95, 107-120.
2. **Akin, E.W., F.W. Benton, and N.A. Clark. 1975.** Mortality of enteric viruses in marine and other waters in Discharge of sewage from long sea outfalls, Gameson A.L.H. (ed.), pp.202-235, Pergamon Press, London
3. **Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow. 1996.** Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* 46:1-68.
4. **Arens M. , 1999 .** Methods for subtyping and molecular comparison of human viral genomes. *Clin Microbiol Rev* 12, 612-626.
5. **Barton D.J., O' Donnell B.J., Flanagan J.B.(2001),** 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a *cis*-acting replication element required for negative-strand synthesis. *The EMBO J.*20(6):1439-1448.
6. **Basavappa R., R. Syed, O. Flore, J. P. Icenogle, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 1994.** Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly:structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 angstrom resolution. *Protein Sci.* 3:1651-1669
7. **Baxter J. Nicola, Andreas Roetzer, Hans-Dieter Liebig, Svetlana E. Sedenikova, Andrea M. Hounslow, Tim Skern, and Jonathan P. Waltho, 2006,** Structure and Dynamics of Coxsackie B4 2A Proteinase, an Enzyme Involved in the Etiology of Heart Disease, *J Virol*, Vol.80(3), p.1451-1462
8. **Berg, G. and C. Metcalf. 1978.** Indicators of viruses in waters. «In Indicators of viruses in water and food». Berg G. ed. Ann Arbor Sciences Publ
9. **Bitton G. 1980.** Adsorption of viruses to surfaces: technological and ecological implications. In: Bitton G. & Marshall K.C. eds. Adsorption of Microorganisms to surfaces. New York, NY, John Wiley & Sons, Inc., pp.332.
10. **Block JC, Schwartzbrod L.1989** Viruses in Water Systems. Detection and Identification. New York: VCH Publishers, Inc.
11. **Bosch A. 1998.** Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Internatl Microbiol* 1, 191-196.
12. **Brown B, Oberste, M. S, Maher, Maher Kaija, 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, *J. Virol.* 77(16) p. 8973–8984
13. **Cabelli V.J. 1989.** Swimming associated illness and recreational water quality. *Water Science and Technology* 21, 13-21.
 14. **Casas I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 1995.** New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* 53:25-36.
 15. **CDC: Center of Disease Control and Prevention: Respiratory and Enteric Viruses Branch,** http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/enterovirus/non-polio_entero.htm
 16. **Chow M., Newman J.F., Filman D., Hogle J.M., Rowlands D.J., and Brown F. 1987** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 327:482-486.
 17. **Chung H. & Sobsey M.D. 1993.** Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Water Sci. Technol.* 2:425-428.
 18. **Clarke N.A. 1961.** Removal of enteric viruses from sewage by activated sludge treatment. *Amer. J. Public Health.* 51:1118-1129.
 19. **Craun G.F. & Calderon R. 1996.** Microbial Risks in Groundwater Systems: Epidemiology of Waterborne Outbreaks. Under the Microscope, Examining Microbes in Groundwater. AWWA Res.Fdn.,Denver
 20. **Craun, G.F. 1978.** Impact of the coliforms standard on the transmission of disease, in Evaluation of the microbiology standards for drinking water, Hendricks C.W. (ed), USEPA-57019-78-OOC. Washington D.C.
 21. **De Leon R. and Jankus LA. 1997.** Detection of the presence of bacteria and viruses in shellfish. In: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter WV, editors. *Manual of Environmental Microbiology.* Washington DC:ASM Pres P. 203-212.
 22. **Deng M.Y. & Cliver D.O. 1995.** Persistence of inoculated hepatitis A virus in mixed human and animal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(1):87-91.
 23. **Desenclos, J.-C.A., K.C. Klontz, M.H. Wilder, O.V. Nainan, H.S. Margolis, and R.A. Gunn. 1991.** A multistate outbreak of hepatitis A caused by the consumption of raw oysters. *Am. J. Public Health*, 81:1268-1272.
 24. **Divizia M., Palombe L., Buonomo E., Donia D., Ruscio V., Equestre M., Leno L., Pana A. and Degener A.M. 1999.** Genomic characterization of human and environmental polioviruses isolated in Albania. *Appl Environ Microbiol* 65, 3534-3539.

25. **Domingo E. and J. J. Holland. 1997.** RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178
26. **Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J.C., Portela A., Ortin J., Lopez-Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R., et al. (1985).** The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene.* 40(1): 1-8. Review
27. **Draft OSRAS Rev A. April 2001.** Additional information on pathogen transport and survival.
28. **Ehlers M.M., Grabow W.O.K. and Pavlov D.N. 2005.** Detection of enteroviruses in untreated and treated drinking water supplies in South Africa. *Water Res* 39, 2253--2258.
29. **Ellender, R.D., J.B. Mapp, B.L. Middlebrooks, D.W. Cook and E.W. Cake. 1980.** Natural enterovirus and fecal coliform contamination of Gulf-Cost oysters. *J. Food Prot.*, 43:105-110.
30. **Evans D.J. and J.W. Almond , 1998.** Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell tropism and pathogenesis. *Trends Microbiol.* 6, pp. 198–202
31. **Federal –Provincial- Territorial Committee, 2002.** Summary of guidelines for Canadian Drinking water quality. Prepared by the Federal –Provincial- Territorial Committee on Environmental and Occupation Health, April 2002.
32. **Federal –Provincial- Territorial Committee, 2002.** Summary of guidelines for Canadian drinking water quality. Prepared by the Federal –Provincial- Territorial Committee on drinking water of the Federal –Provincial- Territorial Committee on Environmental and Occupational Health, April 2002.
33. **Figuroa, R., A. Sopulveda, M.A. Soto, and J. Teha. 1978.** Information analysis of MS2 and ϕ X-174 virus genomes. *J. Theor. Biol.*, 74:203-207.
34. **Friedrich F. 2000.** Genomic modifications in oral poliovirus vaccine strains after multiplication in humans and implications for the eradication of poliovirus. *Acta Virol.* 44, 109-117
35. **Fujioka R.S. & Ackermann W.W. 1975.** The inhibitory effects of MgCl₂ on the inactivation kinetics of poliovirus by urea. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148:1063.
36. **Fukada T. 1968.** Photodynamic antiviral substance extracted from *Chorella* cells. *Appl. Microbiol.* 16:1809.
37. **Gavrillin G.V., Cherkasova E.A., Lipskaya G.Y. , Kew O.M., Agol V.I., 2000.** Evolution of Circulating Wild Poliovirus and of Vaccine Derived Poliovirus in an Immunodeficient Patient : A Unifying Model. *J.Virol.*7(16):7381-7390.

38. **Georgescu M., Balanant J., Ozden S., Crainic R. 1997** .Random selection a model for poliovirus infection of the central nervous system.*J.Gen.Virol.*78:1819-1828.
39. **Georgopoulou A, Markoulatos P. 2001.** Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(11): 792-799
40. **Gerba C.P 1975.** Fate of wastewater bacteria and viruses in soil. *Journal of the Irrigation and Drainage Division. Proceedings of the American Society of Civil Engineers.* 101(IR3):157-174.
41. **Gerba P. Charles ,2007.** Virus Occurrence and Survival in the Environmental Waters . *Human Viruses in Water ,Chapter 5 : 91-108*
42. **Gerba, C.P., Rose, J.B., Hass, C.N. and Crabtree, K.D. 1996.** Waterborne rotavirus: a risk assessment. *Water Res.,* 30: 2929-2940
43. **Gerba, C.P., S.M. Goyal, R.L. Labelle, I. Cech, and G.F. Bodgan. 1979.** Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Am. J. Public Health,*69(11):1116-1119
44. **Giachetti C., and Semler B.L. 1991** Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *J. Virol.,* 65:2647–2654
45. **Girones R. 1989.** Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Can J Microbiol.* 35:1015-1021.
46. **Goyal, S.M., C.P. Gerba, R.L. La Belle, I. Cech, and G.F. Bodgan. 1979.** Prevalence of human enteric viruses in coastal canal communities. *J. Wat. Poll. Control. Fed.,* 50:2247-2256
47. **Grabow W.O.K., Taylor M.B. and DeVillers J.C. 2001.** New methods for the detection of viruses call for review of drinking water quality guidelines. *Water Sci Technol* 43, 18.
48. **Guardabassi L., Dalsgaard A. and Sobsey M. 2003.** Occurrence and survival of viruses in composted human faeces. *Sustainable urban renewal and wastewater treatment No. 32* 2003.
49. **Haafliker D., Hubner P. and Luthy J. 2000.** Outbreak of viral gastroenteritis due to sewagecontaminated drinking water. *Int J Food Microbiol* 54, 123-126.
50. **Harley D., Harrower B., Lyon M. and Dick A. 2001.** (<http://www.health.gov.au/puhlth/cdi/cdi2501/cdi2501c.htm>).
51. **Hejkal T.W., Wellings F., Lewis A.L. and Larock P.A. 1981.** Distribution of viruses associated with particles in wastewater. *Appl Environ Microbiol* 41, 628-634.

52. **Hellen CU, Fäcke M, Kräusslich HG, Lee CK, Wimmer E, 1991.** Characterisation of poliovirus 2A proteinase by mutational analysis: residues required for autocatalytic activity are essential for induction of cleavage of eukaryotic initiation factor 4F polypeptide p220, *J. Virol.*, 65:4226-4231.
53. **Holmes P.R. 1989.** Research into health risks at bathing beaches in Hong Kong. *Journal of the Institution of Water and Environmental Management* 3, 488-495.
54. **Hot D., Legeay O., Jacques J., Gantzer C., Caudrelier Y., Guyard K., Lange M. and Andreoletti L. 2003.** Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res* 37, 4703-4710.
55. **Huang Yan, James M. Hogle, and Marie Chow, 2000 September.** Is the 135S Poliovirus Particle an Intermediate during Cell Entry?, *J Virol.*; 74(18): 8757–8761.
56. **Hurst C.J. 1988.** Influence of aerobic microorganisms upon virus survival in soil. *Can. J. Microbiol.* 34: 696-699
57. **Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. and Walter, M.V. 2001.** Manual of environmental microbiology. American Society for Microbiology Press, Washington, DC
58. **IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology. 1991.** Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.*, 25:529-545.
59. **IAWPRC Study group on Health Related Water Virology. 1983.** The health significance of viruses in water. *Water Res.*, 17:121-132
60. **Jiang, S., R. Noble, and W. Chui. 2001.** Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:179–184
61. **Jockusch S. 1996.** Photoinduced inactivation of viruses: Adsorption of methylene blue, thionine and thiopyronine on QB bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7446-7451.
62. **Jofre, J. 1992.** Bivalve molluscs as vectors of human enteric viruses. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 10:223-228
63. **Katayoshi M. 1983.** Antiviral substances from photrophic bacteria. *Micro Res.* 4:4-12.
64. **King A.M.Q., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypia T., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Palmenberg A.C., Skern T. and Stanway G. 2000.** Picornaviridae. In “ Virus Taxonomy, Seventh Report of International Committee for the Taxonomy of Viruses” (M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L.

- Bishop, C.H. Calisher, E.B. Carsten, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Malinoff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and P.B. Wickner, Eds), pp 657-673 Academic Press, New York, San Diego
65. **Kirkegaard K., and Baltimore D. 1986** The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*, 47:433–443.
 66. **Kitamura N., Semler B.L., Rothberg P.G., Larsen G.R., Adler C.J., Dorner A.J., Emini E.A., Hanecak R., Lee J.J., van der Werf S., Anderson C.W., and Wimmer E. (1981)** Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291:547-553.
 67. **Koopmans J.S., Eckert E.A., Greenberg H.B., Strohm B.C., Isaccson R.E. & Monto A.S. 1982.** Norwalk virus enteric illness acquired by swimming exposure. *American Journal of Epidemiology* . 155. 173-177.
 68. **Kukkula M., Arstila P., Klossner M.L., Maunula L., Bonsdorff C.H. and Jaatinen P. 1997.** Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand. J. Infect. Dis.* 29, 415-418.
 69. **La Belle R.L & Gerba C.P. 1980.** Influence of estuarine sediment on virus survival under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980. 39:749-755.
 70. **Lee S.H. and Kim S.J. 2002.** Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res* 36,248-256.
 71. **Lees D. 2000.** Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol* 59, 1189
 72. **Liew P.F & Gerba C.P. 1980.** Thermostabilization of enteroviruses by estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:305.
 73. **Lloyd, R. E., M. J. Grubman, and E. Ehrenfeld. 1988.** Relationship of p220 cleavage during picornavirus infection to 2A proteinase sequencing. . *Viol.* 62:4216–4223.
 74. **Lukashev A.N. 2005a** Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev. Med. Virol.*, 15:157-167
 75. **Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., and Ilonen J. 2003a** Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.*, 77:10423–10431.
 76. **Mandel, B. 1971.** Characterization of type 1 poliovirus by electrophoretic analysis. *Virology* 44, 554-568.
 77. **Martin J., E. Samoilovich, G. Dunn, A. Lackenby, E. Feldman, A. Heath, E. Svirchevskaya, G. Cooper, M. Yermalovich, and P. D. Minor. 2002.** Isolation of

- an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* 76(21):1092-10928
78. **Marzouk, Y., S.M. Goyal, and C.P. Gerba. 1980.** Relationship of viruses and indicator bacteria in water and wastewater of Israel. *Wat. Res.*, 14:1585-1590.
 79. **Melnick J.L. 1996.** Current status of poliovirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 293-300. Review
 80. **Moe K. & Shirley J.A. 1982.** The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. *Arch. Virol.* 72(3):179-186.
 81. **Muir P., U. Kammerer, K. Korn, M. N. Mulders, T. Poyry, B. Weissbrich, R. Kandolf, G. M. Cleator, and A. M. Van Loon. 1998.** Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. *Clin. Microbiol. Reviews* 11(1):202-227.
 82. **Nakajima M. 2003.** Adhesion and releasing of Poliovirus to activated sludge of wastewater purifying plants. *Water Sci. Technol.* 47(9):117-121.
 83. **Norder H., Bjerregaard L., and Magnius L.O. 2002** Open reading frame sequence of an Asian enterovirus 73 strain reveals that the prototype from California is recombinant. *J. Gen. Virol.*, 83:1721–1728.
 84. **Novak, J.E., and K. Kinkegaard 1991.** Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J. Virol.* 65:3384-3387.
 85. **O' Brien R.T & Newman J.S. 1977.** Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:334.
 86. **Oberste M. Steven, Kaija Maher, Alford J. Williams, Naomi Dybdahl-Sissoko, Betty A. Brown, Michelle S. Gookin, Silvia Panaranda, Nada Mishrik, Moyez Uddin and Mark A. Pallansch, 2006,** Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses, *Journal of General Virology*, Vol.87, p.119-128
 87. **Oberste M. Steven, Kaija Maher, William A. Nix, Suzanne M. Michele, Moyez Uddin, Dabid Schnurr, Suleiman al-Busaidy, Chantal Akoua-Koffi, Mark A. Pallansch, 2007,** Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species *Human Enterovirus B*, *Virus Research*, Vol.128, p.34-42
 88. **Oberste M.S., Maher K., and Pallansch M.A. 2004c** Evidence for frequent recombination within species Human Enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J. Virol.*, 78:855–867

89. **Oberste M.S., Michele S.M., Maher K., Schnurr D., Cisterna D., Uddin M., Norder H., Lau C.S., Chomel J.J., Magnius L., and Pallansch M.A. 2004a**. Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV 75.. *J. Gen Virol.*, 85:3205-3212
90. **Oberste M.S., Schnurr D., Maher K., Al-Busaidy S., and Pallansch M.A. 2001**. Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J. Gen. Virol.*, 82:409–416.
91. **Pancordo O.C. 1987**. Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain WA in fresh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(8):1803-1811.
92. **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):167-71
93. **Pavlov D.N., van Zyl W.B., van Heerden J., Grabow W.O.K. and Ehlers M.M. 2005**. Prevalence of vaccinederived polioviruses in sewage and river water in South Africa. *Water Res* (in press)
94. **Payment, P. and Franco, E. 1993**. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 59(8): 2418-2424
95. **Payment, P. and Hunter, P. 2001**. Endemic and epidemic infectious intestinal disease and its relation to drinking water. In: *Water quality: Guidelines, standards for health; assessment of risk and risk management for water-related infectious disease*. L. Fewtrell and J. Bartram (eds.). IWA Publishing, London, UK, on behalf of the World Health Organization, Geneva
96. **Payment, P., Plante, R. and Cejka, P. 2001**. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. *Can. J. Microbiol.*, 47(3): 188-193
97. **Payment, P., Siemiatycki, J., Richardson, L., Renaud, G., Franco, E. and Prévost, M. 1997**. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *Int. J. Environ. Health Res.*, 7: 5-31
98. **Pfister T., and Wimmer E., 1999**. Characterization of nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* 274: 6992-7001

99. **Pina, S., M. Puig, F. Lucena, J. Jofre, and R.Girones. 1998.** Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3376-3382.
100. **Portnoy, B.L., P.A. Mackowiak, C.T. Caraway, J.A. Walker, T.W. Mc Kinley, and C.A.Klein. 1975.** Oyster-associated hepatitis. Failure of shellfish certification programs to prevent outbreaks. *J. Am. Med. Ass.*, 233:1065-1068.
101. **Rao V.C, T.G. Metcalf and J.L. Melnick. 1986.** Removal of pathogens during wastewater treatment, pp. 531-554, in: *Biotechnology*, vol. 8, H.J. Rehm and G.Reed, Eds. VCH, Germany
102. **Ratka M., Lackmann M., Ueckermann C., Karlins U., and Koch G. 1989** Poliovirus-associated protein kinase:destabilization of the virus capsid and stimulation of the phosphorylation reaction by Zn^{2+} . *J. Virol.*, 63:3954-3960.
103. **Rossmann M.G., Arnold E., Erickson J.W., Frankenberger E.A., Griffith J.P., Hecht H.J., Johnson J.E., Kamer G., Luo M., and Mosser A.G. 1985** Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, 317:145-153
104. **Rueckert R.R. 1985** Picornaviruses and their replication. In *Virology*, New York, Raven Press (ed. B.N. Fields) 1985:705-738
105. **Sair A.I., D'Souza D.H. and Jaykus L.A. 2002.** Human enteric viruses as causes of foodborne disease. *Compr Rev Food Sci Food Safety* 1, 73-89.
106. **Sanchez G., Pinto R.M., Vanaclocha H., Bosch A. 2002.** Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfishborne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4148-4155.
107. **Santti J., Hyypia T., Kinnunen L., and Salminen M. (1999)** Evidence of recombination among enteroviruses. *J. Virol.*, 73:8741-8749.
108. **Schwartzbrod L., C. Finance, M. Aymard, M. Brigaud, and F. Lucena. 1985.** Recovery of reovirus from tapwater. *Zbl. Bakt. Hyg. I. abt. Orig, B.*, 181:383-389.
109. **Shuval H.I. 1986.** *Thallassogenic Diseases UNEP Regional Seas Reports and Studies No 79*, Nairobi: United Nations Environment Programme.
110. **Siafakas N., A. Gergopoulou, P. Markoulatos, N. Spyrou, and G. Stanway. 2001.** Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J. Clin. Laboratory Analysis* 15:87-95
111. **Sinton, L.W., R.K. Finlay, and P.A. Lynch. 1999.** Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Appl. Environ, Microbiol.*, 65:3605-3613.

112. **Sobsey M.D. and Meschke J.S. 2003.** Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of faecal or respiratory origin. Draft – August 21, 2003.
113. **Stanway G. 1990** Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.*, 71:2483-2501.
114. **U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency). 2003b.** National Primary Drinking Water Regulations: Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule - Toolbox guidance manual. June 2003. pp. 1-8.
115. **Vaughn, J.M. and T.G. Metcalf. 1974.** Coliphages as indicators of enteric viruses in shellfish and shellfish raising estuarine waters. *Water Res.*, 8:613-616.
116. **Vaughn, J.M., E.F. Landry, M.Z. Thomas, T.J. Vicale, and W.F Penello. 1979.** Survey of human enterovirus occurrence in fresh and marine surface waters on Long Island. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38:290-296.
117. **Vaughn, J.M., E.F. Landry, M.Z. Thomas, T.J. Vicale, and W.F. Panello. 1980.** Isolation of naturally occurring enteroviruses from a variety of shellfish species residing in Long Island and New Jersey marine embayments. *J. Food. Prot.*, 43:95-98.
118. **Wallis C, Melnick JL. 1967a** Concentration of viruses from sewage by adsorption on to Millipore membranes. *Bull World Health Organ* 36: 219–225
119. **Wallis C, Melnick JL. 1967b** Concentration of viruses on aluminium and calcium salts. *AmJ Epidemiol* 85: 459–468
120. **Wallis C, Melnick JL. 1967c** Concentration of viruses on membrane filters. *J Virol* 1:472–477
121. **Wanke, C.A., and R.L. Guerrant. 1990.** Viral hepatitis and gastroenteritis transmitted by shellfish and water. *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, 19:435-438
122. **Ward C.D., Flanagan J.B. (1992).** Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J. Virol.* 66(6): 3784-93
123. **Ward R.L. & Ashley C.S. 1979.** Identification of the virucidal agent in wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:3143-22
124. **Wellings F.M. 1976.** Demonstration of solid-associated virus in wastewater and sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(3):354-358.
125. **WHO, 1996.** Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd ed, volume 2: Health Criteria and Other Supporting Information. World Health Organization, Geneva.

126. **WHO, 1998.** Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd ed, Addendum to Volume 1, Surveillance and Control of Community Supplies, 2 ed. World Health Organization, Geneva.
127. **WHO, 2001.** Water Quality: Guidelines, Standards and health. Assessment of Risk and Risk Management for Water-Related Infectious Disease. 1st ed. World Health Organization, Geneva.
128. **WHO, 2003.** Guidelines for Drinking Water Quality, 3rd edition, draft. World Health Organization, Geneva.
129. **Widjoatmodjo, Myra N.; Fluit, Ad C; Verhoef, Jan (1995).** Molecular identification of bacteria by fluorescence- based PCR- single- strain conformation polymorphism analysis of 16S r RNA gene. Journal of Clinical Microbiology 33 (10) : 2601-2606.
130. **Wilhem SW, Jeffrey WH, Suttle CA, and Mitchell DL. 2002.** Estimation of biologically *damaging* UV levels in marine surface waters with DNA and viral dosimeters. Photochem Photobiol. 76(3):268-273.
131. **Wimmer, E., C. U. T. Hellen, and X. M. Cao. 1993.** Genetics of poliovirus. Annu. Rev. Genet. 27:353-436
132. **Ypma-Wong M.F., Dewalt P.G., Johnson V.H., Lamb J.G., and Semler B.L. 1988a** Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. Virology, 166:265-270.



1999. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 24(1), 1-15.

2000. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 25(1), 1-15.

2001. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 26(1), 1-15.

2002. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 27(1), 1-15.

2003. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 28(1), 1-15.

2004. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 29(1), 1-15.

2005. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 30(1), 1-15.

2006. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 31(1), 1-15.

2007. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 32(1), 1-15.

2008. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 33(1), 1-15.

2009. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 34(1), 1-15.

2010. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 35(1), 1-15.

2011. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 36(1), 1-15.

2012. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 37(1), 1-15.

2013. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 38(1), 1-15.

2014. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 39(1), 1-15.

2015. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 40(1), 1-15.

2016. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 41(1), 1-15.

2017. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 42(1), 1-15.

2018. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 43(1), 1-15.

2019. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 44(1), 1-15.

2020. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 45(1), 1-15.

2021. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 46(1), 1-15.

2022. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 47(1), 1-15.

2023. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 48(1), 1-15.

2024. *Journal of Health Politics, Policy and Law*, 49(1), 1-15.