



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Ιατρικής

**ΜΠΣ Εφαρμοσμένη Δημόσια
Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή**

Διπλωματική Εργασία

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ ΣΤΑ ΑΣΤΙΚΑ
ΛΥΜΑΤΑ»**

«Ντότσικα Ευρυδίκη»

Επιβλέπων Καθηγητής: Χρήστος Χατζηχριστοδούλου

Λάρισα, 2023



«Ευχαριστίες ή Αφιέρωση»

Ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου και τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής Καθηγητές Μουχτούρη Βαρβάρα και Ραχιώτη Γεώργιο για τη βοήθεια τους στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τους φίλους και συναδέλφους μου στο εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας και ιδιαίτερα τον κ. Βόντα Αλέξανδρο που με την στήριξη του απέκτησα πολύτιμες γνώσεις και εμπειρία.



*«Ντότσικα Ευρυδίκη», «Ανίχνευση του ιού της γρίπης
στα αστικά λύματα»*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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



Περίληψη

Ο ιός της γρίπης ανήκει στην οικογένεια Orthomyxoviridae, χωρίζεται στους τύπου Α,Β, C,D και προκαλεί ετήσιες επιδημίες και πανδημίες ανά 10-30 χρόνια,. Στον τύπο Α οι υπότυποι που επικρατούν τα τελευταία χρόνια είναι Α/Η3Ν2, Α/Η1Ν1 pdm09.

Η επιδημιολογική επιτήρηση είναι χρήσιμο εργαλείο για την διαπίστωση των στελεχών που κυκλοφορούν στην κοινότητα και πραγματοποιείται μέσω εξέτασης κλινικών ή περιβαλλοντικών δειγμάτων. Κατά την περίοδο 2022-2023 σημειώθηκε αύξηση των κρουσμάτων γρίπης, σε σύγκριση με τα προηγούμενα έτη, όπου τα ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας μειώθηκαν σημαντικά λόγω της πανδημίας COVID-19.

Η επιτήρηση μέσω ανάλυσης περιβαλλοντικών δειγμάτων είναι μια γρήγορη και οικονομική μέθοδος παρακολούθησης του ιού, η οποία ελέγχει μια ευρύτερη γεωγραφική περιοχή με σκοπό την διεξαγωγή αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση των ιών της γρίπης μέσω ανάλυσης 225 δειγμάτων από αστικά λύματα στις πύλες εισόδου των βιολογικών καθαρισμών Λάρισας, Βόλου, Ξάνθης και Αλεξανδρούπολης. Τα δείγματα συμπυκνώθηκαν με την βοήθεια στηλών κατακράτησης και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων για μοριακή ανάλυση. Στο σύνολο των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε διαλογή των θετικών σε γρίπη με real time PCR. Στη συνέχεια, ακολούθησε η τυποποίηση και υποτυποποίηση των θετικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας εκκινητές προτεινόμενους από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του μοριακού ελέγχου, διαπιστώθηκε η επικράτηση του υπότυπου Α/Η3Ν2. Ο υπότυπος Α/Η1Ν1 δεν ανιχνεύθηκε ενώ ο τύπος Β παρέμεινε σε χαμηλά ποσοστά.

Τα αποτελέσματα της εργασίας συμβαδίζουν με τις εκθέσεις του ΕΟΔΥ και WHO και επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε.

Λέξεις κλειδιά

Ιός της γρίπης Α,Β, C και D, γριπώδης συνδρομή, μοριακή επιδημιολογία του ιού της γρίπης



“DETECTION OF THE INFLUENZA VIRUS IN URBAN WASTE WATER”

“Ntotsika Evridiki”

Abstract

Influenza virus belongs to the family Orthomyxoviridae, is divided into types A, B, C, D and causes annual epidemics and pandemics every 10-30 years. In type A, the subtypes that have been predominant in recent years are A/H3N2, A/H1N1 pdm09.

Epidemiological surveillance is a useful tool for detecting strains circulating in the community and is carried out by examination of clinical or environmental samples. During the period 2022-2023 there was an increase in influenza cases, compared to previous years, where morbidity and mortality rates decreased significantly due to the COVID-19 pandemic.

Surveillance through analysis of environmental samples is a rapid and cost-effective method of monitoring the virus and tests a wider geographical area to obtain representative results.

In the present study, influenza virus monitoring was carried out through the analysis of 225 samples of urban wastewater at the inlet gates of the biological treatment plants of Larissa, Volos, Xanthi and Alexandroupolis. The samples were concentrated using retention columns and then nucleic acid isolation for molecular analysis was performed. In all samples, screening of influenza positive samples was performed by real time PCR. This was followed by typing and subtyping of positive samples using primers recommended by the World Health Organization. After evaluation of the molecular testing results, the predominance of the A/H3N2 subtype was established. Subtype A/H1N1 was not detected while type B remained at low levels.

The results of the work are in line with the EODY and WHO reports and confirmed the effectiveness of the methodology used.

Key words

Influenza virus A, B, C and D, influenza like illness, molecular epidemiology of influenza virus



Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	iv
Abstract.....	v
Κατάλογος Πινάκων.....	viii
Κατάλογος εικόνων	ix
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	x
1. Ταξινόμηση.....	1
2. Ιός της γρίπης.....	3
3. Πανδημίες του 20ου και του 21ου αιώνα.....	4
3.1. Ισπανική γρίπη (H1N1)-1918	4
3.2. Ασιατική γρίπη A/H2N2-1957	6
3.3. Γρίπη του Hong Kong A/H3N2-1968	6
3.4. A/H1N1pdm09 Μεξικό-2009.....	7
4. Δομή του ιού της γρίπης.....	8
4.1. Γρίπη τύπου A.....	15
4.2. Γρίπη τύπου B.....	15
4.3. Γρίπη τύπου C και D	15
5. Κατηγορίες γρίπης	17
5.1. Εποχική γρίπη	17
5.2. Πανδημία	17
5.3. Γρίπη των χοίρων.....	17
5.4. Γρίπη των πτηνών A/H5N1	18
5.5. Γρίπη των πτηνών A/H7N9	18
6. Μετάδοση	19
7. Αναπαραγωγή του ιού και παθογένεια.....	21
8. Συμπτώματα.....	26
8.1. Πρωτοπαθής και δευτεροπαθής πνευμονία	26
9. Αντιγονική μετατροπή και αντιγονική παρέκκλιση.....	28
10. Εργαστηριακή διάγνωση.....	29
10.1. Καλλιέργεια του ιού	29
10.2. Ταχεία ανίχνευση ιικού αντιγόνου	29
10.3. Δοκιμασία ανοσοφθορισμού	31
10.4. Ορολογική ανίχνευση	31
10.5. Μοριακή ανίχνευση.....	31
11. Επιδημιολογία	34



12.	Επιδημιολογική Παρακολούθηση	42
12.1.	Επιδημιολογία του ιού βάσει μοριακού ελέγχου λυμάτων	44
13.	Τρόποι Αντιμετώπισης.....	49
13.1.	Εμβόλια.....	49
13.1.1.	Εμβόλιο με αδρανοποιημένο ιό	50
13.1.2.	Εμβόλια με ζωντανό εξασθενημένο ιό	51
13.2.	Άλλα είδη εμβολίων.....	52
13.3.	Αντιικά φάρμακα.....	54
13.3.1.	Αδαμαντάνες.....	54
13.3.2.	Αναστολείς Νευραμινιδάσης.....	55
13.3.4.	Αναστολείς ενδονουκλεάσης.....	56
14.	Ανθεκτικότητα στα αντιικά φάρμακα	57
15.	Άλλα μέτρα πρόληψης και θεραπείας.....	57
1.	Σκοπός και στόχοι.....	59
2.	Υλικά και μέθοδοι.....	59
2.1.	Μέθοδος κατακρήμνισης με PEG/NaCl.....	61
2.2.	Εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος.....	61
2.3.	Μέθοδος συμπύκνωσης PROMEGA.....	62
2.4.	Ενίσχυση γενετικού υλικού.....	62
3.	Αποτελέσματα.....	65
4.	Συζήτηση	68
	Βιβλιογραφία	70
	Παράρτημα Α: Μέθοδος κατακρήμνισης με την χρήση PEG/NaCl.....	87
	Παράρτημα Β: Απομόνωση γενετικού υλικού	88
	Παράρτημα Γ: Μέθοδος PROMEGA	89
	Παράρτημα Δ: Μέθοδος realtime RT-PCR.....	91



Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Βασικές πρωτεΐνες του ιού τύπου Α και οι λειτουργίες τους	14
Πίνακας 2 Νοσηρότητα του ιού σε παγκόσμιο επίπεδο κατά τη διάρκεια της πανδημίας του 2009.....	36
Πίνακας 3 Νοσηρότητα του ιού για την περίοδο 2018-2019 στην Ευρώπη	37
Πίνακας 4 Νοσηρότητα του ιού για την περίοδο 2020-2021	37
Πίνακας 5 Πορεία του ιού της γρίπης σε παγκόσμια κλίμακα για τη χρονική περίοδο 2019-2023.....	38
Πίνακας 6 Η πορεία του ιού στην Ευρώπη για την περίοδο 2022-2023.....	39
Πίνακας 7 Πορεία του ιού για την περίοδο 2019-2020 στην Ελλάδα	39
Πίνακας 8 Κρούσματα γριπώδους συνδρομής ανά 1000 επισκέψεις ανά εβδομάδα	40
Πίνακας 10 Εμβόλια, ηλικίες και ιοί από τους οποίους προστατεύουν	54
Πίνακας 11 Πόλεις, εβδομάδες και αριθμός δειγμάτων.....	61
Πίνακας 12 Εκκινητές και ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν	63
Πίνακας 13 Ποσότητες αντιδραστηρίων MasterMix ανά δείγμα	63
Πίνακας 14 Συνθήκες θερμοκρασιών και χρόνων PCR.....	64
Πίνακας 15 Ανίχνευση του ιού στα λύματα	65
Πίνακας 16 Ανίχνευση του ιού στα κλινικά δείγματα	66
Πίνακας 17 Θετικά στον ιό λύματα ανά εβδομάδα.....	66
Πίνακας 18 Ποσοστό θετικότητας ρινοφαρυγγικών δειγμάτων για SARS-CoV-2, ιούς γρίπης και αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), από ασθενείς με γριπώδη συνδρομή σε δομές ΠΦΥ (Δίκτυο Sentinel ΠΦΥ), σύνολο χώρας, εβδομάδα 40/2022 – εβδομάδα 20/2023	67
Πίνακας 19 Ποσότητες αντιδραστηρίων MasterMix ανά δείγμα	91
Πίνακας 20 Συνθήκες θερμοκρασίας-χρόνου PCR.....	91



Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1 Σύστημα Baltimore.....	2
Εικόνα 2 Επείγοντα περιστατικά σε νοσοκομείου του Kansas κατά τη διάρκεια της ισπανικής γρίπης	5
Εικόνα 3 Δομή του ιού της γρίπης.....	8
Εικόνα 4 Δομή αιμοσυγκολλητίνης	10
Εικόνα 5 Δομή νευραμινιδάσης.....	10
Εικόνα 6 Δομή του συμπλόκου RNA πολυμεράση	22
Εικόνα 7 Στάδια αναπαραγωγής του ιού	23
Εικόνα 8 Μέθοδος ταχείας ανίχνευσης ιικού αντιγόνου.....	30
Εικόνα 9 Θνητότητα ανά 100.000 άτομα στην ηλικιακή ομάδα >65 ετών.....	35
Εικόνα 10 Διαδικασία προετοιμασίας λυμάτων	48



Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
WHO	World Health Organization
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
mRNA	Messenger RNA
RSV	Respiratory Syncytial Virus
A/H1N1pdm09	A/H1N1 πανδημικό στέλεχος
PB1,PB2	Polymerase basic 1, Polymerase basic 2
HA	Αιμοσυγκολλητίνη
NA	Νευραμινιδάση
NAI	Αναστολέας νευραμινιδάσης
NP	Nucleoprotein
NEP	Nuclear export protein
RNP	Ribonucleoprotein
PA	Polymerase acid
P3	Polymerase 3
UTR	Untranslated regions
ORF	Open reading frames
cRNA	Complementary RNA
vRNA	Viral RNA
IAV, IBV, ICV, IDV	Influenza A Virus, Influenza B Virus, Influenza C Virus, Influenza D Virus
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ΜΕΘ	Μονάδες Εντατικής Θεραπείας
RIDTs	Rapid influenza diagnostic tests
DFA	Direct fluorescent antibody test
IFA	Indirect fluorescent antibody test
GISRS	Global Influenza Surveillance and Response System
GIHSN	Global Influenza Hospital Surveillance
EISN	European Influenza Surveillance Network
TESSy	The European Surveillance System
ILI	Influenza-like illness
SARI	Severe Acute Respiratory Infections
EISS	European Influenza Surveillance Scheme
ERLI-NET	European Reference Laboratory Influenza Network for Human
EQA	External quality assessments
NIC	National Influenza Center
WBE	Wastewater-Based Epidemiology
PRC	Polymerase chain reaction
SA	Sialic Acid
WGS	Whole Genome Sequencing

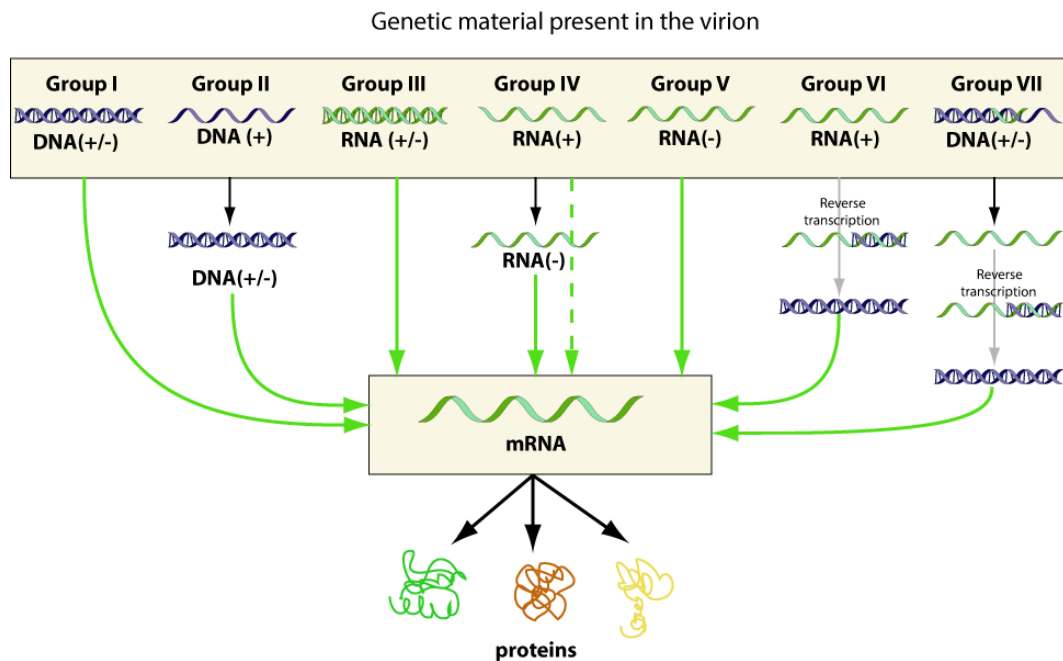


1. Ταξινόμηση

Οι ιοί είναι παθογόνοι παράγοντες, χαρακτηρίζονται ως ενδοκυτταρικά παράσιτα και αποτελούν την απλούστερη μορφή ζωής. Η πρώτη απόδειξη για την ύπαρξή τους παρουσιάστηκε από τον M. Beijerinck το 1898 και τη δεκαετία του 1920 ξεκίνησε η ταξινόμηση τους (Fauquet & Martelli, 2013). Το μέγεθός τους είναι 20-300 nm (μικρότεροι από τους μονοκύτταρους οργανισμούς) και διαθέτουν είτε DNA είτε RNA μονής ή διπλής έλικας.

Οι πρώτες διεθνείς οργανωμένες προσπάθειες ταξινόμησης των ιών από το ICTV έγιναν το 1966 στο Διεθνές Συνέδριο Μικροβιολογίας που πραγματοποιήθηκε στη Μόσχα. Τα ονόματα για τα γένη, τις υποοικογένειες, τις οικογένειες και τις τάξεις πρέπει να είναι όλα μονολεκτικά και να τελειώνουν με τις καταλήξεις -virus, -virinae, -viridae και -virales, αντίστοιχα. Τα κριτήρια που εφαρμόστηκαν για τις ομαδοποιήσεις βασίστηκαν στη φύση του γενετικού υλικού, το γνωστό σύστημα Baltimore. Ο βραβευμένος με νόμπελ βιολογίας David Baltimore, δημιούργησε το 1971 ένα σύστημα ταξινόμησης των ιών, κατά το οποίο οι ιοί ομαδοποιούνται ανάλογα με τη φύση του γονιδιώματος τους και την πορεία που ακολουθεί το νουκλεϊκό οξύ για τη σύνθεση του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Οι κατηγορίες ταξινόμησης είναι 7 και είναι οι εξής (**Εικόνα 1**):

- I. DNA δίκλωνοι ιοί- dsDNA (double stranded DNA)
- II. DNA μονόκλωνοι ιοί- ssDNA sense DNA
- III. RNA δίκλωνοι ιοί- dsRNA
- IV. RNA μονόκλωνοι ιοί και θετικής πολικότητας- ssRNA ιοί (+)sense
- V. RNA μονόκλωνοι ιοί αρνητικής πολικότητας- ssRNA ιοί (-)sense RNA
- VI. RNA μονόκλωνοι ιοί, θετικής πολικότητας αντιστρόφως μεταγραφόμενοι - ssRNA-RT (+)sense RNA
- VII. DNA δίκλωνοι ιοί αντιστρόφως μεταγραφόμενοι- dsDNA-RT



Εικόνα 1 Σύστημα Baltimore (Baltimore classification ~ ViralZone, χ.χ.)

Στο σύστημα Baltimore οι ομάδες των ιών αναγράφονται με λατινικούς αριθμούς και διακρίνονται ανάλογα με τον τρόπο αντιγραφής και τον τύπο του γονιδιώματός τους (9.3B, 2017; Knipe & Howley, 2013)



2. Ιός της γρίπης

Ο ιός της γρίπης είναι RNA ιός αρνητικής πολικότητας της οικογένειας *Orthomyxoviridae*, το γονιδιώμά του είναι τεμαχισμένο σε οκτώ τμήματα και διαθέτει λιπιδικό φάκελο. Χωρίζεται στους τύπους Α,Β,С, και D, με τον ιό τύπου Α να προκαλεί πανδημίες κάθε 10-30 χρόνια, με την πιο σοβαρή να είναι αυτή της ισπανικής γρίπης το 1918 και την πιο πρόσφατη να είναι αυτή της γρίπης των χοίρων το 2009. Ο ιός τύπου Β προκαλεί επιδημίες και ο ιός τύπου С σποραδικά κρούσματα ενώ δεν έχει σημειωθεί μετάδοση του ιού τύπου D στον άνθρωπο. Μεταδίδεται μέσω των σταγονιδίων που παράγονται από τους νοσούντες ή μέσω μολυσμένων αντικείμενα. Η σοβαρότητα της νόσου εξαρτάται από την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ο ιός εμφανίζει πολύ συχνά σημειακές μεταλλάξεις και σπάνια ριζικές αναδιατάξεις στο γενετικό του υλικό επιφέροντας αλλαγή στη λοιμογόνο δύναμη. Από τις αλλαγές στα δυο κύρια αντιγόνα του ιού, την Αιμοσυγκολλητίνη και την Νευραμινιδάση ο ιός τύπου Α έχει χωριστεί σε υπότυπους. Τα τελευταία χρόνια οι επικρατέστεροι υπότυποι είναι ο Α/Η3Ν2 και το πανδημικό στέλεχος Α/Η1Ν1pdm09, που περιλαμβάνονται στο ετήσιο αντιγριπικό εμβόλιο μαζί με τον ιό της γρίπης τύπου Β. Ο εμβολιασμός συνιστάται σε άτομα ηλικίας άνω των 6 μηνών και είναι το αποτελεσματικότερο μέτρο πρόληψης κατά της γρίπης. Η χρήση αντιικών φαρμάκων επέφερε επιπλέον πίεση στον ιό και κατ' επέκταση την ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής.

Η ταυτοποίηση του ιού επιτυγχάνεται με ανοσοενζυμικές, καλλιεργητικές και μοριακές τεχνικές. Η επιδημιολογική επιτήρηση της γρίπης μελετά την πορεία της νόσου στην κοινότητα και τα ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας. Η παρακολούθηση γίνεται κυρίως μέσω ανάλυσης κλινικών δειγμάτων, ωστόσο οι πληροφορίες από τη χρήση περιβαλλοντικών δειγμάτων (π.χ. λύματα) χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικές στο σύστημα επιτήρησης κλινικών δειγμάτων. Η παρακολούθηση περιβαλλοντικών δειγμάτων αποτελεί εργαλείο της επιδημιολογίας που παρέχει έγκαιρα και γρήγορα αποτελέσματα με χαμηλό κόστος.



3. Πανδημίες του 20ου και του 21ου αιώνα

Οι ιοί της γρίπης προκαλούν εποχικές επιδημίες κάθε χρόνο και πανδημίες κάθε 10-30 χρόνια. Οι πανδημίες προκαλούνται αποκλειστικά από τους ιούς τύπου Α, ο ιός τύπου Β μπορεί να προκαλέσει επιδημίες. Αποτελείται από δύο γενεαλογικές σειρές, την Β/Victoria και την Β/Yamagata, οι οποίες αν και έδειξαν διαφορετική αντιγονικότητα και δυναμική μετάδοσης, ωστόσο συγκυκλοφορούν κατά την περίοδο της γρίπης από το 2001. Ο ιός της γρίπης τύπου Β εξαπλώνεται σχεδόν αποκλειστικά μεταξύ των ανθρώπων και δεν αποτελεί κίνδυνο για πανδημίας, για τον λόγο αυτό έχει μελετηθεί λιγότερο σε σχέση με τον ιό τύπου Α (Vieira κ.ά., 2021; Yang κ.ά., 2018), ωστόσο είναι υπεύθυνος για το 25% των παγκόσμιων κρουσμάτων γρίπης για τη χρονική περίοδο 2000-2018. Είναι πιθανό οι ιοί Α, Β και C να έχουν ένα κοινό πρόδρομο ιό και οι ιοί Α και Β να διαχωρίστηκαν πιο πρόσφατα από ότι ο ιός C (Knipe & Howley, 2013). Κατά τη διάρκεια του τελευταίου αιώνα οι επικρατέστεροι υπότυποι είναι οι Α/H1N1pdm09 και Α/H3N2 και οι δύο σειρές του ιού τύπου Β. Έχουν υπάρξει σποραδικά κρούσματα και από τους υπόλοιπους υπότυπους που όμως δεν προκάλεσαν παγκόσμιες εξάρσεις (Kawaoka & Neumann, 2012). Αν και υπάρχουν αναφορές για πιθανά κρούσματα γρίπης στο παρελθόν, αξιόπιστες καταγραφές εμφανίζονται μετά την πανδημία του 1918 (Knipe & Howley, 2013).

3.1. Ισπανική γρίπη (H1N1)-1918

Η πανδημία του 1918, γνωστή και ως Ισπανική γρίπη θεωρείται η πιο σοβαρή λόγω του μεγάλου ποσοστού θνητότητάς της. Υπολογίζεται ότι νόσησαν 500 εκατομμύρια άνθρωποι και κόστισε τη ζωή σε 50 εκατομμύρια νοσούντες με ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό θνητότητας στην ηλικιακή ομάδα 20-39 ετών (Berche, 2022; Monto & Fukuda, 2019; Sutton, 2018). Η πανδημία δε ξεκίνησε από την Ισπανία και δεν περιορίστηκε εκεί, ονομάστηκε Ισπανική Γρίπη γιατί κατά τη διάρκεια του 1^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου η Ισπανία ήταν ουδέτερη και οι πληροφορίες για τη γρίπη δημοσιεύονταν στις ισπανικές εφημερίδες χωρίς λογοκρισία, σε αντίθεση με τις πληροφορίες που δημοσιεύονταν στις εμπόλεμες χώρες, για τον λόγο αυτό ο ιός ονομάστηκε «Ισπανική γρίπη». Η νόσος εμφάνιζε ήπια συμπτώματα του αναπνευστικού και ήταν ιδιαίτερα μεταδοτική αλλά όχι θανατηφόρα. Τα συμπτώματα περιελάμβαναν υψηλό πυρετό, έντονο πονοκέφαλο, μυαλγία, βήχα, φαρυγγίτιδα και συνάχι. Οι θάνατοι οφείλονταν κυρίως σε πνευμονία και αναπνευστική ανεπάρκεια με τους περισσότερους ασθενείς να εμφανίζουν δευτερογενή βακτηριακή πνευμονία. Έχουν σημειωθεί θάνατοι από μαζική οξεία πνευμονική αιμορραγία ή πνευμονικό οίδημα, χαρακτηριστικά της ακραίας μολυσματικότητας του ιού.



Εικόνα 2 Επείγοντα περιστατικά σε νοσοκομείο του Kansas κατά τη διάρκεια της ισπανικής γρίπης (Magazine & Barry, χ.χ.)

3.1.1. Η επανεμφάνιση του ιού A/H1N1

Από το Νοέμβριο του 1977 και μέχρι τα τέλη του 1978 εμφανίζονταν κρούσματα γρίπης στην Κίνα και στη Σοβιετική Ένωση σε άτομα ηλικίας κάτω των 25 ετών. Ο ιός έφτασε στις υπόλοιπες χώρες κατά τη διάρκεια του επόμενου χρόνου. Η νοσηρότητα περιοριζόταν σχεδόν αποκλειστικά σε άτομα νεαρής ηλικίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι άτομα μεγαλύτερης ηλικίας προστατεύονταν από προϋπάρχουσα ανοσία. Σε αντίθεση με τη πανδημία του 1968, ο επανεμφανιζόμενος ιός A/H1N1 δεν αντικατέστησε τον ιό H3N2 αλλά τα δύο στελέχη συνέχισαν να κυκλοφορούν ταυτόχρονα (Knipe & Howley, 2013; Monto & Fukuda, 2019).



3.2. Ασιατική γρίπη A/H2N2-1957

Το Φεβρουάριου του 1957 ξέσπασαν κρούσματα γρίπης στην κινεζική επαρχία Guizhou και εξαπλώθηκαν στην επαρχία Hunan, στη Σιγκαπούρη και το Χονγκ Κονγκ μέχρι τον Απρίλιο της ίδια χρονιάς (Knipe & Howley, 2013). Στη συνέχεια, ο ιός εξαπλώθηκε στη Ρωσία και στην Ανατολική Ευρώπη και αργότερα στις ΗΠΑ και στις υπόλοιπες χώρες (AKIN & GÖZEL, 2020). Τον Μάιο απομονώθηκε στην Ιαπωνία ο υπότυπος A/H2N2 που ήταν υπεύθυνος για τα κρούσματα. Το στέλεχος αυτό και ήταν ένας συνδυασμός της γρίπης των ανθρώπων A/H1N1 και της γρίπης των πτηνών A/H2N2. Οι πρωτεΐνες H2, N2 και PB1 του ιού των πτηνών μεταφέρθηκαν στον ιό A/H1N1 των ανθρώπων μέσω αντιγονικής μετατροπής (antigenic shift) και ο νέος υπότυπος αντικατέστησε τον ιό A/H1N1 του 1918 (Kawaoka & Neumann, 2012; Monto & Fukuda, 2019). Η ασιατική γρίπη έπληξε το 40-50% του πληθυσμού και περίπου 25-30% εμφάνισαν κλινικά συμπτώματα. Οι περισσότεροι από τους θανάτους προκλήθηκαν από δευτερογενή βακτηριακή πνευμονία και τα ποσοστά θνητότητας ήταν αυξημένα στα παιδιά και στους ηλικιωμένους. Υπολογίζεται ότι 1-2 εκατομμύρια άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους από την ασιατική γρίπη (AKIN & GÖZEL, 2020). Τα συμπτώματα του ιού ήταν ήπια και έμοιαζαν με αυτά της εποχιακής γρίπης και περιελάμβαναν ρίγος, κατάπωση, πονόλαιμο, ρινική συμφόρηση, βήχα και πυρετό (Jackson, 2009). Η αυξημένη θνητότητα αποδίδεται στο γεγονός ότι δεν υπήρχε προϋπάρχουσα ανοσία των ανθρώπων στις γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειας αυτού του ιού (Knipe & Howley, 2013).

3.3. Γρίπη του Hong Kong A/H3N2-1968

Ο υπότυπος A/H3N2 εμφανίστηκε τον Ιούλιο του 1968 στο Hong Kong λόγω αντιγονικής μετατροπής του ιού A/H2N2 και διέθετε πρωτεΐνες από τον ιό της γρίπης των ανθρώπων και των πτηνών (Kawaoka & Neumann, 2012; Monto & Fukuda, 2019). Αν και ο νέος ιός ήταν εξαιρετικά μεταδοτικός, η λοίμωξη ήταν πιο ήπια από την ασιατική γρίπη. Ο ιός εξαπλώθηκε στους βετεράνους του πολέμου του Βιετνάμ οι οποίοι γυρνούσαν στις ΗΠΑ (AKIN & GÖZEL, 2020). Σύντομα εξαπλώθηκε σε όλο τον κόσμο, αντικαθιστώντας πλήρως τον A/H2N2, με τον αριθμό των νεκρών να φτάνει έως τα 4 εκατομμύρια παγκοσμίως (1957 Flu Pandemic | Cause, History, Deaths, & Facts | Britannica, 2023; Kawaoka & Neumann, 2012). Τα ποσοστά θνητότητας ήταν υψηλότερα στα παιδιά, και οι ηλικιωμένοι είχαν περισσότερες πιθανότητες να νοσηλευτούν (AKIN & GÖZEL, 2020).



3.4.A/H1N1pdm09 Μεξικό-2009

Τον Φεβρουάριο του 2009 ξέσπασαν τα πρώτα κρούσματα γρίπης στο Μεξικό από τον ιό A/H1N1. Η επιδημία εξαπλώθηκε γρήγορα σε πολλά μέρη του κόσμου. Το νότιο ημισφαίριο παρουσίαζε κρούσματα από τον Μάιο μέχρι και τα μέσα Ιουλίου. Οι Ηνωμένες Πολιτείες επλήγησαν από το πρώτο κύμα της γρίπης τον Μάιο και τον Ιούνιο, και από ένα δεύτερο κύμα στα τέλη Αυγούστου, η κορύφωση του οποίου ήρθε στα μέσα Οκτωβρίου. Ο ιός χαρακτηρίστηκε ως πανδημία τον Ιούνιο του 2009 και στη συνέχεια ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έδωσε στον ιό την ονομασία A/H1N1pdm09, ο οποίος αποτέλεσε την πρώτη πανδημία του 21^{ου} αιώνα (Kawaoka & Neumann, 2012; Knipe & Howley, 2013; Monto & Fukuda, 2019). Ο A/H1N1pdm09 διαθέτει γενετικό υλικό από τον άνθρωπο, τα πτηνά και δύο διαφορετικούς ιούς γρίπης των χοίρων (*1957 Flu Pandemic | Cause, History, Deaths, & Facts | Britannica*, 2023).

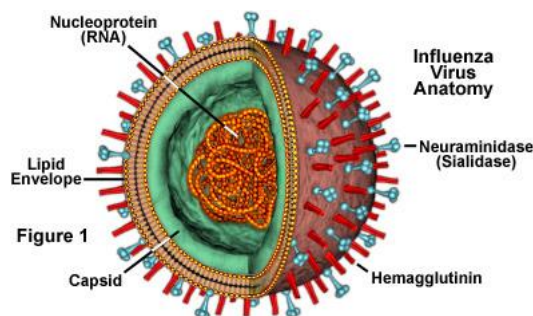
Η νόσος προκαλούσε ήπια συμπτώματα και δεν απαιτούνταν νοσηλεία. Ωστόσο, στις ομάδες υψηλού κινδύνου, για παράδειγμα στις εγκυμονούσες, στους ηλικιωμένους και στους παχύσαρκοι, αυξάνονταν οι πιθανότητες εμφάνισης αναπνευστικής νόσου με θανατηφόρα αποτελέσματα (Kawaoka & Neumann, 2012).

Το CDC αναφέρει πως την περίοδο της πανδημίας σημειώθηκαν 61 εκατομμύρια κρούσματα με 274.000 νοσηλείες και 12.470 θανάτους μεταξύ Απριλίου 2009 και Απριλίου 2010 (*First Global Estimates of 2009 H1N1 Pandemic Mortality Released by CDC-Led Collaboration | CDC*, 2019). Τα ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας διέφεραν μεταξύ των ηλικιακών ομάδων, με τους ηλικιωμένους να παρουσιάζουν χαμηλό ποσοστό μόλυνσης και τα παιδιά χαμηλό ποσοστό θνητότητας (Knipe & Howley, 2013; Monto & Fukuda, 2019). Κατά τη διάρκεια της πανδημίας, ένα ποσοστό των ασθενών παρουσίασε ταχέως εξελισσόμενη πρωτογενή ιογενή πνευμονία που οδήγησε σε σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) και πολλαπλή οργάνική ανεπάρκεια, η οποία συσχετίστηκε με υψηλή θνητότητα (Kalil & Thomas, 2019).

Η γρήγορη εξάπλωση του ιού οδήγησε στην άμεση ανάπτυξη εμβολίων για το νέο πανδημικό στέλεχος. Τα πρώτα εμβόλια εγκρίθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Ευρώπη τον Σεπτέμβριο του 2009 (Knipe & Howley, 2013).

4. Δομή του ιού της γρίπης

Ο ιός της γρίπης διαθέτει λιπιδικό φάκελο, ο οποίος προέρχεται από το κύτταρο ξενιστή, και στην επιφάνεια του φέρει την αιμοσυγκολλητίνη (HA), τη νευραμινιδάση (NA) και την πρωτεΐνη M2 που προβάλλουν από την επιφάνεια του ιού. Οι αιμοσυγκολλητίνες και οι νευραμινιδάσες σχηματίζουν στην επιφάνεια του ιού αιχμές μήκους ~10-14nm. Οι τρεις πρωτεΐνες της επιφάνειας επικαλύπτουν ένα στρώμα σχηματιζόμενο από την πρωτεΐνη M1 η οποία έχει ελικοειδή δομή και περικλείει τον πυρήνα (Knipe & Howley, 2013; Patrozou & Mermel, 2009). Η πρωτεΐνη M1 βρίσκεται σε αφθονία στο virion και έχει καθοριστικό ρόλο στη συναρμολόγηση και εκβλάστηση των σωματιδίων (Steinhauer & Skehel, 2002). Στο εσωτερικό της πρωτεΐνης M1 βρίσκονται οι πρωτεΐνες μεταφοράς (NEP- ονομάζεται επίσης μη δομική πρωτεΐνη 2, NS2) και το σύμπλοκο της ριβονουκλεοπρωτεΐνης (RNP), το οποίο αποτελείται από τμήματα ιικού RNA, τις πρωτεΐνες πολυμεράσης (PB1-βασική πολυμεράση 1, PB2-βασική πολυμεράση 2 και PA-όξινη πολυμεράση και P3 πολυμεράση για τους ιούς της γρίπης τύπου C, και τη νουκλεοπρωτεΐνη (NP) (Bouvier & Palese, 2008; Knipe & Howley, 2013; Patrozou & Mermel, 2009). Το σύμπλοκο RNP έχει ελικοειδή μορφή η οποία αναδιπλώνεται σχηματίζοντας μια διπλή έλικα (Patrozou & Mermel, 2009; Steinhauer & Skehel, 2002). Το περίβλημα του ιού της γρίπης τύπου B αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες: την αιμοσυγκολλητίνη, τη νευραμινιδάση και τις πρωτεΐνες NB και BM2. Η δομή του ιού τύπου C διαφέρει από τους άλλους δύο ιούς καθώς ο ιός C δημιουργεί στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων μακριές δομές μήκους έως και 500 μm (Patrozou & Mermel, 2009). Ο ιός φέρει στην επιφάνειά του μόνο μια δομική πρωτεΐνη, την πρωτεΐνη HEF η οποία αντιστοιχεί λειτουργικά στην HA και NA των ιών τύπου A και B, και μια δευτερεύουσα πρωτεΐνη του περιβλήματος, την CM2 (Bouvier & Palese, 2008; Knipe & Howley, 2013).



Εικόνα 3 Δομή του ιού της γρίπης (Molecular Expressions Cell Biology: The Influenza (Flu) Virus, χ.χ.)

Ο ιός της γρίπης τύπου A χωρίζεται σε υποτύπους με βάση τις αντιγονικές ιδιότητες της αιμαγλουτινίνης (HA) και της νευραμινιδάσης (NA), που βρίσκονται σε αναλογία 4 προς 1 (Bouvier & Palese, 2008; Fodor & Te Velhuis, 2020; Steinhauer & Skehel, 2002). Ο ιός τύπου B χωρίζεται σε δύο γενεαλογικές σειρές, που ονομάστηκαν Victoria και Yamagata από τα στελέχη B/Victoria/2/87 και B/Yamagata/16/88 αντίστοιχα (Lau κ.ά., 2020). Έχουν αναγνωριστεί προς το παρόν 18 υποτύποι αιμοσυγκολλητίνης HA (H1-H18) και 11 υποτύποι νευραμινιδάσης NA (N1-N11) (CDC, 2023a). Το γονιδίωμα των ιών της γρίπης είναι τεμαχισμένο, οι ιοί A και B διαθέτουν 8 τμήματα μονόκλωνου

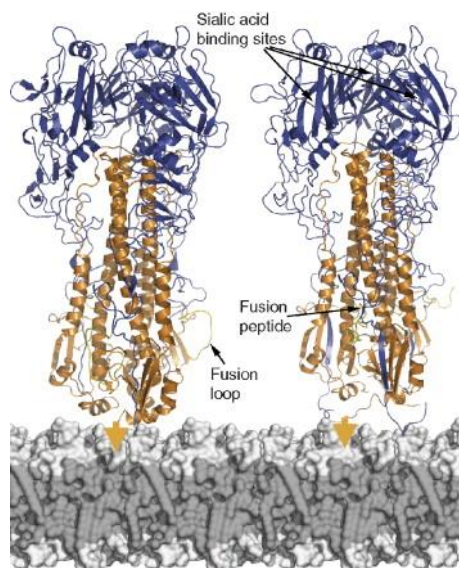


RNA αρνητικής πολικότητας και οι ιός C και D διαθέτουν 7 (Fodor & Te Velthuis, 2020; Knipe & Howley, 2013; Steinhauer & Skehel, 2002). Τα τμήματα ταξινομούνται με φθίνουσα σειρά ανάλογα με το μήκος τους και κάθε τμήμα κωδικοποιεί μια ή και περισσότερες πρωτεΐνες.

Ο σχηματισμός του ιικού σωματιδίου πραγματοποιείται στην επιφάνεια της μεμβράνης του μολυσμένου κυττάρου όπου γίνεται εκβλάστηση από τις περιοχές που έχουν συσσωρευτεί οι πρωτεΐνες του ιού (αιμοσυγκολλητίνες και νευραμινιδάσες) (Steinhauer & Skehel, 2002). Στα άκρα 5' και 3' κάθε τμήματος RNA υπάρχουν αμετάφραστες περιοχές (UTR) και ένα ή περισσότερα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF) (Fodor & Te Velthuis, 2020). Ο ιός γρίπης τύπου B διαθέτει περισσότερες αμετάφραστες περιοχές στο γονιδιώμα του από ότι ο ιός γρίπης τύπου A (Patrozou & Mermel, 2009). Οι αμετάφραστες περιοχές λειτουργούν ως υποκινητές για την αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιού (Fodor & Te Velthuis, 2020). Τα τμήματα RNA σχηματίζουν ικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (RNPs), όπου τα άκρα 5' και 3' συνδέονται με RNA πολυμεράσες και πολλαπλά αντίγραφα νουκλεοπρωτεΐνης NP δημιουργούν μια διπλής έλικας ραβδοειδή δομή. Στο εσωτερικό των τμημάτων RNA σχηματίζονται δεσμοί μεταξύ των βάσεων, που επιτρέπουν στον σχηματισμό μια δευτερογενούς δομής RNA (Fodor & Te Velthuis, 2020). Το σύμπλοκο vRNP αποτελεί τη βασική λειτουργική μονάδα για τη μεταγραφή και την αντιγραφή του γονιδιώματος. Τα PA, PB2 και PB1, καθώς και το PB1-F2 που αποτελεί προϊόν του PB1 στους ιούς τύπου A, συμμετέχουν στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων και της αντιγραφής του ιού (Zeng κ.ά., 2021).

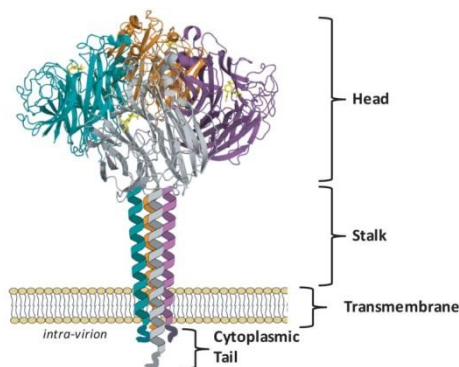
Στην αντιγραφή, το σύμπλοκο της ικής πολυμεράσης συνθέτει ένα θετικής πολικότητας RNA (cRNA) που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη σύνθεση του vRNA και τον πολλαπλασιασμό του ιού. Στη συνέχεια, τα αρνητικής πολικότητας τμήματα RNA (vRNAs) μεταγράφονται σε mRNAs από το σύμπλοκο ικής πολυμεράσης. Σε αντίθεση με άλλους RNA ιούς, οι διαδικασίες αντιγραφής και μεταγραφής πραγματοποιούνται στον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου (Kawaoka & Neumann, 2012).

Αιμοσυγκολλητίνες (HA): Είναι πρωτεΐνες της επιφάνειας των ιών και έχουν καθοριστικό ρόλο στην είσοδό τους στα κύτταρα του ξενιστή. Έχουν αναγνωριστεί 18 διαφορετικά είδη HA, (H1-H18) και η κωδικοποίησή της γίνεται από το 4^ο τμήμα RNA στους ιούς A και B. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι τριμερείς με ραβδοειδές σχήμα, έχουν ένα ανθρακικό άκρο που βρίσκεται στην ική μεμβράνη και ένα υδρόφιλο άκρο που προεξέχει ως ακίδα μακριά από την επιφάνεια του ιού (Knipe & Howley, 2013). Ο ρόλος τους είναι να δεσμεύονται σε υποδοχείς που υπάρχουν στην επιφάνεια του κυττάρου, τα σιαλικά οξέα (Patrozou & Mermel, 2009). Η γρίπη των πτηνών έχει προτίμηση στα SAs που συνδέονται με -2,3, ενώ οι ιοί των χοίρων δεσμεύουν είτε -2,6 είτε και στα δύο (Koel κ.ά., 2015). Στην περίπτωση του ιού τύπου B η συγγένεια δέσμευσης της HA με τους υποδοχείς του κυττάρου είναι μικρότερη από τον ιό A (Koutsakos κ.ά., 2016). Η προσαρμογή της ζωνόσους ελέγχεται από αυτή την πρωτεΐνη καθώς η αλλαγή στην προτίμηση υποδοχέων οδηγεί στη δημιουργία νέου στελέχους γρίπης (Knipe & Howley, 2013; Koel κ.ά., 2015; Patrozou & Mermel, 2009).



Εικόνα 4 Δομή αιμοσυγκολλητίνης (Influenza Virus Hemagglutinin - an overview | ScienceDirect Topics, χ.χ.)

Νευραμινιδάσες (NA): Περιέχουν 470 αμινοξέα, αποτελούν συστατικά του λιπιδικού φακέλου του ιού και στους ιούς τύπου Α καθορίζουν το όνομα του ιού. Μέχρι στιγμής έχουν προσδιορισθεί 11 διαφορετικοί τύποι νευραμινιδάσης (N1-N11) (CDC, 2023a). Η NA κωδικοποιείται από το 6^ο τμήμα RNA στους ιούς Α και Β και είναι ένα τετραμερές σε σχήμα μανιταριού που αποτελείται από την κυτταροπλασματική ουρά, τη διαμεμβρανική περιοχή, το κυρίως σώμα και μια σφαιρική κεφαλή (Gubareva κ.ά., 2000; Knipe & Howley, 2013; Świerczyńska κ.ά., 2022). Η νευραμινιδάση δρα καταστροφικά για τους υποδοχείς του κυττάρου καθώς διασπά τα υπολείμματα σιαλικού οξέος από τις γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης με σκοπό να απελευθερώσει τα νεοσυντιθέμενα ιικών σωματιδίων στα υπόλοιπα κύτταρα του ξενιστή (Boktor & Hafner, 2023; Bouvier & Palese, 2008; Knipe & Howley, 2013). Θεωρείται επίσης ότι βοηθά στη μολυσματικότητα του ιού, καθώς είναι σημαντική για την αποτελεσματική αντιγραφή του και διασπά τις εκκρίσεις των βλεννογόνων στην αναπνευστική οδό ώστε ο ιός να διεισδύσει στο αναπνευστικό επιθήλιο. Στους ιούς με ανενεργή ή κατεστραμμένη νευραμινιδάση τα ιικά σωματίδια συσσωρεύονται στην επιφάνεια του κυττάρου με αποτέλεσμα να μειώνεται η μολυσματικότητά τους (Bouvier & Palese, 2008). Η δομή και η δράση της νευραμινιδάσης στους ιούς τύπου Β είναι παρόμοια με αυτή των ιών τύπου Α, ωστόσο δεν υπάρχουν υπότυποι της NA των ιών Β, πιθανώς επειδή αυτοί δεν έχουν κύριους ξενιστές τα ζώα (Knipe & Howley, 2013).



Εικόνα 5 Δομή νευραμινιδάσης (McAuley κ.ά., 2019)



Πρωτεΐνη μήτρας M1: Κωδικοποιείται από το 7^ο τμήμα RNA στους ιούς τύπου A και B και υπάρχει σε αφθονία στο virion (Koutsakos κ.ά., 2016). Βρίσκεται κάτω από τον λιπιδικό φάκελο και σχηματίζει μια γέφυρα μεταξύ των συστατικών του εσωτερικού του πυρήνα και των πρωτεϊνών της μεμβράνης. Η M1 αλληλεπιδρά, με τα vRNPs και με την πρωτεΐνη NEP/NS2 για την εξαγωγή των νεοσυντηθμένων vRNPs στο κυτταρόπλασμα, η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται όταν ολοκληρωθεί η αντιγραφή (Bouvier & Palese, 2008; Knipe & Howley, 2013).

Πρωτεΐνη M2: Το γονίδιο της πρωτεΐνης M1 κωδικοποιεί, μετά από ωρίμανση του mRNA, μια ακόμη πρωτεΐνη, την M2, η οποία λειτουργεί ως διάλυος ιόντων για τη διοχέτευση πρωτονίων από τα όξινα ενδοσώματα στο εσωτερικό του ιού ώστε να διασπαστεί το σύμπλοκο RNP (uncoating). Η M2 είναι μια ενσωματωμένη στον λιπιδιακό φάκελο πρωτεΐνη, που συντίθεται στα τελευταία στάδια της λοίμωξης (Knipe & Howley, 2013; Koutsakos κ.ά., 2016). Επίσης, συμβάλει στη σταθεροποίηση της HA στους υποδοχείς του κυττάρου σε χαμηλό pH καθώς και στη μορφολογία των σωματιδίων του ιού (Knipe & Howley, 2013). Η πρωτεΐνη M2 δεν αποτελεί πρωτεΐνη της επιφάνειας του ιού για τον λόγο αυτό έχει προταθεί ως συστατικό των εμβολίων (Bouvier & Palese, 2008).

Πρωτεΐνη NS1: Στους ιούς τύπου A και B κωδικοποιείται από το 8^ο τμήμα RNA και στους ιούς τύπου C από το 6^ο και το 7^ο τμήμα. Στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης εντοπίζεται στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων και στα μεταγενέστερα στάδια στο κυτταρόπλασμά τους (Koutsakos κ.ά., 2016). Είναι μια μη δομική πρωτεΐνη που παρεμβαίνει στην αντιική δράση των ιντερφερονών των κυττάρων του ξενιστή και εμποδίζει τη δράση του RIG-I, ενός σημαντικού υποδοχέα αναγνώρισης παθογόνων (Fukuyama & Kawaoka, 2011; Kawaoka & Neumann, 2012). Οι πρωτεΐνες NS1 των διάφορων ιών γρίπης τύπου A διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ικανότητά τους να παρεμβαίνουν στις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή (Kawaoka & Neumann, 2012). Η NS1 εκφράζεται στα πρώτα στάδια πολλαπλασιασμού του ιού λόγω του ρόλου που έχει στον κύκλο ζωής του. Επίσης, ενισχύει τη μεταφραστική ικανότητα των ιικών mRNAs μέσω της σύνδεσής της με το 5' άκρο των κωδικοποιημένων περιοχών των μεταγραφών του ιικού mRNA και με κυτταρικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην έναρξη της μετάφρασης. (Knipe & Howley, 2013)

Πρωτεΐνη NEP/NS2: Η NEP ("πυρηνική πρωτεΐνη εξαγωγής", που παλαιότερα ονομαζόταν NS2), είναι μια μη δομική πρωτεΐνη βάρους 14,5kDa που εκφράζεται από το 8^ο τμήμα RNA στους ιούς τύπου A και B μετά από ωρίμανση του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NS (Akarsu, 2003; Knipe & Howley, 2013). Η πρωτεΐνη NEP/NS2 μεσολαβεί στη σύνδεση του Crm1 με τα vRNPs με σκοπό την εξαγωγή τους από τον πυρήνα (Akarsu, 2003). Παράγεται στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης, συσσωρεύεται στον πυρήνα του κυττάρου και στη συνέχεια μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα, κοντά στις θέσεις εκβλάστησης του ιού. Στους ιούς της γρίπης τύπου A η πρωτεΐνη NEP/NS2 αλληλεπιδρά μέσω της πρωτεΐνης M1 με το vRNP, σε αντίθεση με τους ιούς της γρίπης τύπου B όπου η πρωτεΐνη NEP/NS2 αλληλεπιδρά απευθείας με το vRNP (Koutsakos κ.ά., 2016).

Πρωτεΐνη HEF: Παράγεται αποκλειστικά στους ιούς τύπου C από το 4^ο τμήμα RNA. Η HEF έχει διπλό ρόλο, μέσω αυτής γίνεται η είσοδος του ιού στα κύτταρα και η αποδέσμευση των ιικών σωματιδίων από τους υποδοχείς των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία της σύνταξης του ιού, η πρωτεΐνη μπορεί να ενεργοποιηθεί και σε



υψηλότερο pH. Ο ρόλος της είναι καταστροφικός για τους υποδοχείς και εμφανίζει δράση εστεράσης, με διάσπαση μιας ομάδας ακετυλίου στη θέση 9 του σιαλικού οξέος. Η δραστηριότητα αυτή είναι σημαντική για την είσοδο του ιού, ώστε η διαδικασία αποεπένδυσης (uncoating) να μπορεί να ξεκινήσει. Αν και οι ομοιότητες στις αλληλουχίες μεταξύ των HAs και της HEF είναι μόνο 12%, η συνολική δομή του μορίου είναι παρόμοια (Knipe & Howley, 2013).

RNA πολυμεράσης: Το σύμπλεγμα της RNA πολυμεράσης έχει μέγεθος 250 kDa και αποτελείται από τρεις υπομονάδες, την PB1, την PB2 και την PA οι οποίες είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους σχηματίζοντας μια συμπαγή δομή σε σχήμα U. Οι δύο πρώτες πολυμεράσες έχουν αλκαλικό pH και η PA έχει όξινο, γεγονός που επηρεάζει τη δομή του συμπλέγματος στον χώρο. Το σύμπλεγμα δημιουργείται μέσω σύνδεσης της PB1 με την PA και την PB2 μέσω των N- και C- τελικών άκρων αντίστοιχα που βρίσκονται στους δύο βραχίονες του συμπλόκου. Το N- τελικό άκρο της PA αλληλεπιδρά με την PB2 και οι δύο βραχίονες βρίσκονται σε επαφή με την περιοχή εισόδου του εκκινητή και εξόδου του τελικού προϊόντος. Η τελική περιοχή PA-C και η περιοχή πρόσδεσης του υποκινητή βρίσκονται στην κάτω περιοχή του U. Η RNA πολυμεράση είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφή και την αναπαραγωγή του γονιδιώματος του ιού, η οποία ξεκινά με σύνδεση του συμπλέγματος στους vRNA εκκινητές (Knipe & Howley, 2013).

Πρωτεΐνη PB1: Η έκφραση της πρωτεΐνης PB1 γίνεται από το 2^ο τμήμα RNA. Η PB1 καταλύει τη διαδοχική προσθήκη νουκλεοτιδίων κατά την επιμήκυνση της αλυσίδας RNA, περιέχει συντηρημένα τμήματα της RNA-πολυμεράσης και θεωρείται κρίσιμη για την ενζυματική λειτουργία της. Το C- τελικό άκρο της αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PB2 σχηματίζοντας τρεις έλικες. Η PB1 είναι επίσης υπεύθυνη για τη δέσμευση στα τελικά άκρα τόσο του vRNA όσο και των cRNA για την έναρξη της μεταγραφής και της αντιγραφής, καθώς και για τον κυτταρικό θάνατο (Knipe & Howley, 2013).

Πρωτεΐνη PB2: Η πρωτεΐνη PB2 παράγεται από το 1^ο τμήμα RNA των ιών και μέσω αυτής ελέγχεται η έναρξη της μεταγραφής, καθώς είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του καλύμματος στα μόρια pre-mRNA του ξενιστή και συμμετέχει στην αντιγραφή του γονιδιώματος. Επιπλέον, η PB2 αλληλεπιδρά με τις καρβοφερίνες α1 μέσω του διμερούς σήματος πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που διαθέτει. Η πρωτεΐνη αυτή, στους ιούς της γρίπης των ανθρώπων, εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων και έχει σημαντικό και καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια των θηλαστικών. Επιπλέον, η PB2 έχει σημαντικό ρόλο στην επιλογή του ξενιστή του ιού (Knipe & Howley, 2013).

Ένζυμο PA: Το 3^ο τμήμα RNA είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ενζύμου PA στους ιούς της γρίπης τύπου A και B. Το N-τελικό άκρο του PA αλληλεπιδρά με την PB2 και το C-τελικό άκρο αλληλεπιδρά με την PB1. Στο ένζυμο PA αποδίδεται η δραστηριότητα της ενδονουκλεάσης της πολυμεράσης που απαιτείται για την παραγωγή του καλυμμένου εκκινητή, καθώς και πρωτεολυτική δραστηριότητα και έτσι μπορεί να ελέγχει τα επίπεδα έκφρασής της (Kawaoka & Neumann, 2012; Knipe & Howley, 2013).

Πρωτεΐνη PB1-F2: Κωδικοποιείται σε ορισμένους ιούς τύπου A, από ένα εναλλακτικό πλαίσιο μετάφρασης (ORF) στο 2^ο τμήμα RNA, που κωδικοποιεί και την πρωτεΐνη PB1. Το μήκος της είναι 87-90 αμινοξέα, ανάλογα με το στέλεχος του ιού, και εκφράζεται από τους περισσότερους ανθρώπινους ιούς και ιούς των πτηνών, αλλά όχι στα στελέχη



των χοίρων (Kawaoka & Neumann, 2012). Η πρωτεΐνη έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην παθογένεια του ιού μέσω διαφόρων μηχανισμών. Η αλληλεπιδράσεων με τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλεί απόπτωση και αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης. Το ένζυμο PB1-F2 αλληλεπιδρά επίσης με την PB1 πρωτεΐνη για τη συγκράτηση των vRNPs στον πυρήνα (Kawaoka & Neumann, 2012; Knipe & Howley, 2013).

Πρωτεΐνη NP: Κωδικοποιείται από το 5^ο τμήμα RNA, έχει μέγεθος 56kDa και αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τον μολυσματικό κύκλο του ιού και για τη μετατροπή της σύνθεσης του RNA από τον τρόπο μεταγραφής στον τρόπο αντιγραφής (Biswas κ.ά., 1998; Knight κ.ά., 2021). Η νουκλεοπρωτεΐνη είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη η οποία συμβάλλει στο σχηματισμό των vRNPs δεσμεύοντας ανά 25 βάσεις το RNA. Επιπλέον, η NP του ιού της γρίπης είναι μια σημαντική δομική πρωτεΐνη με πολλαπλές λειτουργίες, είναι πλούσια σε αργινίνη και συνδέεται μη ειδικά στο RNA in vitro. In vivo η NP δεσμεύεται μόνο σε πλήρες cRNA θετικής πολικότητας και σε vRNA αρνητικής πολικότητας, σχηματίζοντας cRNP και vRNP, αντίστοιχα, ενώ δε προσδένεται σε υικό mRNA θετικής πολικότητας που διαθέτει καλυμμένες αλληλουχίες στα 5' και και στο άκρο 3' poly(A) ουρά. Η NP έχει ένα ή περισσότερα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και μαζί με το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης οδηγούν το vRNP στον πυρήνα μετά την αποεπένδυση του γονιδιώματος στο κύτταρο. Το vRNP επίσης αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη M1, γεγονός που υποδηλώνει μια πιθανή αλληλεπίδραση του NP με την M1 που ενδεχομένως έχει κρίσιμο ρόλο στην εκβλάστηση των σωματιδίων του ιού. Η NP αλληλεπιδρά τόσο με το PB1 όσο και με το PB2 του συμπλόκου πολυμεράσης αλλά όχι με το PA (Biswas κ.ά., 1998; Knight κ.ά., 2021; Knipe & Howley, 2013).

Πρωτεΐνη NB: Είναι μια επιφανειακή πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το 6^ο τμήμα RNA αποκλειστικούς στους ιούς γρίπης τύπου B από ένα πλαίσιο ανοιχτής ανάγνωσης (ORF). Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης επικαλύπτει εκείνο του NA και τα δύο κωδικόνια έναρξης AUG χωρίζονται από τέσσερα νουκλεοτίδια, με το κωδικόνιο έναρξης του NB να βρίσκεται πιο κοντά στο 5' άκρο του mRNA. Η NB είναι μια αναπόσπαστη γλυκοπρωτεΐνη της μεμβράνης, με μέγεθος 100 αμινοξέων που ενσωματώνεται στο ιό (Koutsakos κ.ά., 2016). Διαθέτει ένα N άκρο 18 αμινοξέων, μια διαμεμβρανική περιοχή 22 αμινοξέων και ένα C άκρο 60 αμινοξέων. Η γλυκοπρωτεΐνη NB σχηματίζει τετραμερές στην επιφάνεια του μολυσμένου κυττάρου και ενσωματώνεται στον ιό κατά την εκβλάστηση, αλλά μόνο σε σχετικά μικρούς αριθμούς (περίπου 15-100 μόρια ανά ιό) (Elderfield κ.ά., 2016; Knipe & Howley, 2013; Koutsakos κ.ά., 2016).

Πρωτεΐνη P3: Είναι μια πρωτεΐνη του συμπλόκου πολυμεράσης, κωδικοποιείται από το 3^ο τμήμα RNA και παράγεται αποκλειστικά στους ιούς τύπου C, αφού αυτοί δεν παράγουν την πρωτεΐνη PA. Μαζί με τα τμήματα PB1 και PB2 σχηματίζουν ετεροτριμερές σύμπλοκο πολυμεράσης, παρόμοιο με αυτό των IAV και IBV. Η P3 είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή του γονιδιώματος καθώς έχει τη δράση της ενδονουκλεάσης στο σύμπλοκο (Knipe & Howley, 2013; Sreenivasan κ.ά., 2021).



Table 1: Influenza A virus genes and proteins

Gene ID	Segment	Protein name	Protein function
1	Polymerase B2 (PB2)	Polymerase B2 (PB2)	Internal protein, virus replication
2	Polymerase B1 (PB1)	Polymerase B1 (PB1) PB1-F2	Internal protein, virus replication Mitochondrial targeting and apoptosis
3	Polymerase A (PA)	Polymerase A (PA)	Internal protein, virus replication
4	Hemagglutinin (HA)	Hemagglutinin (HA)	Surface glycoprotein, viral attachment, antigenic determinant, subtype specific (H1 through H16)
5	Nucleoprotein (NP)	Nucleoprotein (NP)	Nucleocapsid protein, RNA coating, nuclear targeting, RNA transcription, type (A,B,C) specific
6	Neuraminidase (NA)	Neuraminidase (NA)	Surface glycoprotein, antigenic determinant, viral release from host cells, subtype specific (N1 through N9)
7	Matrix (M)	Matrix 1 (M1) Matrix 2 (M2)	Membrane protein stability, type (A,B,C) specific Membrane protein, viral uncoating, type (A,B,C) specific
8	Non-structural (NS)	Non-structural 1 (NS1) Non-structural 2 (NS2)	Internal proteins Regulation of virus life cycle, especially mRNA transcription and localization of viral ribonucleic proteins

Adapted from Lamb and Krug, 2001.²

Πίνακας 1 Βασικές πρωτεΐνες του ιού τύπου Α και οι λειτουργίες τους (Gramer, 2005)



4.1.Γρίπη τύπου Α

Στον ιό τύπου Α τα τμήματα 1, 3, 4 και 5 κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες PB2, PA, HA και NP αντίστοιχα. Το τμήμα 2 κωδικοποιεί την υπομονάδα πολυμεράσης PB1 και την πρωτεΐνη PB1-F2 σε μερικά στελέχη του ιού. Το τμήμα 6 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NA, το τμήμα 7 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη M1 και το τμήμα 8 εκφράζει την πρωτεΐνη NS1 η οποία δρα ανταγωνιστικά με τις ιντερφερόνες που παράγονται κατά την ανοσολογική απόκριση. Τέλος, μέσω ωρίμανσης του mRNA παράγεται η πρωτεΐνη NEP/NS2 η οποία συμβάλει στην εξαγωγή του ιικού RNA από τον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή (Bouvier & Palese, 2008; Kawaoka & Neumann, 2012; Knipe & Howley, 2013).

4.2.Γρίπη τύπου Β

Ο ιός της γρίπης τύπου Β εμφανίστηκε για πρώτη φορά, το 1940, με το ξέσπασμα μια οξείας αναπνευστικής νόσου σε παιδιά, που εμφάνιζε παρόμοια κλινική εικόνα με αυτή των σύγχρονων επιδημιών του ιού της γρίπης Α. Ο ιός απομονώθηκε και ονομάστηκε ιός της γρίπης τύπου Β (IBV), και τα συμπτώματα που προκαλεί είναι βήχας, πονόλαιμος ρινικές εκκρίσεις και πυρετό (Koutsakos κ.ά., 2016). Οι αιμασυγκολλητίνες και οι νευραμινιδάσες του ιού ταξινομούνται σε δύο αντιγονικούς διακριτούς γενεαλογικούς κλάδους (Knipe & Howley, 2013). Οι πιο πρόσφατες μεταλλάξεις του ιού της γρίπης τύπου Β που κυκλοφόρησαν τα τελευταία χρόνια είναι οι Yamagata και Victoria, οι δύο γενεαλογικές σειρές εμφανίστηκαν πριν από το 1980 και κυκλοφορούν, ταυτόχρονα πλέον. παγκοσμίως (Boktor & Hafner, 2023; Koutsakos κ.ά., 2016). Ο IBV Victoria είναι πιο διαδεδομένος στους νεότερους πληθυσμούς από τον ιός IBV Yamagata, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην υψηλότερη έκφραση γλυκανών σιαλικού οξέως α-2,3 στα παιδιά (Koutsakos κ.ά., 2016). Το γονιδίωμα του ιού εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με αυτό του ιού τύπου Α. Τα τρία πρώτα τμήματα RNA κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες πολυμεράσης PB2, PB1 και PA αντίστοιχα, το 4^ο τμήμα κωδικοποιεί την HA και το 5^ο την πρωτεΐνη NP, όπως και στον ιό τύπου Α. Το 6^ο τμήμα κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NA καθώς και την πρωτεΐνη NB, χαρακτηριστική του ιού. Τα τμήματα 7 και 8 κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες M1 και NS1, NEP/NS1 αντίστοιχα (Kawaoka & Neumann, 2012; Knipe & Howley, 2013). Οι IBV δεν κωδικοποιούν καμία από τις "βοηθητικές" πρωτεΐνες των IAV, όπως η PB1-F2 (Koutsakos κ.ά., 2016).

4.3.Γρίπη τύπου C και D

Στον ιό τύπου C τα 3 τμήματα RNA κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες πολυμεράσης PB1, PB2 και P3. Οι δύο πρώτες είναι όμοιες με τις αντίστοιχες των ιών Α και Β. Το τμήμα 4 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HEF που συνδυάζει τις λειτουργίες της αιμοσυγκολλητίνης, της νευραμινιδάσης και της CM2. Η HEF καταστρέφει τους υποδοχείς και ενεργοποιεί τη σύνταξη του ιού. Τέλος το τμήμα 5 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NP και τα τμήματα 6



και 7 κωδικοποιούν την πρωτεΐνη NS1 (Kawaoka & Neumann, 2012; Knipe & Howley, 2013; Patrozou & Mermel, 2009).

Ο Influenza D ανακαλύφθηκε το 2011 αν και κυκλοφορεί στους πληθυσμούς των βοοειδών από το 2003. Ανήκει στην οικογένεια *Orthomyxoviridae* και εμφανίζει ανθεκτικότητα στις ακραίες τιμές θερμοκρασίας και στο pH. Ο ιός έχει ευρύ κυτταρικό τροπισμό και διάδοση σε διάφορους ξενιστές με κύριο ξενιστή του τα βοοειδή, ωστόσο δεν έχει μεταδοθεί στους ανθρώπους. Η μετάδοσή του γίνεται μέσω άμεσης επαφής και με αερολύματα. Ο ιός τύπου D παρουσιάζει 50% ομοιότητα με τον ιό της ανθρώπινης γρίπης C, για τον λόγο αυτό θεωρήθηκε αρχικά νέος υπότυπος του ιού C. Ωστόσο, ο IDV δεν είχε διασταυρούμενη αντίδραση έναντι των αντισωμάτων του ανθρώπινου ICV, οπότε κατατάχθηκε σε ένα νέο γένος στην οικογένεια *Orthomyxoviridae* (Ruiz κ.ά., 2022). Ο IDV διαθέτει λιπιδικό φάκελο και τμηματοποιημένο γονιδίωμα, το οποίο αποτελείται από 7 τμήματα μονόκλωνου RNA με αρνητική πολικότητα και κωδικοποιεί 9 πρωτεΐνες. Όπως και ο ιός της γρίπης C, δεν διαθέτουν νευραμινιδάσες, αλλά φέρει την πρωτεΐνη HEF (*Orthomyxoviridae*, 2017).



5. Κατηγορίες γρίπης

5.1.Εποχική γρίπη

Η δραστηριότητα της εποχικής γρίπης είναι εντονότερη κατά τους χειμερινούς μήνες. Στις περισσότερες χώρες η περίοδος αυτή ξεκινά τον Οκτώβριο και διαρκεί μέχρι και τον Απρίλιο, με κορύφωση των κρουσμάτων να παρατηρείται στο διάστημα μεταξύ Δεκεμβρίου και Φεβρουαρίου (CDC, 2022b), ενώ στην Ελλάδα η δραστηριότητα αυξάνεται κατά τους μήνες Φεβρουάριο-Μάρτιο (‘Γρίπη και Εποχική Γρίπη’, χ.χ.). Στις χώρες με τροπικό κλίμα παρατηρούνται κρούσματα καθ’ όλη τη διάρκεια του έτους (CDC, 2022b). Οι υπότυποι που έχουν επικρατήσει είναι ο A/H3N2 και ο A/H1N1pdm09, οι οποίοι περιλαμβάνονται στο αντιγριπικό εμβόλιο μαζί με τον ιό τύπου B. Αν και οι περισσότεροι άνθρωποι ανακάμπτουν από την εποχική γρίπη, στις ομάδες υψηλού κινδύνου μπορεί να προκαλέσει σοβαρή ασθένεια ή ακόμη και θάνατο. Ο εμβολιασμός συνιστάται ως το καλύτερο μέτρο πρόληψης κατά του ιού της γρίπης και είναι αναγκαίο να επαναλαμβάνεται κάθε χρόνο, ειδικά από τα άτομα που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου (‘Γρίπη και Εποχική Γρίπη’, χ.χ.)

5.2.Πανδημία

Οι πανδημίες προκαλούνται από ιούς τύπου A, οι οποίοι μεταλλάσσονται με αποτέλεσμα την εμφάνιση νέων υποτύπων, στους οποίους οι άνθρωποι δεν έχουν ανοσία (‘Γρίπη και Εποχική Γρίπη’, χ.χ.). Η πιο σοβαρή πανδημία που κόστισε τη ζωή έως και 50 εκατομμυρίων ανθρώπων είναι αυτή της ισπανικής γρίπης το 1918 (Monto & Fukuda, 2019). Στη συνέχεια ακολούθησαν η ασιατική γρίπη το 1957 και η γρίπη του Hong Kong το 1968. Η πιο πρόσφατη πανδημία είναι αυτή του 2009 με τον υπότυπο A/H1N1pdm09 που προέρχεται από μετάλλαξη στελέχους που προσβάλλει τους χοίρους (Knipe & Howley, 2013).

5.3.Γρίπη των χοίρων

Η γρίπη των χοίρων είναι αναπνευστική νόσος που προκαλείται από τον ιό γρίπης τύπου A και προκαλεί τακτικά κρούσματα γρίπης στους χοίρους. Η γρίπη των χοίρων είναι υπεύθυνη για την πανδημία του 2009 που ξεκίνησε από το Μεξικό. Οι κυριότεροι ιοί γρίπης των χοίρων που κυκλοφορούν στους χοίρους των ΗΠΑ τα τελευταία χρόνια είναι, ο ιός γρίπης των χοίρων τριπλής επανασύνδεσης (tr) H1N1, ο ιός trH3N2 και ο ιός trH1N2 (*Information on Swine/Variant Influenza* | CDC, 2023).



5.4.Γρίπη των πτηνών A/H5N1

Η γρίπη των πτηνών οφείλεται σε υπότυπο του ιού τύπου Α που μετά από μεταλλάξεις πέρασε και στους ανθρώπους προκαλώντας λοίμωξη. Ο ιός εξαπλώνεται μεταξύ των άγριων υδρόβιων πτηνών παγκοσμίως και μπορεί να μολύνει τα οικόσιτα πουλερικά και άλλα είδη πτηνών και ζώων (CDCespanol, 2023). Το 1997 η γρίπη των πτηνών A/H5N1 (HPAIV) εξαπλώθηκε για πρώτη φορά από τα πουλερικά στον άνθρωπο προκαλώντας επιδημία στο Hong Kong. Λήφθηκαν άμεσα μέτρα, όπως η θανάτωση πουλερικών που ήταν ύποπτα για τη νόσο, γεγονός που βοήθησε στη μείωση της μετάδοσης. Δεν εντοπίστηκαν άλλα ανθρώπινα κρούσματα μέχρι το 2003 όταν, σε συνδυασμό με θανάτους πουλερικών, εξαπλώθηκε ο ιός A/H5N1 στον άνθρωπο, κυρίως στη Νοτιοανατολική Ασία. Οι περισσότερες λοιμώξεις ανθρώπων ήταν αποτέλεσμα επαφής τους με πουλερικά, αλλά σημειώθηκαν και λιγιστά περιστατικά εξάπλωσης μεταξύ ανθρώπων. Τα συμπτώματα ήταν σοβαρά και συχνά οδηγούσαν σε αναπνευστική ανεπάρκεια και θάνατο (Monto & Fukuda, 2019). Η σοβαρότητα της νόσου οφείλεται στο γεγονός ότι η αιμοσυγκολλητίνη του ιού αναγνωρίζει τους δεσμούς α2-3 σιαλικών οξέων και μολύνει το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα (Fukuyama & Kawaoka, 2011). Η γρίπη των πτηνών H5N1 εμφανίζει συμπτώματα πρωτοπαθούς πνευμονίας και παρουσιάζει έως και 60% θνητότητα (Kalil & Thomas, 2019). Άλλοι γνωστοί υπότυποι των ιών των πτηνών είναι ο H7N2, H7N3 και H9N2. Αν και οι ιοί αυτοί σπάνια προκαλούν λοιμώξεις στους ανθρώπους, αναγνωρίζεται ότι έχουν προοπτικές επιδημίας και πανδημίας (1957 Flu Pandemic | Cause, History, Deaths, & Facts | Britannica, 2023).

5.5.Γρίπη των πτηνών A/H7N9

Τον Μάρτιο του 2013 αναφέρθηκαν τα πρώτα κρούσματα του νέου ιού της γρίπης των πτηνών H7N9 στην Κίνα. Ήταν η πρώτη μετάδοση του ιού σε ανθρώπους ή ζώα και έκτοτε έχουν παρατηρηθεί και άλλα μεμονωμένα κρούσμα. Οι νοσούντες ανέφεραν πρόσφατη έκθεση σε μολυσμένα πουλερικά ή σε δυνητικά μολυσματικό περιβάλλον και εμφάνισαν σοβαρή νόσο (Avian Influenza A (H7N9) Virus Outbreak, χ.χ.). Οι περισσότεροι ασθενείς εμφάνισαν αρχικά γριπώδη συνδρομή (ILI), η οποία στη συνέχεια εξελίχθηκε σε σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) που οδήγησε σε νοσηλεία. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν υψηλό πυρετό, βήχα παραγωγικό και μη παραγωγικό, δύσπνοια, υποξία και αλλοιώσεις του κατώτερου αναπνευστικού. Οι επιπλοκές του ιού περιλαμβάνουν σηπτικό σοκ, αναπνευστική ανεπάρκεια, ARDS, οξεία νεφρική δυσλειτουργία, δυσλειτουργία πολλαπλών οργάνων, ραβδομύλυση, εγκεφαλοπάθεια και άλλα. Προς το παρόν η μετάδοση του ιού από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι σπάνια (Overview of the Emergence and Characteristics of the Avian Influenza A(H7N9) Virus, χ.χ.).



6. Μετάδοση

Ο ιός της γρίπης μεταφέρεται μέσω της αναπνευστικής οδού. Η αναπνευστική οδός χωρίζεται στο ανώτερο και το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα και είναι η πιο συνηθισμένη πύλη εισόδου των ιών στο ανθρώπινο σώμα. Το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα περιλαμβάνει τη μύτη τη ρινική κοιλότητα, τα ιγμόρεια, τον φάρυγγα και τον λάρυγγα. Το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα περιλαμβάνει την τραχεία, τους βρόγχους και τους πνεύμονες. Μέσα στους πνεύμονες, οι δύο βρόγχοι διακλαδίζονται σε βρογχιόλια μικρής διαμέτρου που οδηγούν σε περίπου 300 εκατομμύρια κυψελίδες, όπου γίνεται η ανταλλαγή αερίων. Το επιθήλιο του ανώτερου αναπνευστικού παράγει βλέννα η οποία παγιδεύει τα εισπνεόμενα σωματίδια και στη συνέχεια καταπίνεται μέσω των βλεφαρίδων που διαθέτουν τα κύτταρα του επιθηλίου για την απομάκρυνση της. Η βλέννα στη συνέχεια παγιδεύεται στο κατώτερο αναπνευστικό μαζί με πολλά ιικά σωματίδια και αντισώματα (ειδικά IgA ισότοπα), τα οποία παράγονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Στη συνέχεια τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συνδέονται με τα σωματίδια του ιού, εμποδίζοντάς τα να αλληλεπιδράσουν με τα κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου. Τα κύτταρα του κατώτερου αναπνευστικού διαθέτουν κυψελιδικά μακροφάγα, που είναι εξειδικευμένα στην φαγοκυττάρωση. Η φαγοκυττάρωση είναι μια διαδικασία καταστροφής ενός ξένου παράγοντα κατά την οποία συνδέεται με τους κυτταρικούς υποδοχείς των μακροφάγων, στη συνέχεια τα μακροφάγα περικλείουν το αντιγόνο και τέλος καταστρέφουν το φαγοκυτταρωμένο σωματίδιο (Louten, 2016).

Ο ιός Influenza προσβάλει το αναπνευστικό και μεταδίδεται μέσω μικρών και μεγάλων σταγονιδίων, καθώς και μέσω μολυσμένων αντικειμένων, εφόσον τα σωματίδια του ιού περάσουν στην αναπνευστική οδό (Kalil & Thomas, 2019; Patrozou & Mermel, 2009). Ο ιός παραμένει μολυσματικός στις επιφάνειες για έως και 48 ώρες. Κατά τον βήχα και το φτέρνισμα ενός μολυσμένου ατόμου, παράγονται σταγονίδια διαμέτρου από 0,1-100 μm . Τα πολύ μικρά σταγονίδια ($<5\mu\text{m}$), τα οποία ονομάζονται αερολύματα, παραμένουν στον αέρα για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, αφού η ταχύτητα καθίζησης τους είναι χαμηλή. Τα αερολύματα λόγω του μεγέθους τους είναι πιθανό να φτάσουν μέχρι το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα προκαλώντας νόσο. Τα μεγαλύτερα σταγονίδια φτάνουν μέχρι την τραχεία, όπου ένα μόνο μέρος τους θα διεισδύσει, ενώ τα υπόλοιπα θα αποβληθεί μέσω της αναπνοής (Tellier, 2009). Οι ιοί που μεταδίδονται μέσω μεγάλων σταγονιδίων παραμένουν στο ανώτερο αναπνευστικό, ενώ οι ιοί που μεταδίδονται μέσω μικρότερων σταγονιδίων εισχωρούν μέχρι και το κατώτερο αναπνευστικό. Προκειμένου να υπάρξει επιτυχής μόλυνση πρέπει να εισέλθει στον οργανισμό αρκετός αριθμός virions. Τα κύτταρα του ξενιστή διαθέτουν υποδοχείς στους οποίους μπορούν να συνδεθούν οι ιοί. Η συγγένεια μεταξύ του υποδοχέα των κυττάρων και του ιού ονομάζεται τροπισμός (Bouvier & Palese, 2008; Knipe & Howley, 2013; Louten, 2016).

Στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή υπάρχουν ακετυλο-νευραμινικά οξέα (σιαλικά οξέα). Τα σιαλικά οξέα είναι μονοσακχαρίτες με εννέα άτομα άνθρακα. Ο άνθρακας 2 του τελικού σιαλικού οξέος μπορεί να δεσμευτεί με τον άνθρακα-3 ή τον άνθρακα-6 της γαλακτόζης, σχηματίζοντας -2,3 ή -2,6 δεσμούς. Οι δεσμοί αυτοί διαμορφώνουν το τελικό σιαλικό οξύ, το οποίο αποτελεί υποδοχέα που αναγνωρίζει η αιμοσυγκολλητίνη του ιού (Bouvier & Palese, 2008). Στα επιθηλιακά κύτταρα της



τραχεία επικρατούν οι δεσμοί α-2,6-Gal, ενώ οι δεσμοί α-2,3-Gal βρίσκονται σε μικρότερο ποσοστό στο επιθήλιο της τραχείας, στο κατώτερο αναπνευστικό σύστημα και στα πνευμονοκύτταρα τύπου II των ανθρώπων αλλά και στο επιθήλιο του εντέρου της πάπιας. Κατά συνέπεια, οι ιοί της γρίπης των πτηνών έχουν χαμηλή μεταδοτικότητα αλλά υψηλή παθογένεια καθώς προσβάλλουν το κατώτερο αναπνευστικό (Bouvier & Palese, 2008; Wang κ.ά., 2021). Η σοβαρότητα της νόσου και η εμφάνιση συμπτωμάτων, όπως ρινική συμφόρηση, βήχας και φτέρνισμα διευκολύνουν τη μετάδοσή της νόσου (Kawaoka & Neumann, 2012; Patrozou & Mermel, 2009).



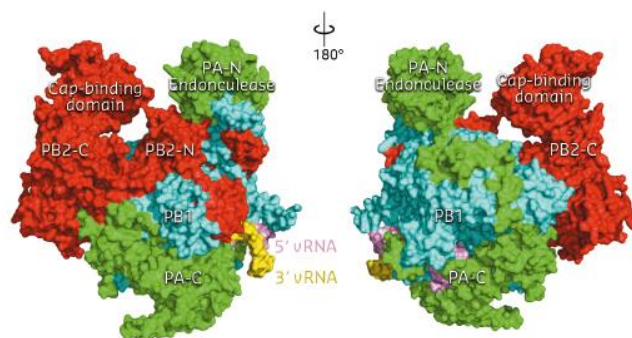
7. Αναπαραγωγή του ιού και παθογένεια

Η γρίπη μεταδίδεται μέσω σταγονιδίων ή μολυσμένων αντικειμένων, εφόσον τα ιικά σωματίδια φτάσουν στο αναπνευστικό σύστημα του ξενιστή. Ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού ξεκινά με την σύνδεση του ιικού σωματιδίου (virion) στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή. Στα αρχικά στάδια πολλαπλασιασμού του ιού, η αιμοσυγκολλητίνη προσκολλάται στις θέσεις πρόσδεσης των υποδοχέων του κυττάρου (RBS) (Koel κ.ά., 2015; Ning κ.ά., 2019; Patrozou & Mermel, 2009).

Η σύνδεση της αιμοσυγκολλητίνης και του υποδοχέα πραγματοποιείται εφόσον αυτός διαθέτει στο άκρο του τα κατάλληλα σιαλικά οξέα α2,6SA ή α2,3SA. Κατά τη διαδικασία της ένωσης του ιού με το κύτταρο γίνεται ταυτόχρονη διάσπαση πολλών πρόδρομων αιμοσυγκολλητινών HA0 σε δύο υπομονάδες, την HA1 και την HA2. Στη συνέχεια, μόλις τα σωματίδια του ιού βρεθούν στο όξινο περιβάλλον του ενδοσώματος από τη διάσπαση των αιμοσυγκολλητινών εκτίθενται τα πεπτίδια σύντηξης τους και γίνονται συγχρονισμένες δομικές αλλαγές στο ενδόσωμα του κυττάρου. Οι ταυτόχρονες μεταβολές ανοίγουν «πόροι» όπου απελευθερώνονται τα συστατικά των vRNPs στο κυτταρόπλασμα. Η αποτελεσματική αποεπένδυση των ιών της γρίπης εξαρτάται από την παρουσία της πρωτεΐνης M2. Η M2 λειτουργεί ως κανάλι ιόντων που επιτρέπει την εισροή των H⁺ από το ενδόσωμα στο σωματίδιο του ιού για την απελευθέρωση των RNPs από την πρωτεΐνη M1 στο κυτταρόπλασμα ολοκληρώνοντας τη διαδικασία της αποεπένδυσης (uncoating). Οι ιοί της γρίπης B μοιάζουν αρκετά στους ιούς γρίπης τύπου A καθώς και οι δύο αναγνωρίζουν το N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ ως υποδοχείς, ενώ οι ιοί της γρίπης C προσδένονται σε παράγωγο του O-νευραμινικό οξύ. Αν και στους ιούς A και B η σύντηξη απαιτεί χαμηλό pH στην περίπτωση του ιού της γρίπης C η σύντηξη μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε υψηλότερες τιμές pH (Kawaoka & Neumann, 2012; Knipe & Howley, 2013).

Μετά την είσοδο του ιού στο κυτταρόπλασμα ακολουθεί η αντιγραφή και η μεταγραφή του γονιδιώματός του με σκοπό την αύξηση των vRNAs και τη σύνθεση mRNAs για την έκφραση των πρωτεϊνών του ιού (Kawaoka & Neumann, 2012). Πρέπει να εκφραστεί ολόκληρο το γονιδίωμα του ιού μέσα στο μολυσμένο κύτταρο ώστε να είναι παραγωγική η λοίμωξη. Τα τμήματα του γονιδιώματος βρίσκονται με την μορφή των συμπλόκων RNPs μέσα στο κυτταρόπλασμα (Fodor & Te Velhuis, 2020). Τα RNPs αποτελούνται από την πρωτεΐνη NP που περιβάλλει το RNA και τις τρεις πρωτεΐνες της RNA-πολυμεράσης PB1, PB2 και PA οι οποίες συνδέονται στα μερικώς συμπληρωματικά άκρα του ιικού RNA, δημιουργώντας χαρακτηριστική δομή.

Το μεγάλο μέγεθος των RNPs (10-20 nm) δεν τους επιτρέπει να εισέλθουν στον πυρήνα του κυττάρου (Baudin κ.ά., 1994; Fodor & Te Velhuis, 2020), λόγω αυτού, μόλις εισέλθουν στον οργανισμό χρησιμοποιούν σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που διαθέτουν όλες οι πρωτεΐνες των RNPs, οι οποίες μεσολαβούν στην αλληλεπίδρασή τους με τον πυρηνικό μηχανισμό εισαγωγής κυττάρου (Knipe & Howley, 2013).



Εικόνα 6 Δομή του συμπλόκου RNA πολυμεράση (*Structural Insights into Viral RNA Synthesis by Influenza Polymerase, χ.χ.*)

Ακολουθεί η αντιγραφή και η μεταγραφή του γενετικού υλικού. Οι αλληλουχίες κωδικοποίησης του ιού πλαισιώνονται από τμήματα μη κωδικοποιημένων περιοχών και στα δύο άκρα τους που σχηματίζουν τους υποκινητές για τη διαδικασία της αντιγραφής και της μεταγραφής (Koutsakos κ.ά., 2016). Στον πυρήνα, η RNA-εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση II χρησιμοποιεί τμήματα vRNA αρνητικής πολικότητας σαν πρότυπο για τη σύνθεση τριών διαφορετικών RNA, το αγγελιαφόρο RNA (messenger RNA, mRNA), το μικρό ιικό RNA (small viral RNA, svRNA) και το συμπληρωματικό RNA (complementary RNA, cRNA) (Biswas κ.ά., 1998; Fodor & Te Velthuis, 2020).

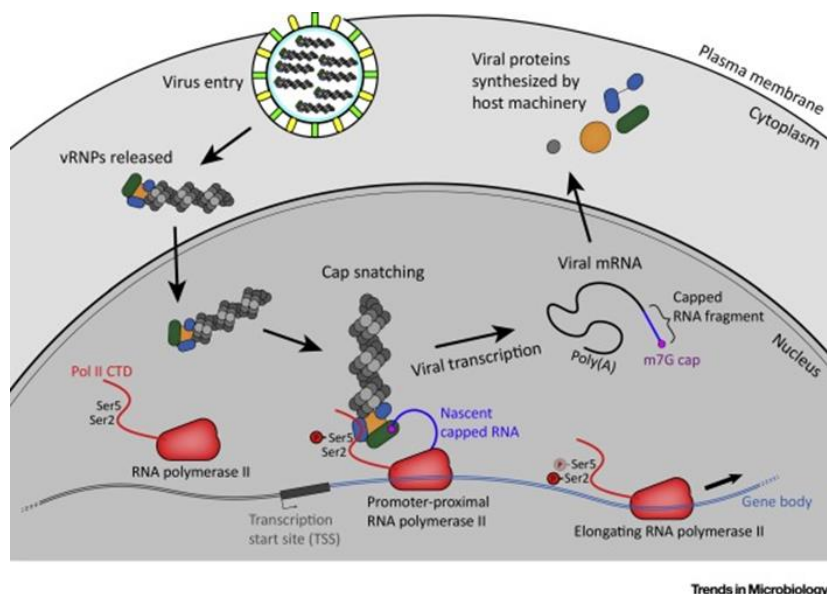
Αρχικά συντίθεται το συμπληρωματικό cRNA, ένα μόριο θετικής πολικότητας, αντίγραφο πλήρους μήκους του εισερχόμενου vRNA που λειτουργεί ως πρότυπο από το οποίο η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση μεταγράφει περισσότερα αντίγραφα γονιδιωματικού vRNA αρνητικής πολικότητας (Bouvier & Palese, 2008; Fodor & Te Velthuis, 2020; Knipe & Howley, 2013). Το svRNA είναι αρνητικής πολικότητας βρίσκονται στο 5' άκρο κάθε τμήματος ιικού RNA και πιστεύεται ότι ρυθμίζει τη μετάβαση από τη μεταγραφή στην αντιγραφή. Τα mRNAs είναι ατελή αντίγραφα των vRNAs των οποίων η σύνθεση εξαρτάται από την δράση της RNA-πολυμεράσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι για τη μεταγραφή των mRNAs απαιτείται ένας 5'-καλυμμένος εκκινητής τον οποίο κλέβει η RNA-πολυμεράση από το pre-mRNA του ξενιστή για να ξεκινήσει τη σύνθεση του δικού του mRNA. Η διαδικασία ονομάζεται cap snatching και περιλαμβάνει τη δέσμευση του καλύμματος από την υπομονάδα PB2 και τη λειτουργία της ενδονουκλεάσης της πρωτεΐνης PA, στη συνέχεια ξεκινά η μεταγραφή με τη δέσμευση του 5' άκρου του vRNA από την υπομονάδα PB1 (Kawaoka & Neumann, 2012; Knipe & Howley, 2013).

Η μεταγραφή ξεκινά με την PB2 πρωτεΐνη η οποία αναγνωρίζει και δεσμεύει το άκρο 5' του κυτταρικού mRNA στην υπομονάδα PB1 (Knipe & Howley, 2013). Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη PB1 διασπά το mRNA του κυττάρου ξενιστή ώστε να δημιουργηθούν καλυμμένοι RNA εκκινητές και μεσολαβεί στην επικόλληση των νουκλεοτιδίων (Bouvier & Palese, 2008; Honda κ.ά., 2002). Ο τερματισμός της μεταγραφής του mRNA γίνεται σε συγκεκριμένη θέση, περίπου 17-22 νουκλεοτίδια από το 5' άκρο του πρότυπου vRNA, και προστίθενται στο τελικό άκρο 3' μια πολύ(A) ακολουθία του ιικού mRNA. Όταν το ιικό mRNA καλυφθεί και πολυαδενυλιωθεί, εξάγεται από τον πυρήνα για να μεταφραστεί όπως το mRNA του ξενιστή με τη βοήθεια της πρωτεΐνης NS1 (Bouvier & Palese, 2008). Η πρωτεΐνη NS1 αναστέλλει τη διαδικασία πολυαδενυλίωσης του κυτταρικού mRNA δεσμεύοντας δύο σημαντικές για τον μηχανισμό πρωτεΐνες (την CPSF και την PABII). Η πολυαδενυλίωση του ιικού mRNA

είναι ανεξάρτητη από αυτό τον μηχανισμό, με αποτέλεσμα να εξάγεται μόνο το ιικό mRNA από τον πυρήνα. Τα mRNAs ικής προέλευσης μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα όπου τα ριβοσώματα του κυττάρου θα τα μεταφράσουν σε πρωτεΐνες του καψιδίου και πρωτεΐνες του λιπιδικού φακέλου. Τα τμήματα mRNA που εκφράζουν τις πρωτεΐνες του λιπιδικού φακέλου θα μεταφερθούν στο ενδοπλασματικό δίκτυο για να μεταφραστούν και στη συνέχεια μεταφέρονται στο σύμπλεγμα Golgi. Οι νεοσχηματιζόμενες πολυμεράσες επανεισέρχονται στον πυρήνα για να επαναλάβουν τη διαδικασία αναπαραγωγής και να σχηματίσουν τα σύμπλοκα vRNPs (Honda κ.ά., 2002). Ο υποκινητής των mRNAs είναι συμπληρωματικών των υποκινητών των cRNAs (Biswas κ.ά., 1998; Knipe & Howley, 2013).

Η αντιγραφή των τμημάτων RNA γίνεται με τη βοήθεια του ενδιάμεσου προϊόντος, του cRNA. Η σύνθεσή του δεν εξαρτάται από τους εκκινητές και το τελικό προϊόν είναι ένα πλήρες αντίγραφο του vRNA, συνεπώς δεν τερματίζεται πρόωρα και δεν είναι πολυαδενυλιωμένο όπως το mRNA (Knipe & Howley, 2013). Η εναλλαγή από τη διαδικασία μεταγραφής στη διαδικασία αντιγραφής ελέγχεται από την πρωτεΐνη PA (Honda κ.ά., 2002).

Μετά την αντιγραφή του ιού γίνεται η συναρμολόγηση των RNPs με τις νεοσυντιθέμενες ικές πρωτεΐνες στον πυρήνα του κυττάρου και στη συνέχεια εξάγονται στο κυτταρόπλασμα. Η καθυστερημένη έκφραση της M1 εξασφαλίζει ότι η εξαγωγή του RNP λαμβάνει χώρα μόνο αφού έχει ολοκληρωθεί ένας πλήρης γύρος αντιγραφής και αποτρέπει την πρόωρη έξοδο του από το πυρήνα. Έπειτα, η NEP/NS2 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα εξαγωγής Crm1 και σχηματίζει ένα σύμπλεγμα RNP-M1-NEP/NS2 εξάγοντας το RNP μέσω νουκλεοπορινών στο κυτταρόπλασμα (Bouvier & Palese, 2008; Knipe & Howley, 2013). Η συναρμολόγηση του ιού γίνεται στην κυτταρική μεμβράνη όπου τα RNPs συναντούν τις πρωτεΐνες του λιπιδικού φακέλου και ακολουθεί η εκβλάστηση από το κύτταρο. Η εκβλάστηση των virions γίνεται μέσω της νευραμινιδάσης, η οποία καταστρέφει τους υποδοχείς σιαλικών οξέων (Kawaoka & Neumann, 2012).



Εικόνα 7 Στάδια αναπαραγωγής του ιού (Walker & Fodor, 2019)



Τα μέλη της οικογένειας Orthomyxovirus διαθέτουν μηχανισμούς που αυξάνουν την κωδικοποιητική ικανότητα των γονιδιωμάτων τους, όπως την εναλλακτική ωρίμανση. Στη διαδικασία αυτή τα τμήματα γονιδιώματος κωδικοποιούν πρωτεΐνες τόσο από ώριμο όσο και από mRNA που δεν έχει περάσει από τη διαδικασία της ωρίμανσης. Τα τμήματα που έχουν αυτή τη λειτουργία για τον ιό τύπου A είναι τα τμήματα 7 και 8, για τον ιό τύπου B είναι το τμήμα 8 και για τον ιό τύπου C τα τμήματα 6 και 7 (Knipe & Howley, 2013). Η έκφραση του γονιδιώματος ελέγχεται στο επίπεδο της μετάφρασης με πολυάριθμους μηχανισμούς. Ο σκοπός της επιλεκτικής μετάφρασης είναι η προώθηση της μετάφρασης των ιικών γονιδίων και η καταστολή πρωτεϊνοσύνθεσης του ξενιστή. Οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν:

- 1) Την αποικοδόμηση των προ-mRNA του ξενιστή μετά από διάσπαση
- 2) Την αναστολή της επεξεργασίας του mRNA του ξενιστή
- 3) Την αποικοδόμηση της κυτταρικής RNA πολυμεράσης II και
- 4) Την προτιμησιακή μετάφραση των του ιικού mRNA.

Η σύνθεση των ιικών πρωτεϊνών γίνεται σε διαφορετικό χρόνο, ανάλογα με το ρόλο που έχει η κάθε πρωτεΐνη στον κύκλο αναπαραγωγής του ιού. Η σύνθεση των πρωτεϊνών NP και NS1 πραγματοποιείται στα πρώιμα στάδια ενώ η σύνθεση των πρωτεϊνών HA,NA και M1 καθυστερεί. Οι πρωτεΐνες του λιπιδικού φακέλου HA,NA και M2 συντίθενται στα ριβοσώματα που συνδέονται με τη μεμβράνη στο ενδοπλασματικό δίκτυο, και μεταφέρονται στο σύστημα Golgi για τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Οι τρεις πρωτεΐνες διαθέτουν σήματα που τις μεταφέρουν στην κυτταρική μεμβράνη για τη σύνθεση των virions. Η πρωτεΐνη M1 θεωρείται ότι φέρνει σε επαφή το σύμπλοκο RNP-NEP με τις πρωτεΐνες HA,NA και M2 για τη συναρμολόγηση του ιού που λαμβάνει χώρα στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή (Bouvier & Palese, 2008).

Η εκβλάστηση του ιού λαμβάνει χώρα στην κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή, πιθανώς με τη συσσώρευση της πρωτεΐνης M1 στην κυτταροπλασματική πλευρά της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Οι πρωτεΐνες HA δεσμεύουν τα ιικά σωματίδια στα σιαλικά οξέα της κυτταρικής επιφάνειας έως ότου τα σωματίδια του ιού απελευθερωθούν από τη δραστικότητα της σιαλιδάσης της NA (Bouvier & Palese, 2008).

Ο πολλαπλασιασμός του ιού γίνεται στα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού ξεκινώντας από τη στιγμή εισόδου του ιού και κορυφώνεται 48 ώρες μετά. Κατά τη διάρκεια της νόσου παρατηρείται οξεία διάχυτη φλεγμονή του λάρυγγα, της τραχείας και των βρόγχων, με φλεγμονή του βλεννογόνου και οίδημα (Knipe & Howley, 2013). Η συμπτωματολογία οφείλεται σε τραυματισμό της αναπνευστικής οδού και των πνευμόνων που προκαλείται από τη λοιμογόνο δράση του ιού σε συνδυασμό με την ανοσολογική απόκριση που ενεργοποιείται για την αντιμετώπιση της εξάπλωσής του (Boktor & Hafner, 2023; Kalil & Thomas, 2019). Η ιογενής λοίμωξη ακολουθείται από έκκριση ιντερφερονών, οι οποίες παράγουν αντιικούς παράγοντες (Fukuyama & Kawaoaka, 2011). Από τη τρίτη έως τη πέμπτη ημέρα μετά την έναρξη της νόσου ξεκινά η αναγέννηση της κυτταρικής στοιβάδας του επιθηλίου. Κατά τη διάρκεια της, οι επανορθωτικές και καταστροφικές διαδικασίες μπορεί να διενεργούνται ταυτόχρονα. Η πλήρης epούλωση της επιθηλιακής βλάβης μπορεί να διαρκέσει έως και 1 μήνα (Knipe & Howley, 2013).



Η μόλυνση μπορεί να φτάσει στις κυψελίδες και να καταστρέψει τους βασικούς μεσολαβητές ανταλλαγής αερίων. Σε αυτή την περίπτωση, η αδυναμία του πνεύμονα να εκτελέσει τον βασικό του ρόλο οφείλεται σε απόφραξη των αεραγωγών, απώλεια της κυψελιδικής δομής, απώλεια της στοιβάδας του πνευμονικού επιθηλίου και την αποδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας που διατηρεί τη δομή του πνεύμονα (Kalil & Thomas, 2019). Επιπλοκές μπορούν να αναπτυχθούν σε διάστημα 48 ωρών από την εμφάνιση των συμπτωμάτων και περιλαμβάνουν πρωτοπαθή και δευτεροπαθή πνευμονία, αιμοραγική βρογχίτιδα, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS), εμφάνιση μυοκαρδιακής νόσου και μπορεί να επιφέρουν θάνατο. Τα παχύσαρκα άτομα είναι επιρρεπή στην εμφάνιση σοβαρής νόσου, καθώς η παχυσαρκία συνδέεται με αυξημένη φλεγμονή και μειωμένη ικανότητα επούλωσης. Επιπλέον, εξασθενεί ορισμένα χαρακτηριστικά της ανοσίας καθυστερώντας την ιική κάθαρση ή αυξάνοντας την ευαισθησία στην αρχική λοίμωξη (Kalil & Thomas, 2019). Οι εγκυμονούσες ειδικά κατά το τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, οι ηλικιωμένοι και άτομα με αναπνευστικά και καρδιακά προβλήματα είναι επίσης πιθανό να εμφανίζουν επιπλοκές από τον ιό και να εισαχθούν σε μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) (Labella & Merel, 2013).



8. Συμπτώματα

Η λοίμωξη από τον ιό της γρίπης προκαλεί βήχα, υψηλό πυρετό που κυμαίνεται από 38 έως 40, ανορεξία, έντονο και διάχυτο πονοκέφαλο, μυαλγία, συνάχι και ερεθισμό και ξηρότητα στο λαιμό (Fachada κ.ά., 2009; Kawaoka & Neumann, 2012). Η περίοδος επώασης κυμαίνεται συνήθως από 1 έως 4 ημέρες και η συμπτωματική περίοδος διαρκεί 3-4 ημέρες με τη νόσο να είναι αυτοπεριοριζόμενη στα υγιή άτομα (Kawaoka & Neumann, 2012). Η αποβολή του ιού μέσω σταγονιδίων προηγείται της εμφάνισης της ασθένειας κατά μια μέρα και κορυφώνεται τη δεύτερη μέρα των συμπτωμάτων (Patrozu & Mermel, 2009). Η έκβαση της νόσου εξαρτάται από τις ιδιότητες του ιού, την πιθανή προϋπάρχουσα ανοσία και την κατάσταση της υγείας του ασθενούς.

8.1. Πρωτοπαθής και δευτεροπαθής πνευμονία

Ο ιός της γρίπης τύπου Α είναι η κυρίαρχη ιογενής αιτιολογία για την πρόκληση του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) στους ενήλικες. Οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με το ARDS είναι η ηλικία μεταξύ 36 και 55 ετών, η εγκυμοσύνη και η παχυσαρκία (Kalil & Thomas, 2019). Επιπλέον, το ARDS προκαλεί αύξηση του ποσοστού θνητότητας στους ασθενείς με γρίπη των πτηνών (Danilenko κ.ά., 2021). Ο ιός A/H3N2 έχει συσχετισθεί με πρωτοφανή υψηλά ποσοστά εισαγωγής σε μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) (Kalil & Thomas, 2019).

Ο ιός της γρίπης απενεργοποιεί την κυτταρική πρωτεϊνική σύνθεση και προκαλεί την απόπτωση ως πρόσθετο μηχανισμό καταστροφής των κυττάρων. Η λοίμωξη από τον ιό HPAI/H5N1 μπορεί να προκαλέσει αιμοφαγοκυτταρικό σύνδρομο, νεφρική σωληναριακή νέκρωση, λεμφοειδή εξάντληση και διάχυτη κυψελιδική βλάβη. Ομοίως, η λοίμωξη από τον ιό A/H1N1pdm09 οδηγεί σε διάχυτη κυψελιδική βλάβη, αιμορραγική πνευμονίτιδα και περιβρογχιολικές και περιαγγειακές λεμφοκυτταρικές διηθήσεις (Knipe & Howley, 2013).

Η πρωτοπαθής πνευμονία ως επιπλοκή της νόσου περιγράφηκε για πρώτη φορά σε θανατηφόρο περιστατικό που προκλήθηκε το 1957 από την ασιατική γρίπη A/H2N2 (Knipe & Howley, 2013). Προκαλείται από τον ίδιο τον ιό και εμφανίζεται κυρίως σε άτομα που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου (π.χ. ηλικιωμένοι, ασθενείς με καρδιοαναπνευστικά προβλήματα, ανοσοκατεσταλμένους και εγκυμονούσες). Τα συμπτώματα αναπτύσσονται απότομα μετά την έναρξη της νόσου και εξελίσσονται εντός 6 έως 24 ωρών σε σοβαρή πνευμονία με συνεχή επιδείνωση (Kalil & Thomas, 2019; Knipe & Howley, 2013). Στην ιογενή πνευμονία, παρατηρείται ταχυκαρδία, ταχύς ρυθμός αναπνοής, υπόταση, έντονη υπεραιμία και διεύρυνση των κυψελιδικών τοιχωμάτων, με παρουσία μονοπύρηνων, εισροή λευκοκυττάρων, διαστολή και θρόμβωση των τριχοειδών αγγείων (Knipe & Howley, 2013). Το ανοσοποιητικό περιβάλλον των πνευμόνων μεταβάλλεται σημαντικά μετά τη μόλυνση από τον ιό της γρίπης, με πρόιμη εξάντληση των κυψελιδικών μακροφάγων. Αυτά τα κύτταρα κατέχουν βασικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση σε πολλές βακτηριακές λοιμώξεις και η απώλειά τους μπορεί να προκαλέσει την αύξηση της ευαισθησίας του οργανισμού (Kalil & Thomas, 2019). Η διάγνωση γίνεται με φυσική εξέταση και με ακτινογραφία



θώρακος. Στην πρωτοπαθή πνευμονία η αγωγή είναι κυρίως υποστηρικτική (*Pneumonia | Description, Causes, Symptoms, & Treatment | Britannica, 2023*). Σε μη θανατηφόρες περιπτώσεις η αποκατάσταση του αναπνευστικού συστήματος ξεκινά 5 έως και 16 ημέρες μετά την έναρξη της πνευμονίας και μπορεί να διαρκέσει έως και 4 μήνες (Knipe & Howley, 2013).

Η δευτεροπαθή πνευμονία παρουσιάζεται μετά από την ιογενή λοίμωξη, 1-3 εβδομάδες ή και λίγες μέρες μετά και εμφανίζεται ως υποτροπή. Οφείλεται σε ευκαιριακή δευτερογενή βακτηριακή λοίμωξη, συνηθέστερα από *S.aureus* και *S. Pneumoniae* και το ποσοστό θνητότητας κυμαίνεται από 10% έως και 12%. Συλλοίμωξη με γρίπη και *S. Aureus* μπορεί να έχει ποσοστό θνητότητας έως και 42% (Kalil & Thomas, 2019). Η στρεπτοκοκκική πνευμονία που προκαλείται από το βακτήριο *Streptococcus pneumoniae* είναι η πιο συχνή, ειδικά στους ασθενείς που νοσηλεύονται. Τα βακτήρια ζουν στα σώματα των υγιών ανθρώπων και γίνονται παθογόνα όταν πέφτει η άμυνα του οργανισμού. Η λοίμωξη από τον ιό της γρίπης προκαλεί αυξημένη έκκριση υγρών στην αναπνευστική οδό, παρέχοντας ένα περιβάλλον στο οποίο τα βακτήρια γίνονται παθογόνα (*Pneumonia | Description, Causes, Symptoms, & Treatment | Britannica, 2023*). Τα συμπτώματα εμφανίζονται κατά την ανάρρωση από μια τυπική γρίπη με ρίγη, πλευριτικό πόνο στο στήθος και αύξηση του βήχα με παραγωγή αιματηρών πτυέλων. Οι πόνοι στο στήθος οφείλονται στην ευαισθησία της τραχείας και των μυών από τον έντονο βήχα, που είναι και το κύριο σύμπτωμα (*Pneumonia | Description, Causes, Symptoms, & Treatment | Britannica, 2023*).

Δεν υπάρχει αποτελεσματική διάκριση μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς πνευμονίας και η διάγνωση εξαρτάται στην ανίχνευση βακτηρίων στα πτύελα, σε υγρά που λαμβάνονται κατά την βρογχοσκόπηση ή στο πλευριτικό υγρό (Knipe & Howley, 2013). Η θεραπεία γίνεται με αντιβιοτικά και η ανάρρωση επέρχεται λίγες εβδομάδες μετά. Σε περιπτώσεις παιδιών και ηλικιωμένων ωστόσο, η ασθένεια μπορεί να είναι θανατηφόρα. Ο θάνατος από βακτηριακή πνευμονία προκαλείται από φλεγμονή και εκτεταμένη αιμορραγία στους πνεύμονες που έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της αναπνοής (*Pneumonia | Description, Causes, Symptoms, & Treatment | Britannica, 2023*).

Οι ιογενείς λοιμώξεις είναι υπεύθυνες για το 1/3 όλων των περιπτώσεων πνευμονιών που προκαλούνται στην κοινότητα και αυτές που παρουσιάζεται ταυτόχρονα με βακτηριακή πνευμονία συμβαίνει με συχνότητα 30-50% τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά (Kalil & Thomas, 2019). Περίπου το 30-40% των νοσηλευόμενων με εργαστηριακά επιβεβαιωμένη γρίπη διαγιγνώσκονται με οξεία πνευμονία, πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή (Kalil & Thomas, 2019). Το 2009 με το στέλεχος A/H1N1pdm09 ήταν συχνή η βακτηριακή συλλοίμωξη, ιδιαίτερα σε θανατηφόρες περιπτώσεις (Knipe & Howley, 2013).



9. Αντιγονική μετατροπή και αντιγονική παρέκκλιση

Οι ιοί της γρίπης διαθέτουν δύο κύριους μηχανισμούς ώστε να ξεφεύγουν της ανοσολογικής απόκρισης, είτε φυσική, είτε προερχόμενη από εμβολιασμό (Fachada κ.ά., 2009; Mosterín Hörring κ.ά., 2016). Οι μηχανισμοί αυτοί είναι η αντιγονική παρέκκλιση (antigenic drift) και η αντιγονική μετατροπή (antigenic shift). Οι μεταλλάξεις είναι χαρακτηριστικές του ιού της γρίπης τύπου Α, ο οποίος είναι ένας γενετικά ασταθής ιός με υψηλά ποσοστά μεταλλάξεων (Boktor & Hafner, 2023).

Ο μηχανισμός antigenic drift συμβαίνει όταν πραγματοποιούνται μικρές σημειακές αλλαγές του γονιδιώματος. Πολλές από τις μεταλλάξεις οδηγούν σε μη βιώσιμα virions ή σε ασήμαντες αλλαγές στις πρωτεΐνες και στο γονιδίωμα. Κάποιες από τις αλλαγές αυτές συμβαίνουν στις περιοχές έκφρασης των αιμοσυγκολλητινών (HA) και των νευραμινιδασών (NA) με αποτέλεσμα να αλλάζει ο υπότυπο του ιού. Οι ιοί που περιέχουν τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες μεταδίδονται ευκολότερα, καθώς οι ξενιστές δεν αναγνωρίζουν τους εν λόγω ιούς. Το antigenic drift του ιού της γρίπης στον άνθρωπο οδηγεί στην αντικατάσταση παλαιότερων ιών από νέες μεταλλάξεις (Hutchinson, 2018). Η αντιγονική παρέκκλιση είναι υπεύθυνη για τις ετήσιες επιδημίες, οι οποίες επηρεάζουν το 10-20% του πληθυσμού και μπορεί να προκαλέσουν επιπλοκές στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Επίσης, είναι υπεύθυνες για πρόκληση αναπνευστικής νόσου στους μαθητές και σε οίκους ευγηρίας. Εκτιμάται ότι 650.000 θάνατοι παγκοσμίως αποδίδονται σε ιούς της γρίπης ετησίως (Kawaoka & Neumann, 2012; Koel κ.ά., 2015).

Ο δεύτερος μηχανισμός μετάλλαξης προκαλείται από ανταλλαγή τμημάτων RNA μεταξύ ιών και έχει αναφερθεί ότι εμφανίζεται μεταξύ γένους ή τύπου αλλά όχι σε όλους τους τύπους (Bouvier & Palese, 2008). Ονομάζεται αντιγονική μετατροπή (antigenic shift) και συμβαίνει όταν δύο ιοί μολύνουν ταυτόχρονα τον ίδιο ξενιστή. Η μετάλλαξη αφορά την πλήρη ανταλλαγή γονιδίων των HA και NA και ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός νέου ιού, που αποτελείται από τα επιμέρους τμήματα γονιδιώματος των άλλων δύο ιών (Bouvier & Palese, 2008; Fachada κ.ά., 2009). Η αντιγονική μετατροπή συμβαίνει σε μη καθορισμένο χρονικό διάστημα και είναι η κύρια αιτία πανδημιών. Ο μηχανισμός antigenic shift συμβαίνει μόνο μεταξύ των ιών γρίπης τύπου Α καθώς πολλά ζώα αποτελούν τον κύριο ξενιστή τους, άρα και πηγές διαφορετικών αντιγονικών ιών (Fachada κ.ά., 2009). Στους ανθρώπους το antigenic shift οδηγεί στην μετάδοση ιού στον οποίο η κοινότητα δεν έχει ανοσία άρα υπάρχει και γρήγορη μετάδοση προκαλώντας πανδημία. Η ανοσία του πληθυσμού στο πανδημικό στέλεχος χτίζεται με το πέρασμα του χρόνου, η μετάδοση μειώνεται και η εποχικότητα επανέρχεται. Οι ιοί που υπάρχουν στον άνθρωπο σήμερα προέρχονται από προηγούμενα στελέχη πανδημίας που έχουν εξελιχθεί μέσω της μετάδοσής τους στους ανθρώπους (Hutchinson, 2018).



10.Εργαστηριακή διάγνωση

Η έγκαιρη διάγνωση του ιού της γρίπης είναι ζωτικής σημασίας για την κλινική διαχείριση, την ελαχιστοποίηση της επιβάρυνσης από τη νόσο, τον έλεγχο των λοιμώξεων και τις δράσεις δημόσιας υγείας. Οι διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ιού περιλαμβάνουν την καλλιέργεια του ιού, την ταχεία ανίχνευση ιικού αντιγόνου (RIDTs), τη δοκιμασία ανοσοφθορισμού, την ορολογική ανίχνευση αντισωμάτων και τη μοριακή ανίχνευση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction).

10.1. Καλλιέργεια του ιού

Η καλλιέργεια του ιού της γρίπης πραγματοποιείται σε εξειδικευμένα εργαστήρια και χρησιμοποιούνται ρινοφαρυγγικά δείγματα, δείγματα πτυέλων και ενδοτραχειακές αναρροφήσεις. Δείγματα που έχουν στεγνώσει δεν είναι κατάλληλα για απομόνωση του ιού της γρίπης. Τα αποτελέσματα δεν είναι έγκαιρα ώστε να χρησιμοποιηθούν για την ενημέρωση της κλινικής εικόνας. Συγκεκριμένα, η καλλιέργεια ιστών από κέλφος μπορεί να χρειαστεί 1-3 ημέρες, ενώ τα αποτελέσματα της παραδοσιακής καλλιέργειας ιών από ιστούς κυττάρων χρειάζονται 3-10 ημέρες. Ωστόσο, η καλλιέργεια ιών επιτρέπει την εκτεταμένη διερεύνηση του αντιγονικού και γενετικού χαρακτήρα του ιού, την παρακολούθηση ευαισθησίας στα αντιικά φάρμακα και την παρακολούθηση της αντιγονικής παρέκκλισης. Η μέθοδος είναι απαραίτητη για την επιτήρηση και τον αντιγονικό χαρακτηρισμό των νέων στελεχών του ιού της εποχικής γρίπης A και B που μπορεί να χρειαστεί να συμπεριληφθούν στο εμβόλιο της γρίπης του επόμενου έτους(Javanian κ.ά., 2021; *Overview of Influenza Testing Methods* | CDC, 2023).

10.2. Ταχεία ανίχνευση ιικού αντιγόνου

Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει τα κυκλοφορούντα στελέχη του ιού και είναι ιδιαίτερα γρήγορη με αποτελέσματα εντός 10-15 λεπτών (**Εικόνα 8**). Ανιχνεύει και διαφοροποιεί τα κρούσματα του ιού τύπου A από τα κρούσματα του ιού τύπου B αλλά δε διευκρινίζει τον υπότυπο στην περίπτωση του ιού A. Στα περισσότερα RIDTs χρησιμοποιείται η μέθοδος της ανοσοχρωματογραφίας, κατά την οποία χρησιμοποιούνται αντισώματα για την ανίχνευση του αντιγόνου της γρίπης A ή B. Στη μέθοδο χρησιμοποιείται ρινικό δείγμα το οποίο λαμβάνεται κοντά στην περίοδο έναρξης των συμπτωμάτων (λιγότερο από 4 μέρες μετά την έναρξη της νόσου) (*Rapid Influenza Diagnostic Tests* | CDC, 2023). Στα πολύ μικρά παιδιά, οι ιοί της γρίπης μπορεί να αποβάλλονται για μεγαλύτερο διάστημα, με αποτέλεσμα η εξέταση να εξακολουθεί να ανιχνεύει τους ιούς για λίγες ημέρες μετά την περίοδο της νόσου. Τα ανοσοκατασταλμένα άτομα μπορεί να έχουν ανιχνεύσιμους ιούς γρίπης σε αναπνευστικά δείγματα για παρατεταμένες περιόδους (εβδομάδες έως μήνες) (*Rapid Diagnostic Testing for Influenza*, 2023). Τα



πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η ευκολία στη χρήση και τα γρήγορα αποτελέσματα που παρέχει. Ωστόσο, τα RIDTs εμφανίζουν χαμηλή ευαισθησία με ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε περιόδους υψηλής δραστηριότητας της γρίπης. Η ευαισθησία μειώνεται περισσότερο στην περίπτωση ανίχνευσης του αντιγόνου της γρίπης Β και αν και η ειδικότητα είναι υψηλή, μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα, ιδίως σε περιόδους όπου η δραστηριότητα της γρίπης είναι χαμηλή (*Rapid Diagnostic Testing for Influenza*, 2023).



Εικόνα 8 Μέθοδος ταχείας ανίχνευσης ιικού αντιγόνου (ertnews.gr, 2023)



10.3. Δοκιμασία ανοσοφθορισμού

Η δοκιμασία ανοσοφθορισμού μπορεί να είναι άμεση (DFA) ή έμμεση (IFA) όπου γίνεται ανίχνευση του αντιγόνου και διάκριση της γρίπης Α από τη γρίπη Β αλλά η τυποποίηση του ιού είναι περιορισμένη. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται μικροσκόπιο φθορισμού, τα αποτελέσματα δίνονται εντός 2-4 ωρών, ενώ η ερμηνεία και η αξιολόγηση τους είναι δύσκολη και απαιτεί εμπειρία (*Influenza Signs and Symptoms and the Role of Laboratory Diagnostics* | CDC, 2021; *Overview of Influenza Testing Methods* | CDC, 2023). Ο ανοσοφθορισμός έχει μέτρια ευαισθησία και υψηλή ειδικότητα, παρέχει όμως καλύτερα αποτελέσματα από τη μέθοδο ταχείας ανίχνευσης. Ωστόσο, ο εξειδικευμένος εξοπλισμός και η δυσκολία στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων καθιστά τη μέθοδο ακατάλληλη για την έγκαιρη διάγνωση της κλινικής εικόνας (*Overview of Influenza Testing Methods* | CDC, 2023).

10.4. Ορολογική ανίχνευση

Η μέθοδος αυτή δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη για την ανίχνευση του ιού της γρίπης καθώς δεν παρέχει έγκαιρη διάγνωση της οξείας λοίμωξης. Στην ορολογική ανίχνευση χρησιμοποιείται δείγμα αίματος και αξιολογείται η σημαντική αύξηση των τίτλων αντισωμάτων μεταξύ των ορών της οξείας φάσης και της φάσης της ανάρρωσης. Ωστόσο, οι ορολογικές μέθοδοι, όπως η εξουδετέρωση του ιού και η αναστολή της αιμοσυγκόλλησης, αποτελούν θεμελιώδη εργαλεία σε επιδημιολογικές και ανοσολογικές μελέτες, καθώς και στην αξιολόγηση της ανοσογονικότητας των εμβολίων (*Overview of Influenza Testing Methods* | CDC, 2023).

10.5. Μοριακή ανίχνευση

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή (RT-qPCR) είναι μια μέθοδος ανίχνευσης του RNA του ιού της γρίπης σε δείγματα του αναπνευστικού και μαζί με την καλλιέργεια προσφέρει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (*Overview of Influenza Testing Methods* | CDC, 2023). Η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει ελάχιστες ποσότητες νουκλεϊκών οξέων από πολυάριθμες πηγές σε συνδυασμό με την απλότητα και την ταχύτητα της την καθιστά μια από τις πρώτες επιλογές στην κλινική διάγνωση (Bustin κ.ά., 2009).

Στην RT-qPCR, αφού απομονωθεί το RNA του ιού από το δείγμα, χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές (primers) οι οποίοι αναγνωρίζουν και προσδένονται στην αλληλουχία-στόχο του γονιδιώματος. Στη συνέχεια συνδέεται το ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase- RT) και συνθέτει ένα συμπληρωματικό μόριο DNA (complementary DNA- cDNA). Απομακρύνεται το RNA και προσδένεται δεύτερος primer στο άλλο άκρο του cDNA. Έπειτα το ένζυμο Taq πολυμεράση συνθέτει έναν δεύτερο κλώνο, δημιουργώντας ένα μόριο DNA διπλής έλικας που είναι αντίγραφο της



αλληλουχίας-στόχου του RNA του ιού. Το μόριο αυτό στη συνέχεια υποβάλλεται σε διαδοχικούς κύκλους ενίσχυσης, κατά τη διάρκεια των οποίων το DNA διαχωρίζεται και μετουσιώνεται σε μονόκλωνα τμήματα όπου δεσμεύονται οι δύο εκκινητές. Στις αλληλουχίες-στόχους η Taq πολυμεράση επεκτείνει και συνθέτει ένα νέο μόριο DNA μέχρι το πέρας της PCR. Ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδιώματος διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε 30-45 κύκλους.

Η προσθήκη ενός ανιχνευτή (probe) με φθορίζουσα χρωστική επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των τμημάτων DNA που ανιχνεύτηκαν. Το σήμα της φθορίζουσας παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο και με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού γίνεται η ποσοτική ανάλυση. Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της αύξησης του φθορισμού, ο οποίος είναι ανάλογος με την αρχική ποσότητα DNA που παράγεται σε κάθε κύκλο PCR. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των αρχικών αντιγράφων, τόσο νωρίτερα εμφανίζεται αύξηση του φθορισμού. Κατά τη διάρκεια της PCR συνεχώς αυξανόμενες ποσότητες χρωστικής δεσμεύονται στο εκκολαπτόμενο DNA διπλής έλικας (dsDNA). Στη μέθοδο χρησιμοποιούνται ανιχνευτές φθορισμού για συγκεκριμένες αλληλουχίες και το φθορίζον σήμα εμφανίζεται μόνο αν ο ανιχνευτής υβριδοποιηθεί με το συμπληρωματικό του στόχου (Bustin & Mueller, 2005; Nolan κ.ά., 2006).

Η χρήση ανιχνευτών σημασμένων με διαφορετικές χρωστικές, επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών στόχων σε μια μόνο αντίδραση και ονομάζεται multiplex RT-PCR. Οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονται μεμονωμένα από τον κύκλο κατωφλίου τους (threshold cycle-Ct). Το Ct είναι ο αριθμός των κύκλων PCR όπου εμφανίστηκε για πρώτη φορά το σήμα της φθορίζουσας χρωστικής ξεπερνώντας το ελάχιστο ανιχνεύσιμο όριο. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου στο αρχικό υλικό τόσο χαμηλότερο είναι το Ct (Nolan κ.ά., 2006). Στην multiplex RT-PCR οι εκκινητές σημαίνονται στο 5' άκρο τους με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές και ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται είτε σε σχέση με μια εξωτερική πρότυπη καμπύλη είτε σε σχέση με ένα ή περισσότερα εσωτερικά mRNAs ελέγχου. Στην πρώτη περίπτωση γίνεται μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων ενός εξωτερικού προτύπου και δημιουργία πρότυπης καμπύλης έναντι του αρχικού αριθμού αντιγράφων στόχου. Στη δεύτερη περίπτωση γίνεται σύγκριση των τιμών Ct από τα RNA-στόχους με εκείνες των εσωτερικών προτύπων και εκφράζονται ως αναλογίες του ειδικού για τον στόχο σήματος προς το εσωτερικό σημείο αναφοράς. Την απόδοση της μεθόδου επηρεάζει η ποιότητα του δείγματος, ο τρόπος που έχει ληφθεί και σε ποιες συνθήκες έχει συντηρηθεί. Η ύπαρξη αναστολέων σε αυτό (π.χ. σωματικά υγρά) και η απομόνωση του RNA (extraction) μπορούν επίσης να καθορίσουν την απόδοση της μεθόδου (Bustin & Mueller, 2005). Βασικές προϋποθέσεις για την εγκυρότητα της μεθόδου είναι

- Η ορθή λήψη και προετοιμασία του δείγματος
- Η σωστή επιλογή των εκκινητών, ιδίως του εκκινητή της αντίστροφης μεταγραφής το οποίο επηρεάζει την ευαισθησία της RT-PCR
- Στους RNA-ιού πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι διαφορετικοί ορότυποι του κάθε ιού
- Απαιτείται τακτική βαθμονόμηση του οργάνου.
- Πάντα υπάρχει ένας αρνητικός και ένας θετικός μάρτυρας, ο οποίος δίνει αποτέλεσμα με τη μορφή της πρότυπης καμπύλης (Bustin κ.ά., 2009; Bustin & Mueller, 2005)



Τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα σε περίπου 45 λεπτά έως και κάποιες ώρες ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται. Η RT-qPCR εξασφαλίζει την ταυτοποίηση του ιού της γρίπης ακόμη και απουσία μολυσματικών σωματιδίων (Karakus κ.ά., 2018).

Η μοριακή διάγνωση του ιού της γρίπης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται τόσο για την κλινική διάγνωση όσο και για την επιδημιολογική επιτήρηση, την έρευνα και τον εντοπισμό σε διάφορα δείγματα κλινικά ή περιβαλλοντικά. Τα κλινικά δείγματα που εξετάζονται προέρχονται από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και λαμβάνονται είτε από τα ρουθούνια (ρινικό επίχρισμα) είτε από τον λαιμό (στοματοφαρυγγικό επίχρισμα). Η ρινοφαρυγγική αναρρόφηση και η βρογχική αναρρόφηση είναι επίσης χρήσιμες (WHO, 2020).

Η PCR αντίστροφης μεταγραφής ανιχνεύει συγκεκριμένα γονίδια του ιού. Οι γενετικές αλληλουχίες διαφέρουν μεταξύ των τύπων και υπότυπων του ιού της γρίπης, επομένως σχεδιάστηκαν εκκινητές και ανιχνευτές που να αναζητούν αλληλουχίες μοναδικές για κάθε στόχο. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μήτρας M1 είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των ιών της γρίπης, άρα και χρήσιμος στόχος για την ανίχνευση και διαφοροποίηση των γρίπης τύπου Α από τους υπόλοιπους τύπους. Επιπλέον, επειδή τα γονίδια που εκφράζουν τις αιμοσυγκολλητίνες είναι μοναδικά για κάθε υπότυπο της γρίπης Α, η δημιουργία εκκινητών που ενισχύουν αυτά τα γονίδια προσδιορίζουν τον υπότυπο του ιού που εξετάζεται. Αντίστοιχα, για τον ιό τύπου Β, το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NP είναι σχετικά συντηρημένο και επιτρέπει την ανίχνευση και των δύο γενεαλογικών σειρών του (*Manual for the Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza*, χ.χ.).



11.Επιδημιολογία

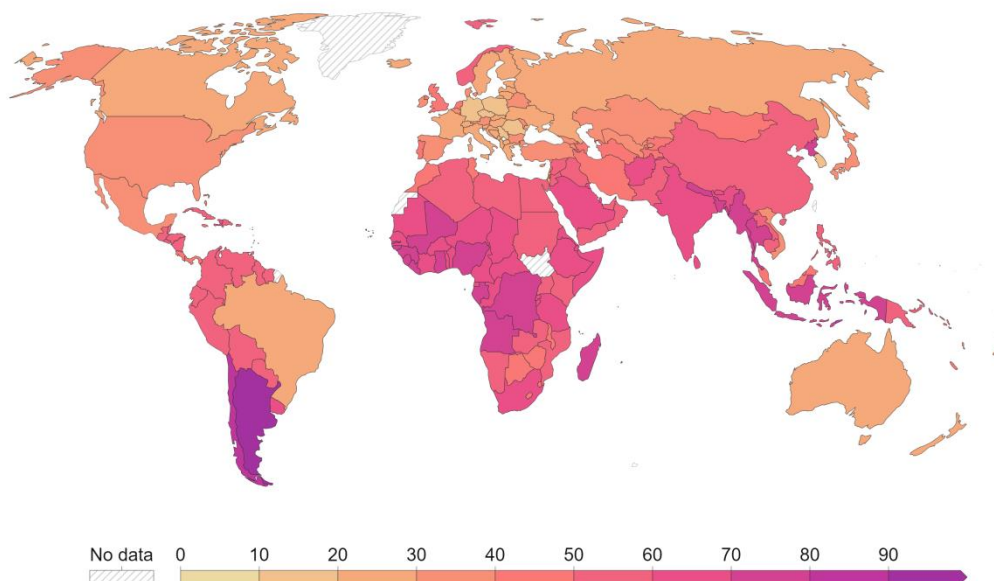
Ο ιός της γρίπης προκαλεί εποχικές εξάρσεις σε επίπεδο επιδημίας κάθε χρόνο. Η εποχικότητά της διαφέρει από χώρα σε χώρα καθώς η μετάδοση του ιού ευνοείται από το ψυχρό και υγρό κλίμα του χειμώνα με τις στενές κοινωνικές επαφές σε κλειστούς χώρους να είναι πιο κοινές. Στο Βόρειο Ημισφαίριο η εποχή της γρίπης ξεκινά από το Οκτώβριο και διαρκεί μέχρι και τον Μάιο, ενώ στο Νότιο Ημισφαίριο η περίοδος της γρίπης είναι από τον Ιούνιο μέχρι και τον Οκτώβριο (Dattani, Spooner, Mathieu, κ.ά., 2023). Στην Ελλάδα οι επιδημίες εμφανίζονται κατά τους χειμερινούς μήνες, δηλαδή από τον Οκτώβριο έως τον Απρίλιο, με τη δραστηριότητα της γρίπης να κορυφώνεται κατά τους μήνες Φεβρουάριο-Μάρτιο ('Γρίπη και Εποχική Γρίπη', χ.χ.). Οι υπότυποι A/H3N2, A/H1N1pdm09 και ο ιός τύπου B ευθύνονται για τις εποχικές επιδημίες, με αυτές να ξεκινούν με κρούσματα από τον ιό A/H3N2 και ακολουθούν ο ιός A/H1N1pdm09 και οι ιοί τύπου B, με τους οποίους κλείνει η εποχή.

Το ποσοστό θνητότητας παρουσιάζει διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του έτους, με σημαντική άνοδο κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Ιδιαίτερη σημασία για την έκβαση της νόσου έχουν η ποιότητα της υγειονομικής περίθαλψης, το στέλεχος της γρίπης που κυκλοφορεί και ο εμβολιασμός. Κάποια στελέχη είναι πιο σοβαρά από άλλα λόγω μεταλλάξεων του ιού, μέσω των οποίων παρακάμπτεται το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Dattani, Spooner, & Roser, 2023). Η θνητότητα είναι δύσκολο να υπολογιστεί με ακρίβεια καθώς τα συμπτώματά που προκαλεί ο ιός της γρίπης είναι κοινά με άλλες αναπνευστικές λοιμώξεις. Σε πολλές χώρες μόνο ένα ποσοστό των ασθενών με γριπώδη συνδρομή (ILI) εξετάζεται ώστε να διαπιστωθεί αν έχουν μολυνθεί από τον ιό ή όχι. Επίσης, η γρίπη μπορεί να οδηγήσει σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή πνευμονία αλλά και σε καρδιαγγειακές επιπλοκές όπως καρδιακή προσβολή και εγκεφαλικά επεισόδια κυρίως σε ηλικιωμένους και άτομα με χρόνιες παθήσεις (Dattani, Spooner, & Roser, 2023). Η θνητότητα από τον ιό υπολογίζεται με την εκτίμηση των πρόσθετων θανάτων κατά την περίοδο της γρίπης και την χρήση των δεδομένων επιτήρησης και αρχείων θνησιμότητας. Η ετήσια θνητότητα όπως εκτιμήθηκε από το Global Pandemic Mortality Project II χρησιμοποιώντας δεδομένα μεταξύ 2002 και 2011 ανερχόταν μεταξύ 294.000 και 518.000 θανάτους κάθε χρόνο σε παγκόσμιο επίπεδο (**Εικόνα 9**) (Paget κ.ά., 2019).

Δυστυχώς, ο αριθμός των θανάτων αυξήθηκε καθώς στην εκτίμηση αυτή δεν υπολογίζονται άλλες ασθένειες που σχετίζονται με τη γρίπη, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Ο συνολικός αριθμός θανάτων από γρίπη είναι σταθερός στις ΗΠΑ τα τελευταία 65 χρόνια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι έχει αυξηθεί το προσδόκιμο ζωής, με αποτέλεσμα οι γηραιότεροι να εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων από τη γρίπη και οι μικρότερες ηλικίες αρκετά μειωμένο. Στην Ευρώπη το ποσοστό θνητότητας είναι 0,03% κάθε χρόνο για τα άτομα άνω των 65 ετών. Στις χώρες χαμηλού εισοδήματος τα ποσοστά είναι λιγότερο ασφαλή λόγω του μειωμένου ελέγχου στα κρούσματα γρίπης και τα περιορισμένα αρχεία θανάτων. Ο ιός της γρίπης εκτιμάται ότι είναι πιο θανατηφόρος στις χώρες της Νότιας Αμερικής, της Αφρικής και της Νότιας Ασίας σε σχέση με την Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική λόγω της χαμηλής πρόσβασης σε υγειονομική περίθαλψη και της κακής ατομική υγιεινή. Στη χώρα μας το ποσοστό θανάτου ανέρχεται στο 0,03% για το χρονικό διάστημα 2002 έως 2011 (Dattani, Spooner, & Roser, 2023).

Seasonal influenza respiratory death rate in the over-65's, 2011

The annual number of deaths per 100,000 people in the age group. This focuses on respiratory flu deaths. It does not include deaths from other complications of the flu, such as cardiovascular disease.



Source: Global Pandemic Mortality Project II (2019)

OurWorldInData.org/influenza-deaths • CC BY

Note: This shows an average between 2002 and 2011, excluding the 2009 Swine flu pandemic season.

Εικόνα 9 θνητότητα ανά 100.000 άτομα στην ηλικιακή ομάδα >65 ετών (Dattani, Spooner, & Roser, 2023)

Η θνητότητα από τους ιούς που προκάλεσαν πανδημίες μειώνεται με το πέρασμα των χρόνων. Από το 1900 παρατηρείται μείωση των θανάτων από λοιμώξεις, γεγονός που οφείλεται στη βελτίωση της υγιεινής. Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα βελτιώθηκε η υγειονομική περίθαλψη και αυξήθηκαν τα ποσοστά των παιδικών εμβολιασμών. Οι παράγοντες αυτοί βοήθησαν στη μείωση των συλλοιμώξεων και μείωσαν τον κίνδυνο θανάτου από τη γρίπη. Πλέον, το ποσοστό θανάτων από τον ιό είναι πολύ πιο χαμηλό απ' ό τι στο παρελθόν (Dattani, Spooner, & Roser, 2023).

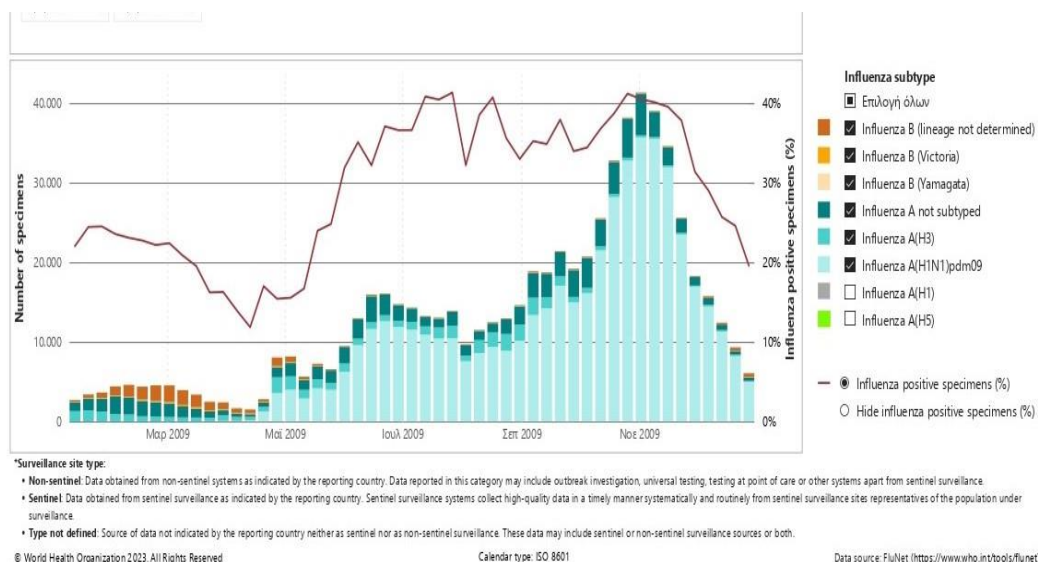
Σε περιόδους πανδημίας τα ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας αυξάνονται. Η ισπανική γρίπη έχει χαρακτηριστεί ως η πιο θανατηφόρα με τα κρούσματα να φτάνουν τα 500 εκατομμύρια, τον αριθμό θανάτων σχεδόν 50 εκατομμύρια και τη θνητότητα στους νέους να είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε σχέση με προηγούμενες εποχές (Sutton, 2018). Αυτό συνέβη γιατί οι νέοι δεν είχαν ανοσία στην H1 του ιού, σε αντίθεση με τα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας που ενδεχομένως να είχαν έρθει σε επαφή με παρόμοιο H1 ιό στο παρελθόν. Στην ισπανική γρίπη το ποσοστό θνητότητας στους ηλικιωμένους ήταν αρκετά χαμηλό και το προσδόκιμο ζωής κατά τη γέννηση και στις νεαρές ηλικίες μειώθηκε κατά 10 χρόνια (Roser, 2023). Το 1957 με την ασιατική γρίπη, ο ιός H2N2 αντικατέστησε πλήρως τον ιό H1N1 και συνέχισε να κυκλοφορεί μέχρι και το 1968. Η πανδημία αυτή είναι η δεύτερη του 20^{ου} αιώνα και εκτιμάται ότι προκάλεσε 1-2 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως (1957 Flu Pandemic | Cause, History, Deaths, & Facts | Britannica, 2023).

Το 2009, με την γρίπη των χοίρων, ο υπότυπος A/H1N1 επικράτησε έναντι των υπολοίπων που συγκυκλοφορούσαν εκείνη την περίοδο. Το αποκορύφωμα της νόσου σημειώνεται το Νοέμβριο του 2009 με 169.558 επιβεβαιωμένα κρούσματα στο Βόρειο



Ημισφαίριο εκ των οποίων τα 153.202 να ανήκουν στον υπότυπο A/H1N1. Στη χώρα μας το ποσοστό των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων τον ίδιο μήνα ανέρχεται στις 3.991 με τα 3.989 να είναι A/H1N1 (**Πίνακας 2**).

Στο Βόρειο Ημισφαίριο υπάρχει αύξηση των κρουσμάτων γρίπης κάθε χειμώνα και τα στελέχη που κυκλοφορούν είναι ο ιός A/H1N1, ο ιός A/H3N2 και ο ιός τύπου B. Η εμβολιαστική κάλυψη στη χώρα μας έχει φτάσει το 65,3 % στα άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών για το χρονικό διάστημα 2000-2021. (*Influenza Data Explorer*, χ.χ.)



Πίνακας 2 Νοσηρότητα του ιού σε παγκόσμιο επίπεδο κατά τη διάρκεια της πανδημίας του 2009 (Influenza Surveillance Outputs, χ.χ.)

Κατά τους χειμερινούς μήνες η γρίπη μπορεί να προσβάλει έως και το 20% του πληθυσμού και να προκαλέσει 290.000-650.000 θανάτους ετησίως από αναπνευστικές ασθένειες με τους 72.000 να συμβαίνουν στην Ευρωπαϊκή Περιφέρεια του ΠΟΥ (*Burden of Disease*, χ.χ.; *Estimating Disease Burden of Influenza*, χ.χ.). Σύμφωνα με το US-CDC τα υψηλότερα ποσοστά θανάτων σημειώνονται στα άτομα προχωρημένης ηλικίας (άνω των 75 ετών) και στις οικονομικά ασθενέστερες περιοχές του κόσμου, με την Αφρική να κατέχει το υψηλότερο ποσοστό θνητότητας από γρίπη παγκοσμίως με την Ανατολική Μεσόγειο και τη Νοτιοανατολική Ασία να ακολουθούν (*Up to 650 000 People Die of Respiratory Diseases Linked to Seasonal Flu Each Year*, χ.χ.).

Πριν το ξέσπασμα της πανδημίας του COVID-19, τη χρονική περίοδο 2018-2019, εξετάστηκαν 36.289 δείγματα για γρίπη σε όλη την Ευρώπη, με το 45% των δειγμάτων να είναι θετικά στον ιό (**Πίνακας 3**). Η δραστηριότητα της γρίπης ξεκίνησε κατά την 49^η εβδομάδα του 2018 και κορυφώθηκε την 7^η εβδομάδα του 2019. Οι ιοί που κυριάρχησαν ήταν ο A/H1N1pdm09 και ο A/H3N2, με ποσοστά 39% και 33% αντίστοιχα, ενώ η δραστηριότητα του ιού της γρίπης τύπου B ήταν αρκετά χαμηλή (μόλις 1%). Σημειώθηκαν 7.342 εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα σε κλίνες ΜΕΘ και 9.561 νοσηλείες σε άλλους θαλάμους. Τα περιστατικά εισαγωγής στη ΜΕΘ ήταν κυρίως άτομα ηλικίας άνω των 65, αλλά υπήρχε σημαντικός αριθμός νοσηλειών σε άτομα ηλικίας 40-64 ετών (*Seasonal Influenza, Annual Epidemiological Report for 2018–2019*, 2019, σσ. 2018–2).



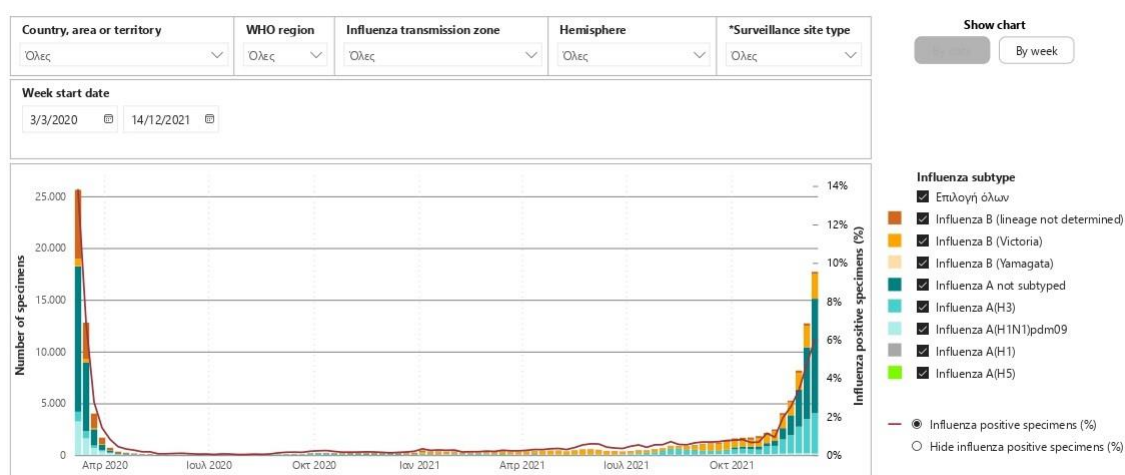
«Ντότσικα Ευρυδίκη», «Ανίχνευση του ιού της γρίπης στα αστικά λύματα»

< Επιστροφή στην αναφορά



Πίνακας 3 Νοσηρότητα του ιού για την περίοδο 2018-2019 στην Ευρώπη (Influenza Surveillance Outputs, χ.χ.)

Το χρονικό διάστημα 2020-2021 ο ιός της γρίπης εκδηλώθηκε κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο με κορύφωση στα τέλη Ιανουαρίου-αρχές Φεβρουαρίου (εβδομάδα 5^η) του 2020 και συνεχίστηκε έως τις αρχές Απριλίου 2020 (εβδομάδα 15^η-16^η). Κατά την περίοδο την πανδημίας του COVID-19, σε περιοχές όπως η Κεντρική και η Νότια Αμερική, οι χώρες τις Καραϊβικής και η Νότια Ασία, τα ποσοστά νοσηρότητας της γρίπης παρέμειναν χαμηλά σε σύγκριση με τα προηγούμενα έτη. Στην Ευρώπη, κατά την περίοδο 2020-2021 αναφέρθηκαν τα λιγότερα κρούσματα γρίπης, ενώ δε σημειώθηκαν νοσηλευόμενα κρούσματα ή θάνατοι από τη γρίπη. Σε παγκόσμιο επίπεδο, 3.311.831 δείγματα συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν κατά τη χρονική περίοδο Νοέμβριος 2019-Δεκέμβριος 2020, το 19% (614.907) ήταν θετικά στον ιό της γρίπης. Από αυτά, το 63% ανήκε στον ιό τύπου A και το υπόλοιπο 37% στον ιό τύπου B, η υποτυποποίηση έδειξε ότι το 23% (86.778) ήταν A/H1N1pdm09, το 17% (63.779) ήταν γρίπη A/H3N2 και το 61% (234.473) δεν υποτυποποιήθηκε. Από τα κρούσματα του ιού τύπου B, το 16,2% (37.211) ανήκε στη γενεαλογική σειρά B/Victoria και 0,3 (730) στη γενεαλογική γραμμή B/Yamagata, το υπόλοιπο 83,5% (191.698) δεν υποτυποποιήθηκε (WHO, 2021) (Πίνακας 4).



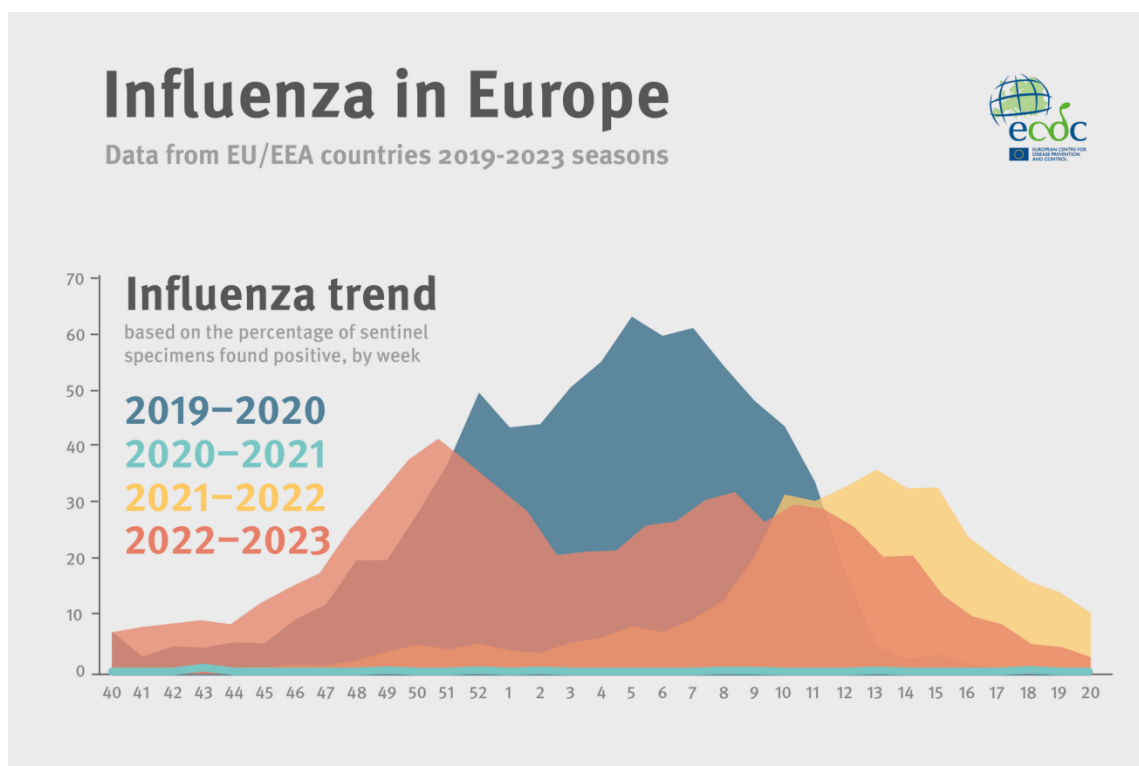
Πίνακας 4 Νοσηρότητα του ιού για την περίοδο 2020-2021 (Influenza Surveillance Outputs, χ.χ.)

Η χρονιά 2020-2021 χαρακτηρίστηκε από πρωτοφανώς μειωμένα κρούσματα γρίπης λόγω εμφάνισης της πανδημίας COVID-19. Οι συνθήκες του συστήματος υγείας σε πολλές χώρες οδήγησαν στη μειωμένη παρακολούθηση των κρουσμάτων γρίπης. Τα



μέτρα καταπολέμησης του ιού της πανδημίας περιόρισαν δραματικά την εμφάνιση του ιού της γρίπης, με τα μέτρα ατομικής προστασίας, τη μείωση των μετακινήσεων και την απομόνωση των νοσούντων να έχουν σημαντικό ρόλο στην ελάττωση των κρουσμάτων (*Seasonal Influenza - Annual Epidemiological Report for 2020-2021*, 2021). Στον **Πίνακα 5** φαίνεται η πορεία της νόσου για τα έτη 2019-2023.

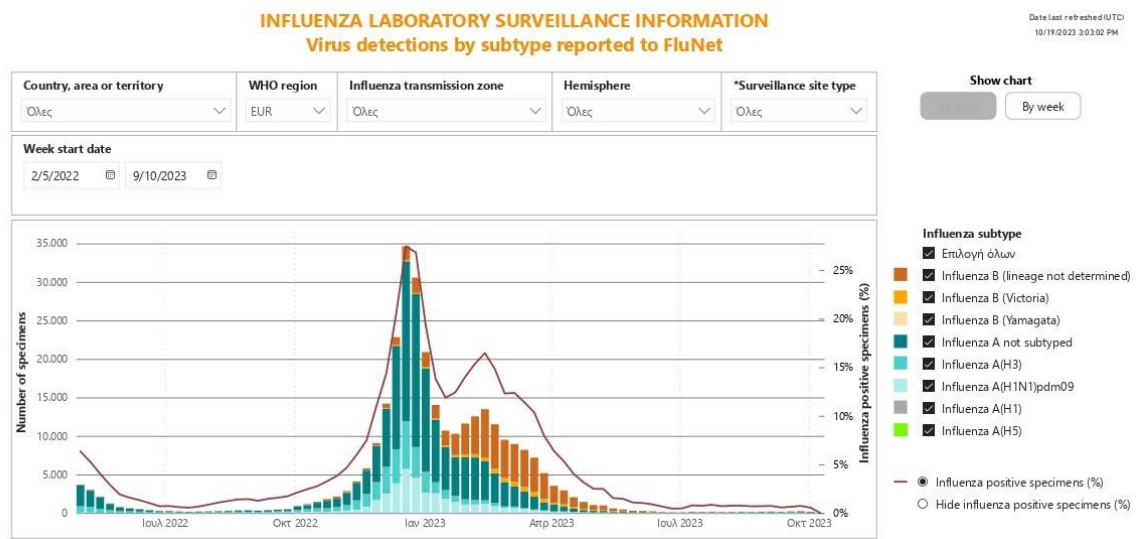
Η περίοδος 2022-2023 φαίνεται να σηματοδοτεί την επιστροφή της νοσηρότητας της γρίπης στα προ-πανδημικά επίπεδα, με την πρώιμη έναρξη και κορύφωση της εποχικής επιδημίας. Η θετικότητα στο σύστημα παρακολούθησης sentinel διήρκησε 24 εβδομάδες. Στην Ευρώπη, το ποσοστό των θετικών δειγμάτων έφτασε στο 42% την 51^η εβδομάδα του 2022, ακολούθησε προσωρινή μείωση κατά την 4^η εβδομάδα και δεύτερη αύξηση της θετικότητας μεταξύ 5^{ης}-12^{ης} εβδομάδας του 2023. Την 17^η εβδομάδα το ποσοστό θετικότητας ήταν <10% σηματοδοτώντας και το τέλος της εποχικής γρίπης (**Πίνακας 6**). Ο ιός που κυριάρχησαν στη sentinel παρακολούθηση ήταν ο A/H3N1, ωστόσο παρατηρήθηκε εντονότερη η παρουσία του ιού A/H1N1pdm09 από την εβδομάδα 50/2022 και μετά, και των ιών τύπου B από την εβδομάδα 2/2023 και μετά. Στα δείγματα παρακολούθησης non-sentinel οι ιοί A/H3N2 υπερτερούν έναντι των A/H1N1pdm09. Οι ιοί A και B ανιχνεύτηκαν σε ασθενείς σε ΜΕΘ με κυρίαρχους τους ιούς τύπου A (*Seasonal Influenza - Annual Epidemiological Report for 2022/2023*, 2023).



Πίνακας 5 Πορεία του ιού της γρίπης σε παγκόσμια κλίμακα για τη χρονική περίοδο 2019-2023 (Infographic, 2023)



«Ντότσικα Ευρωδίκη», «Ανίχνευση του ιού της γρίπης στα αστικά λύματα»



Πίνακας 6 Η πορεία του ιού στην Ευρώπη για την περίοδο 2022-2023 (Influenza Surveillance Outputs, χ.χ.)

Στην Ελλάδα, για τη χρονική περίοδο 2019-2020, από το Σύστημα παρατηρητών νοσηρότητας sentinel προέκυψε ότι η δραστηριότητα της γρίπης άρχισε να αυξάνεται στην 1^η εβδομάδα του 2020 με κορύφωση την 6^η εβδομάδα του 2020. Ελέγχθηκαν συνολικά 3.175 κλινικά δείγματα σε όλα τα νοσοκομεία, από τα οποία τα 876 (27,5%) ήταν θετικά στη γρίπη από το σύνολο των θετικών δειγμάτων το 77,9% ανήκει στον ιό γρίπης τύπου A και το 22,1% στον ιό γρίπης τύπου B. Καταγράφηκαν επίσης 254 σοβαρά κρούσματα γρίπης, εκ των οποίων τα 233 νοσηλεύτηκαν σε ΜΕΘ, και 116 θάνατοι από εργαστηριακά επιβεβαιωμένη γρίπη (Πίνακας 7).

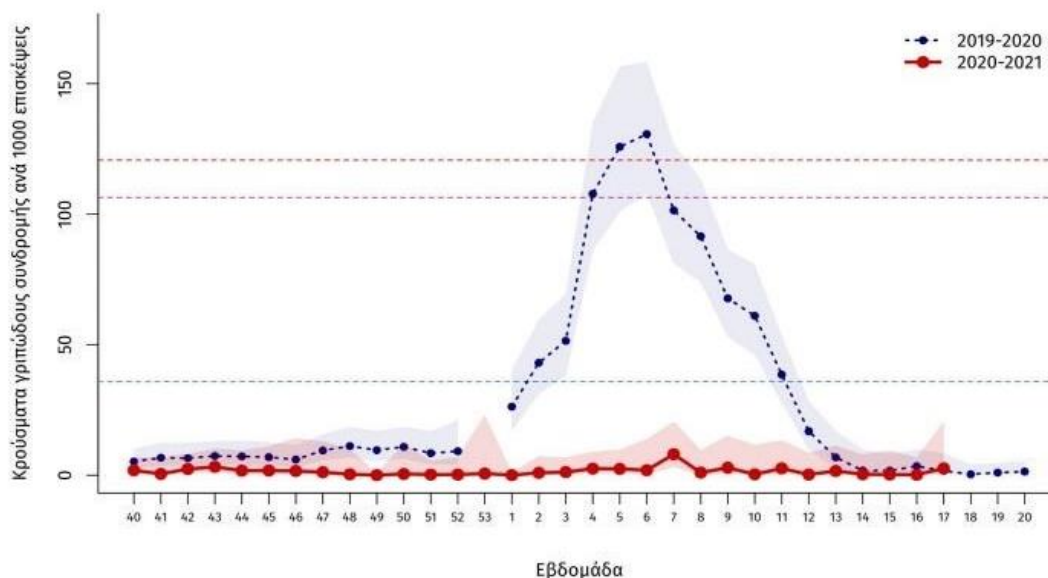


Πίνακας 7 Πορεία του ιού για την περίοδο 2019-2020 στην Ελλάδα (Influenza Surveillance Outputs, χ.χ.)

Κατά την περίοδο 2020-2021, η δραστηριότητα της γρίπης παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα, συνέπεια των μέτρων κατά του SARS-CoV-2 και της λήψης μέτρων ατομικής προστασίας. Ελέγχθηκαν εργαστηριακά 442 κλινικά δείγματα (τα 111 από νοσοκομεία και τα 331 από το δίκτυο Sentinel) και κανένα δε βρέθηκε θετικό στον ιό, ενώ δεν καταγράφηκε κανένα σοβαρό κρούσμα και καμία νοσηλεία σε μονάδα ΜΕΘ. Στον



Πίνακα 8 απεικονίζονται τα κρούσματα γριπώδους συνδρομής ανά 1.000 επισκέψεις ανά εβδομάδα για τα έτη 2019-2020 και 2020-2021

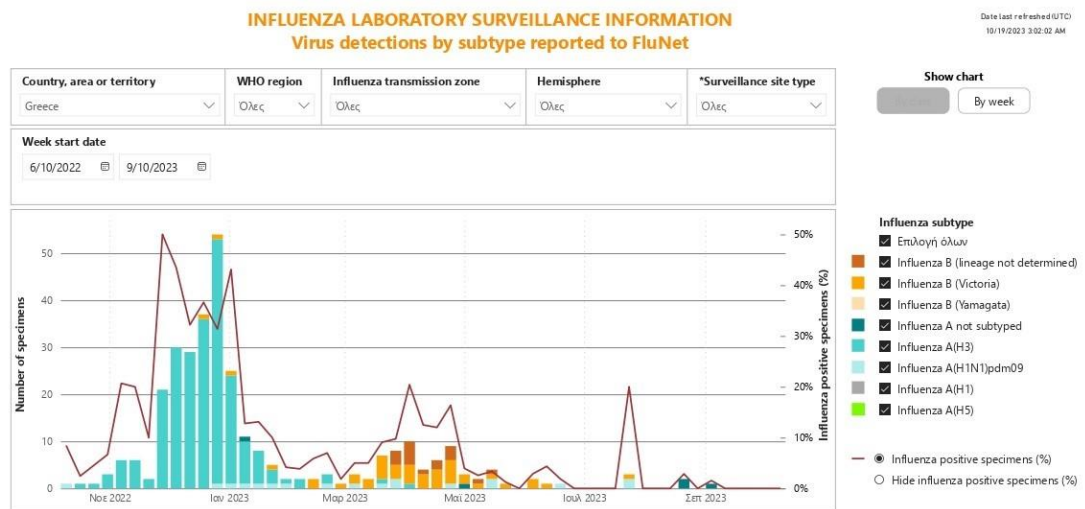


Πίνακας 8 Κρούσματα γριπώδους συνδρομής ανά 1000 επισκέψεις ανά εβδομάδα (‘Ετήσιες επιδημιολογικές εκθέσεις’, χ.χ.)

Τέλος, για τη χρονική περίοδο 2022-2023, η δραστηριότητα της γρίπης αυξήθηκε σταδιακά με κορύφωση την 52^η εβδομάδα του 2022 και μειώθηκε βαθμιαία μέχρι το τέλος της επιδημικής περιόδου. Ελέγχθηκαν συνολικά 2252 κλινικά δείγματα (361 από νοσοκομεία και 1891 από το Δίκτυο Παρατηρητών Νοσηρότητας- Sentinel) από τα οποία τα 369 ήταν θετικά στον ιό, με τα 289 να ανήκουν σε ιό της γρίπης Α και 80 σε ιό της γρίπης Β. Το μεγαλύτερο ποσοστό των θετικών κρουσμάτων οφείλεται στον ιό Α/Η3Ν2 (**Πίνακας 9**). Σημειώθηκαν 71 σοβαρά κρούσματα, εκ των οποίων τα 68 χρειάστηκε να νοσηλευτούν σε μονάδες ΜΕΘ. Το ποσοστό θνητότητας ήταν ιδιαίτερα χαμηλό με 26 θανάτους από επιβεβαιωμένη εργαστηριακά γρίπη (‘Ετήσιες επιδημιολογικές εκθέσεις’, χ.χ.).



«Ντότσικα Ευρυδίκη», «Ανίχνευση του ιού της γρίπης στα αστικά λύματα»



Πίνακας 9 Η πορεία του ιού στην Ελλάδα για την περίοδο 2022-2023 (Influenza Surveillance Outputs, γ.χ.)



12.Επιδημιολογική Παρακολούθηση

Για την παρακολούθηση της πορείας της γρίπης καθώς και για τον έλεγχο των υπότυπων που κυκλοφορούν έχουν αναπτυχθεί συστήματα επιτήρησης. Τα δεδομένα της γρίπης συλλέγονται μεθοδικά μέσω του Παγκόσμιου Δικτύου Νοσοκομειακής Επιτήρησης της Γρίπης-Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN) και του Παγκόσμιου Συστήματος Επιτήρησης και Αντιμετώπισης της Γρίπης- Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) του WHO.

Το Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN) είναι ένα δίκτυο που περιλαμβάνει πάνω από 100 νοσοκομεία σε 25 χώρες, στα οποία εκτελούν ενεργό επιτήρηση ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο (gihsn, 2023). Στόχοι του GIHSN είναι η περιγραφή των τύπων και υποτύπων των ιών που κυκλοφορούν σε σύγκριση με τα παγκόσμια πρότυπα σοβαρών ασθενειών, η διερεύνηση της σχέσης των σοβαρών ασθενειών με τους ιούς και η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του εμβολιασμού (Puig-Barberà κ.ά., 2015).

Από το 1952 διενεργείται η επιτήρηση της γρίπης σε παγκόσμιο επίπεδο μέσω του Παγκόσμιου Συστήματος Επιτήρησης και Αντιμετώπισης της Γρίπης- Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) του WHO. Το GISRS είναι ένας παγκόσμιος μηχανισμός επιτήρησης και αντιμετώπισης της εποχικής, πανδημικής και ζωνόσου γρίπης και αποτελεί μέσο παρακολούθησης της επιδημιολογίας και της νόσου της γρίπης. Στο GISRS περιλαμβάνονται σήμερα ιδρύματα από 127 κράτη-μέλη του WHO (*Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)*, χ.χ.). Τα Εθνικά Κέντρα Γρίπης-National Influenza Centres (NICs) συλλέγουν στη χώρα τους δείγματα όπου διενεργούν την προκαταρκτική ανάλυση και στη συνέχεια στέλνουν αντιπροσωπευτικά κλινικά δείγματα και απομονωμένους ιούς στον WHO για αντιγονική και γενετική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αποτελούν τη βάση για τη σύνθεση του εμβολίου κάθε χρόνο. Τα Εθνικά Κέντρα Γρίπης ορίζονται από τα εθνικά υπουργία υγείας και αποτελούν τα θεμέλια του Παγκόσμιου Συστήματος Επιτήρησης και Αντιμετώπισης της Γρίπης (GISRS)(*National Influenza Centres*, χ.χ.).

Ο WHO παρέχει μια παγκόσμια πλατφόρμα αναφοράς και ανάλυσης επιδημιολογικών δεδομένων με σκοπό την επιτήρηση της γρίπης. Η πλατφόρμα αποτελείται από το FluNet και το FluID στα οποία κοινοποιούνται τα επιδημιολογικά δεδομένα από το GISRS.

Το FluNet ξεκίνησε για πρώτη φορά τη δράση του το 1997. Σε αυτό εισάγονται ιολογικά δεδομένα, όπως ο αριθμός των ιών γρίπης που ανιχνεύτηκαν ανά υπότυπο, δεδομένα που είναι κρίσιμα για της παρακολούθηση της κίνησης των ιών σε παγκόσμιο επίπεδο και την ερμηνεία των επιδημιολογικών δεδομένων. Τα δεδομένα ενημερώνονται εβδομαδιαία και παρέχονται από τα Εθνικά Κέντρα Γρίπης του Παγκόσμιου Συστήματος Επιτήρησης και Αντιμετώπισης της Γρίπης (GISRS) και άλλα εθνικά εργαστήρια αναφοράς γρίπης που συνεργάζονται ενεργά με το GISRS(*Flunet*, χ.χ.). Για την ανταλλαγή επιδημιολογικών δεδομένων χρησιμοποιείται FluID. Μέσω αυτού παρέχεται σύνδεση των υφιστάμενων βάσεων δεδομένων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απευθείας εισαγωγή δεδομένων από τα εθνικά σημεία αναφοράς. Το FluID είναι συμπληρωματικό της πλατφόρμας FluNet. Η πλατφόρμα περιέχει ποσοτικά και ποιοτικά



δεδομένα για την εξάπλωση, την εξέλιξη και το αντίκτυπο της γρίπης με σκοπό τη λήψη ορθών και τεκμηριωμένων αποφάσεων σχετικά με τη διαχείριση του ιού (*FluID*, χ.χ.).

Το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης της Γρίπης- European Influenza Surveillance Network (EISN) είναι ένα σύστημα επιδημιολογικής και ιολογικής επιτήρησης του ιού το οποίο ελέγχεται από το ECDC. Στόχος του EISN είναι να παρέχει πληροφορίες με σκοπό την καλύτερη αξιολόγηση της δραστηριότητας της γρίπης για την λήψη κατάλληλων μέτρων προστασίας. Οι δραστηριότητες ιολογικής επιτήρησης συντονίζονται μέσω του Ευρωπαϊκού Δικτύου Εργαστηρίων Αναφοράς για την Ανθρώπινη Γρίπη (ERLI-Net), ενός υποδικτύου του EISN. Τα επιδημιολογικά και ιολογικά δεδομένα συλλέγονται μέσω της βάσης δεδομένων The European Surveillance System (TESSy) που φιλοξενείται από το ECDC. Στο TESSy συγκεντρώνονται:

- Πληροφορίες σχετικά με γριπώδεις ασθένειες (ILI) ή οξείες αναπνευστικές λοιμώξεις (SARI) ανά ηλικιακή ομάδα, που αναφέρονται από τους παρόχους πρωτοβάθμιας υγειονομικής περίθαλψης.
- Πληροφορίες σχετικά με την ένταση, τη γεωγραφική εξάπλωση και την τάση
- Ιολογικά δεδομένα σχετικά με τους τύπους και τους υπότυπους που συλλέγονται από sentinel και non-sentinel παρακολούθηση
- Επιδημιολογικά δεδομένα του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV)

Το EISN βασίζεται στο Ευρωπαϊκό Σύστημα Επιτήρησης της Γρίπης- European Influenza Surveillance Scheme (EISS), το οποίο συντονίστηκε από το Ολλανδικό Ινστιτούτο Έρευνας Υπηρεσιών Υγείας (NIVEL) το 1996, και αποτελείται από επιχειρησιακά σημεία επαφής για την επιδημιολογία της γρίπης. Τα σημεία αυτά ορίζονται από την εθνική αρχή δημόσιας υγείας σε κάθε κράτος μέλος της ΕΕ, την Ισλανδία και τη Νορβηγία. Τα επιχειρησιακά σημεία επαφής είναι υπεύθυνα για την παρακολούθηση της δραστηριότητας της νόσου και για την επικοινωνία τόσο με το ECDC όσο και με τα υπόλοιπα κράτη μέλη (*European Influenza Surveillance Network (EISN)*, 2017).

Το ERLI-Net έχει ως στόχο την ιολογική επιτήρηση της ανθρώπινης γρίπης και την έγκαιρη κοινοποίηση των δεδομένων μέσω του EISN, αναλαμβάνει τον κεντρικό χαρακτηρισμό των ιών της γρίπης, την εξωτερική αξιολόγηση ποιότητας (EQA) και την παρακολούθηση της θνητότητας που σχετίζεται με τη γρίπη στην Ευρώπη. Οι δραστηριότητες αυτές συντονίζονται από το ECDC. Τα περισσότερα ERLI-Net είναι αναγνωρισμένα ως εθνικά κέντρα γρίπης (NIC) από τον WHO και συμμετέχουν στο Παγκόσμιο Σύστημα Επιτήρησης και Αντιμετώπισης της Γρίπης (GISRS) (*About ERLI-Net*, 2013).

Η κλινική επιτήρηση της γρίπης από το EISN βασίζεται σε δεδομένα που συλλέγονται από γενικούς ιατρούς του συστήματος παρακολούθησης sentinel, ενός δικτύου εθελοντών ιατρών, εργαστηρίων και υπηρεσιών δημόσιας υγείας που μελετά τον ρυθμό εμφάνισης ασθενειών. Ορισμένα συστήματα μπορεί να περιλαμβάνουν παιδίατρος και ιατρούς άλλων ειδικοτήτων και αντιπροσωπεύουν το 1-5% των ιατρών σε μια χώρα ή σε μια γεωγραφική περιοχή. Τα περισσότερα συστήματα παρακολούθησης Sentinel αναφέρουν δεδομένα σχετικά με τον αριθμό των νέων κρουσμάτων γριπώδους συνδρομής (ILI), οξείας αναπνευστικής λοίμωξης (SARI) ή και τα δύο. Στην Ελλάδα η



παρακολούθηση γριπώδους συνδρομής μέσω του συστήματος Sentinel ξεκίνησε το 2015.

Τα εθνικά εργαστήρια αναφοράς (NICs) δίνουν στο EISN αποτελέσματα τόσο από την Sentinel όσο και από την Non-Sentinel παρακολούθηση της γρίπης. Τα δείγματα της Non-sentinel παρακολούθησης μπορεί να προέρχονται από νοσοκομεία, γηροκομεία και κλινικές (Sentinel Surveillance, 2013).

12.1. Επιδημιολογία του ιού βάσει μοριακού ελέγχου λυμάτων

Η εμφάνιση και η επανεμφάνιση μολυσματικών παραγόντων εξαρτώνται από μεταβλητές όπως η κλιματική αλλαγή, η φτώχεια και η αύξηση του πληθυσμού στα μεγάλα αστικά κέντρα. Επιπλέον, η παγκοσμιοποίηση μέσω του τουρισμού και του εμπορίου διευκολύνει την μετακίνηση πληθυσμών με αποτέλεσμα να δρα συμπληρωματικά στην γρήγορη εξάπλωση κάποιας νόσου. Ως εκ τούτου, έχει δημιουργηθεί η ανάγκη παρακολούθησης παθογόνων παραγόντων με σκοπό τη διαφύλαξη της δημόσιας υγείας (Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). Τα αστικά λύματα αποτελούν μια δεξαμενή από πλήθος παθογόνων τα οποία είναι αντιπροσωπευτικά μιας κοινότητας σε μια περιοχή απορροής. Το μικροβιολογικό περιεχόμενο των υγρών αποβλήτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των γονιδίων μικροβιακής αντοχής, των παθογόνων ιών και βακτηρίων και για το επίπεδο βιολογικής μόλυνσης μιας περιοχής. Τα λύματα περιέχουν υψηλούς τίτλους ιών και βακτηριοφάγων, παθογόνων για τα φυτά, τα ζώα και τους ανθρώπους. Η επιδημιολογία με βάση τα λύματα (Wastewater Based Epidemiology- WBE) ανιχνεύει και προσδιορίζει τη συγκέντρωση των παθογόνων σε μια εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης κάποιας ασθένειας (Dumke κ.ά., 2022; Rothman κ.ά., χ.χ.).

Η WBE είναι μια τεχνική παρακολούθησης της δημόσιας υγείας που έγινε ιδιαίτερα γνωστή κατά τη διάρκεια της πανδημίας του COVID-19. Έχει γίνει ένα σημαντικό εργαλείο για τους επιδημιολόγους με σκοπό τη συλλογή δεδομένων σε πραγματικό χρόνο για τη χρήση απαγορευμένων ουσιών, τις συμπεριφορές που σχετίζονται με την υγεία αλλά και τους παθογόνους παράγοντες που απειλούν τη δημόσια υγεία. Ωστόσο η αρχική ιδέα οφείλεται σε μια επιδημία χολέρας και έχει τις ρίζες της στα μέσα της δεκαετίας του 1800, όταν ο John Snow συνέδεσε τους θανάτους με τη διαρροή ενός βόθρου σε παροχή νερού σε μια αντλία της Broad Street. Έτσι, οι επιστήμονες άρχισαν να εξετάζουν τα λύματα όχι μόνο για χολέρα αλλά και για άλλα παθογόνα όπως τα βακτήρια salmonella typhi (τύφος), τους ιούς coxsackie και πολιομυελίτιδας και άλλα (Kilaru κ.ά., 2022). Στη δεκαετία του 1940, ο Dr. James Trask και ο Dr. John Paul από την Ιατρική Σχολή του Yale, πρότειναν τη συχνή εξέταση των λυμάτων ως μέσο για την παρακολούθηση των κρουσμάτων της πολιομυελίτιδας (SITNFlash, 2023). Η παρακολούθηση των λυμάτων γινόταν μέσω κυτταροκαλλιιεργειών για την ανίχνευση όχι μόνο της πολιομυελίτιδας αλλά και άλλων ιικών παθογόνων. Αργότερα, κατά τη δεκαετία του 1980, χρησιμοποιήθηκαν μοριακές μέθοδοι όπως οι cDNA βιβλιοθήκες για την παρακολούθηση του ιού της ηπατίτιδας Α. Τη δεκαετία του 1990 χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την παρακολούθηση των λυμάτων, μια μέθοδος που εξακολουθεί να είναι ευρέως διαδεδομένη (Schmidt, 2020).



Ο ποσοτικός προσδιορισμός ενδογενών και εξωγενών βιοδεικτών στα λύματα μιας κοινότητας αντικατοπτρίζει την κατάσταση της υγείας και τις συνθήκες διαβίωσης του πληθυσμού σε πραγματικό χρόνο. Οι βιοδείκτες μπορεί να περιλαμβάνουν παθογόνους παράγοντες, ή και παράγοντες που συνδέονται με τον τρόπο ζωής για παράδειγμα την κατανάλωση αλκοόλ, το κάπνισμα και τις ψυχοτρόπες ουσίες. Το 2001 ο Daughton υπέθεσε ότι η ανίχνευση υπολειμμάτων φαρμακευτικών ουσιών στα υγρά απόβλητα συνδέεται με τη χρήση τους από τον γενικό πληθυσμό. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε το 2005 από τον Zuccato, ο οποίος έκανε ποσοτικό προσδιορισμό της κοκαΐνης σε υγρά απόβλητα και σε επιφανειακά ύδατα και διερεύνησε τη χρήση της στη κοινότητα.

Εκτοτε, δημιουργήθηκαν παγκόσμια δίκτυα παρακολούθησης λυμάτων, με πιο ενεργά να είναι αυτά της Ευρώπης, της Αυστραλίας και των ΗΠΑ. Οι περισσότερες χώρες παρακολουθούν τη χρήση παράνομων ουσιών μέσω WBE για επιδημιολογικές μελέτες (Zhang κ.ά., 2019). Στη συνέχεια, η παρακολούθηση των λυμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος βιοδεικτών που απειλούν τη δημόσια υγεία, όπως τα φυτοφάρμακα και άλλα βαρέα μέταλλα. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επίσης το 2009, κατά τη διάρκεια της πανδημίας, για την ανίχνευση του ιού της γρίπης. Αν και ο ιός της γρίπης Α ανιχνεύτηκε στα λύματα, το πανδημικό στέλεχος A/H1N1pdm09 δεν ανιχνεύτηκε (Mao κ.ά., 2020; Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). Το πεδίο εφαρμογής της WBE κυμαίνεται από την αξιολόγηση της χρήσης ναρκωτικών ουσιών και της υγείας του πληθυσμού έως την αξιολόγηση των κοινωνικών, δημογραφικών και οικονομικών συσχετίσεων των τροφίμων και των κατανάλωσης χημικών ουσιών (Mao κ.ά., 2020).

Τα λύματα παρέχουν κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης για διάφορους παθογόνους παράγοντες, οι οποίοι ανιχνεύονται στα υγρά απόβλητα. Τα επίπεδα παθογόνων και μη παθογόνων παραγόντων ποικίλει ανάλογα με τις πηγές των αποβλήτων. Η παρακολούθηση των λυμάτων είναι ένας τύπος περιβαλλοντικής επιτήρησης που ιστορικά χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση παθογόνων που μεταδίδονται με το νερό ή από την κοπρανοστοματική οδό και είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον έλεγχο των παθογόνων σε μια κοινότητα (Mao κ.ά., 2021). Η WBE είναι μια ολοκληρωμένη τεχνική που εξάγει, αναλύει, επεξεργάζεται δεδομένων και ερμηνεύει τους στόχους, τους λεγόμενους βιοδείκτες, που αποβάλλονται από τα κόπρανα/ούρα στα υγρά απόβλητα και παρέχει ολοκληρωμένες πληροφορίες για την υγεία της κοινότητας. Η μέθοδος παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα:

1. παρέχει ολοκληρωμένα και αντικειμενικά δεδομένα,
2. δίνει αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο,
3. είναι ευέλικτη
4. έχει τη δυνατότητα να παρακολουθεί πολλαπλές ασθένειες, ακόμη και σπάνιες,
5. είναι οικονομικά αποδοτική και δε βασίζεται σε δημόσιους και κλινικούς πόρους
6. τα δεδομένα της μεθόδου συλλέγονται ανώνυμα
7. και ανιχνεύονται συμπτωματικοί και ασυμπτωματικοί ασθενείς αλλά και αυτοί που δεν έχουν αναπτύξει ακόμη τη νόσο, δίνοντας έτσι ένα προβάδισμα στους επιδημιολόγους σχετικά με την αύξηση ή τη μείωση των κρουσμάτων.(Dumke



κ.ά., 2022; Mercier κ.ά., 2022; Rothman κ.ά., χ.χ.; Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020; Wolfe κ.ά., 2022).

Η επιδημιολογία λυμάτων είναι μια εύκολη μέθοδος που μπορεί να συμπληρώσει προγράμματα κλινικής επιτήρησης και να ενισχύσει συστήματα αντιμετώπισης έκτακτων περιστατικών υγείας (de Melo κ.ά., 2023; Dumke κ.ά., 2022; Mercier κ.ά., 2022).

Αν και τα πλεονεκτήματα της WBE είναι πολλά και σημαντικά, η μέθοδος εμφανίζει κάποιους περιορισμούς. Η πολυπλοκότητα της μήτρας των υγρών αποβλήτων δυσκολεύει την εξαγωγή και την επακόλουθη ανάλυση του μεγάλου όγκου πληροφοριών που διαθέτουν. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκέντρωση των βιοδεικτών είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τη συγκέντρωση ενός δείγματος ούρων ή κοπράνων (Mao κ.ά., 2020). Συγκεκριμένα, η αποβολή του ιού της γρίπης Α και Β στα κόπρανα μπορεί να φτάσει έως και 10^6 αντίγραφα/g, αλλά δεδομένου ότι ο ιός διαθέτει λιπιδικό φάκελο, συχνά ανευρίσκεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στα υγρά απόβλητα. (Mercier κ.ά., 2022). Αυτό συμβαίνει γιατί οι ιοί που περιέχουν λιπιδικό φάκελο παρουσιάζουν μεγαλύτερη απορρόφηση στο στερεό κλάσμα των λυμάτων σε σύγκριση με τους ιούς που δε διαθέτουν λιπιδικό φάκελο (Dumke κ.ά., 2022; Mercier κ.ά., 2022; Mohan κ.ά., 2021). Εμπόδιο της μεθόδου αποτελούν επίσης και οι διάφοροι αναστολείς που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα, όπως είναι τα λίπη, οι πρωτεΐνες και άλλες χημικές ουσίες που μπορεί να επηρεάζουν την επακόλουθη ανάλυση (Mao κ.ά., 2020).

Η WBE παρέχει δεδομένα σε επίπεδο πληθυσμού και δε μπορεί να ανιχνεύσει μεμονωμένα περιστατικά ή τοποθεσίες μόλυνσης, επίσης τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και η μεταβολή του πληθυσμού μπορεί να οδηγήσουν σε λάθος επιδημιολογικά συμπεράσματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κατασκευή του αποχετευτικού συστήματος μιας κοινότητας επηρεάζει τον μικροβιακό πληθυσμό και συνεπώς το τελικό αποτέλεσμα. (Dumke κ.ά., 2022; Mercier κ.ά., 2022; Mohan κ.ά., 2021). Επιπλέον, οι περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία και η βροχόπτωση που μπορεί να αλλοιώσουν την περιεκτικότητα του λύματος, ή και άλλοι παράγοντες όπως ο συνδυασμός εκκινητή/ανιχνευτή, μπορεί να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα (Dumke κ.ά., 2022; Mercier κ.ά., 2022; Mohan κ.ά., 2021).

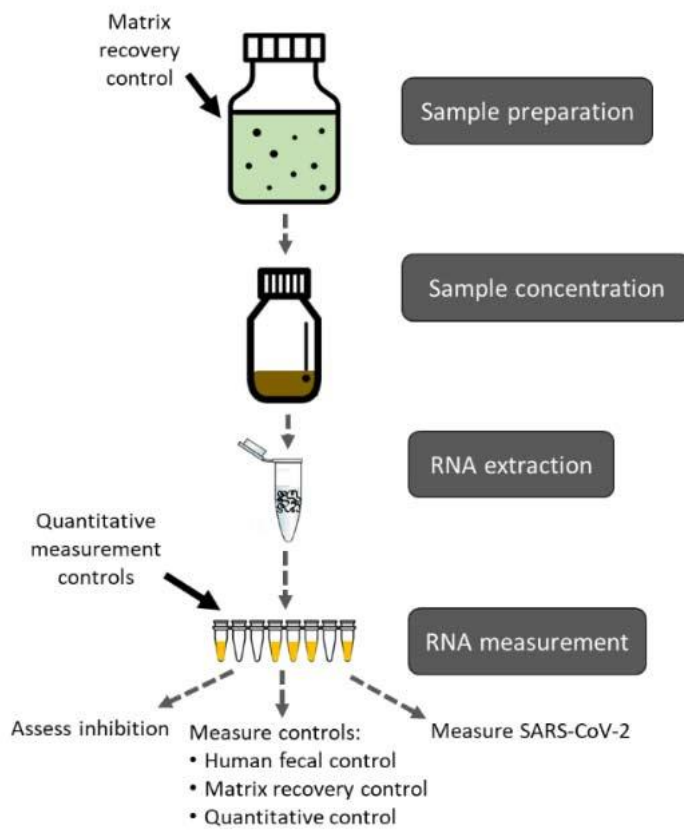
Η WBE παρέχει πληροφορίες τόσο για τον παθογόνο παράγοντα που ανιχνεύει όσο και για τον ξενιστή. Η ανάλυση των υγρών αποβλήτων χρησιμοποιήθηκε κατά τη δεκαετία του 1980 στην Φιλανδία για την αξιολόγηση της εξάπλωσης της πολιομυελίτιδας (Mao κ.ά., 2020; Sims & Kasprzyk-Hordern, 2020). Το 2009, στην Ολλανδία, η WBE χρησιμοποιήθηκε για την επιτήρηση του ιού της γρίπης σε δείγματα που ελήφθησαν σε διάστημα 4 μηνών κατά τη διάρκεια της πανδημίας του 2009 (Heijnen & Medema, 2011). Το 2013 στη Σουηδία, η επιτήρηση λυμάτων παρείχε έγκαιρη προειδοποίηση για έξαρση νοροϊού και ηπατίτιδας Α. Την ίδια χρονιά στο Ισραήλ έγινε παρακολούθηση του ιού της πολιομυελίτιδας σε δείγματα που λαμβάνονταν σε μηνιαία βάση από τις εισροές σε εγκαταστάσεις λυμάτων, οι οποίες κάλυπταν το 30-40% του πληθυσμού της χώρας (Schmidt, 2020).

Κατά τη διάρκεια της πανδημίας του SARS-CoV-2, οι ανάγκες για συχνή παρακολούθηση της δημόσιας υγείας έγιναν πιο έντονες. Χώρες σε όλο τον κόσμο ξεκίνησαν προγράμματα επιτήρησης λυμάτων με σκοπό την πρόβλεψη εξάρσεων του



ιού και την ενίσχυση των προγραμμάτων παρακολούθησης του συστήματος υγείας. Στην Ισπανία, ανακοινώθηκε πρόγραμμα για δειγματοληψίες από 250 εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Στο Ισραήλ τον Μάρτιο του 2020 το Υπουργείο Υγείας και το Πανεπιστήμιο Ben Gurion ξεκίνησαν πρόγραμμα παρακολούθησης λυμάτων. Στις ΗΠΑ, η εταιρεία BioBot Analytics, ηγείται στο πρόγραμμα επιτήρησης των υγρών αποβλήτων από 400 εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων σε όλη τη χώρα (Schmidt, 2020). Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε το 2021 κατά τη διάρκεια της πανδημίας του COVID-19 σε λύματα της Βόρειας Ουαλίας στο Ηνωμένο Βασίλειο για την εύρεση γρίπης και άλλων παθογόνων (Kevill κ.ά., 2022) αλλά και στο Queensland της Αυστραλίας στα πλαίσια επιτήρησης αναπνευστικών ιών (Ahmed κ.ά., 2023). Στο Texas και στη Nevada του Las Vegas έγινε εβδομαδιαία παρακολούθηση του ιού της γρίπης μέσω της επιδημιολογίας λυμάτων σε σχολεία κατά την περίοδο της πανδημίας του COVID-19 (Vo κ.ά., 2023; Wolken κ.ά., 2023). Στην Κίνα η WBE χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί ο επιπολασμός των αντιβιοτικών κατά την περίοδο της γρίπης και στην Ιαπωνία για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των αντιικών φαρμάκων με σκοπό τη συσχέτισή τους με την περίοδο επιδημίας του ιού (Azuma κ.ά., 2015; Zhang κ.ά., 2019). Η επιδημιολογία λυμάτων έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές ακόμη χώρες όπως η Γερμανία και ο Καναδάς (de Melo κ.ά., 2023; Dumke κ.ά., 2022; Mercier κ.ά., 2022).

Στην Ελλάδα, κατά τη διάρκεια της πανδημίας του COVID-19, η επιδημιολογία λυμάτων χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό των αλλαγών στα επίπεδα κατανάλωσης φαρμάκων για τη χρονική περίοδο 2019-2020. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων της Αθήνας, οι οποίες εξυπηρετούν το 33% του συνόλου του ελληνικού πληθυσμού (Galani κ.ά., 2021). Στη Λάρισα, κατά τη χρονική περίοδο Οκτώβριος 2022- Ιανουάριος 2023, χρησιμοποιήθηκαν λύματα για την ανίχνευση του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV) και του SARS-CoV-2. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά των κέντρων επιτήρησης για πιθανή συσχέτιση (Koureas κ.ά., 2023).



Εικόνα 10 Διαδικασία προετοιμασίας λυμάτων (Wastewater Surveillance Testing Methods | National Wastewater Surveillance System | CDC, 2023)



13. Τρόποι Αντιμετώπισης

Ο ρυθμός μεταδοτικότητας της γρίπης αποτελεί απειλή για τη δημόσια υγεία καθώς μεγάλο μέρος του πληθυσμού πλήττεται ετησίως. Στον άνθρωπο, ο αιτιολογικός παράγοντας που προκαλεί λοιμώξεις είναι οι ιοί της γρίπης τύπου Α και Β και σε μικρότερο βαθμό ο ιός τύπου C. Σημαντική απειλή αποτελεί ο ιός τύπου Α καθώς λόγω της συχνής αντιγονικής παρέκκλισης (antigenic drift) παρακάμπτει την ανοσολογική απόκριση που προκύπτει μέσω του εμβολιασμού ή από παλαιότερη νόσηση.

Για την αντιμετώπιση της γρίπης γίνονται συνεχείς έρευνες σχετικά με τα καινούρια στελέχη και τις μεθόδους πρόληψης και αντιμετώπισης της νόσου. Τα αντιικά φάρμακα και τα εμβόλια αναδιαμορφώνονται κάθε χρόνο.

13.1. Εμβόλια

Η εποχική γρίπη εκτιμάται ότι μολύνει 1 στα 5 ανεμβολίαστα παιδιά και 1 στους 10 ανεμβολίαστους ενήλικες. Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), εκτιμάται ότι υπάρχουν 1 δισεκατομμύριο κρούσματα γρίπης, εκ των οποίων 3-5 εκατομμύρια είναι σοβαρά και οι θάνατοι εκτιμώνται μεταξύ 290.000 και 650.000 (0,1- 0,2% ποσοστό θνητότητας). Ο πλέον αποτελεσματικότερος τρόπος αντιμετώπισης της γρίπης είναι η πρόληψη μέσω των εμβολίων, ιδίως για την πρόληψη σοβαρής νόσου σε ηλικιωμένους ή άτομα με υποκείμενα νοσήματα και σε έγκυες. Η ανοσία στα βρέφη είναι παθητική και αποκτάται μέσω της μητέρας για τους πρώτους 6-9 μήνες (‘Γρίπη και Εποχική Γρίπη’, χ.χ.).

Τα εμβόλια κατά της γρίπης αναπτύχθηκαν για πρώτη φορά τις δεκαετίες του 1930 και 1940. Το 1952 το Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εφάρμοσε σύστημα επιτήρησης για την παρακολούθηση των στελεχών που κυκλοφορούσαν κάθε χρόνο. Αυτό βοήθησε στην ανάπτυξη εμβολίων που αντιστοιχούσαν σε εκείνα τα στελέχη. Τις επόμενες δεκαετίες τα ποσοστά εμβολιασμού κατά της γρίπης στους ηλικιωμένους άρχισαν να αυξάνονται (Dattani, Spooner, & Roser, 2023). Ο εμβολιασμός των παιδιών είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς μπορεί να μειώσει τη μετάδοση στην κοινότητα (*Estimating Disease Burden of Influenza*, χ.χ.). Ο εμβολιασμός σε ευπαθείς ομάδες είναι απαραίτητος και είναι αναγκαίο να επαναλαμβάνεται κάθε χρόνο στις αρχές του φθινοπώρου (‘Γρίπη και Εποχική Γρίπη’, χ.χ.). Άτομα που ανήκουν στις ευπαθείς ομάδες και που είναι πιθανό να αναπτύξουν σοβαρή νόσο είναι:

- Ενήλικες άνω των 65 ετών
- Παιδιά κάτω των 2 ετών
- Ασθενείς με άσθμα και χρόνιες παθήσεις (νευρολογικές, ενδοκρινολογικές, καρδιακές, νεφρικές και μεταβολικές παθήσεις)
- Άτομα με διαταραχές του αίματος (όπως δρεπανοκυτταρική αναιμία)
- Ασθενείς με χρόνιες πνευμονοπάθειες (όπως χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, κυστική ίνωση) και διαταραχές του ήπατος
- Παχύσαρκα άτομα και έγκυες



- Άτομα ηλικίας κάτω των 19 ετών που λαμβάνουν χρόνια θεραπεία που περιέχει ασπιρίνη ή σαλικυλικά
- Άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό (όπως καρκινοπαθείς και άτομα με AIDS)
- Άτομα που έχουν υποστεί εγκεφαλικό (CDC, 2023b)

Η ανοσολογική απόκριση δημιουργείται δύο εβδομάδες μετά τη χορήγηση του εμβολίου και επηρεάζεται από την ηλικία και από την κατάσταση υγείας του ξενιστή. Ωστόσο, η διαρκής εξέλιξη του ιού έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητας του εμβολίου κατά των νέων στελεχών έως και 60% (Kalarikkal & Jaishankar, 2023). Λόγω αυτών των μεταλλάξεων, τα στελέχη των εμβολίων πρέπει να αντικαθίστανται κάθε 1-3 χρόνια με άλλα πιο πρόσφατα στελέχη (Kawaoka & Neumann, 2012). Η αιμοσυγκολλητίνη είναι ο κύριος στόχος των εξουδετερωτικών αντισωμάτων, και λόγω αυτού αποτελεί κρίσιμο συστατικό των εμβολίων (Koel κ.ά., 2015). Υπάρχουν 3 τύποι εμβολίων κατά της γρίπης: τα εμβόλια που περιέχουν αδρανοποιημένο ιό (inactivated influenza vaccine-IIV), τα εμβόλια που περιέχουν ζωντανό εξασθενημένο (live attenuated influenza vaccine (LAIV) και τα ανασυνδυασμένα εμβόλια (recombinant influenza vaccines). Τα εμβόλια αδρανοποιημένου και ζωντανού εξασθενημένου ιού είναι τριδύναμα ή τετραδύναμα και αποτελούνται από στελέχη ιών αντιπροσωπευτικά ή αντιγονικά παρόμοια με εκείνα που κυκλοφορούν στον πληθυσμό την εκάστοτε χρονική περίοδο (Javanian κ.ά., 2021).

Η πλειοψηφία των τριδύναμων εμβολίων καλύπτει 2 στελέχη της γρίπης, το πανδημικό στέλεχος του 2009 A/H1N1pdm09 και το στέλεχος A/H3N2 και το στέλεχος της γρίπης B (Victoria). Η κυκλοφορία όμως δύο γενεαλογικών σειρών γρίπη τύπου B οδήγησε στη δημιουργία ενός τετραδύναμου εμβολίου, το οποίο παρέχει προστασία από τα δυο προαναφερθέντα στελέχη του ιού A και από τις δύο μεταλλάξεις του ιού B (Sridhar κ.ά., 2015). Πλέον στις Ηνωμένες Πολιτείες τα εμβόλια που χορηγούνται είναι τετραδύναμα (CDC, 2022a). Ωστόσο, λόγω συσσώρευσης μεταλλάξεων στις HA και NA στα στελέχη του ιού τύπου A (antigenic drift) η σύσταση των εμβολίων ανανεώνεται κάθε 1-3 χρόνια εισάγοντας στα εμβόλια τα πιο πρόσφατα στελέχη (Kawaoka & Neumann, 2012).

13.1.1.Εμβόλιο με αδρανοποιημένο ιό

Τα εμβόλια από αδρανοποιημένο ιό είναι τα πιο γνωστά αντιγριπικά εμβόλια και χρησιμοποιούνται ευρέως από τη δεκαετία του 1940 με ποσοστά προστασίας 75-90% (Sridhar κ.ά., 2015; Walter, 2020). Τα εμβόλια αυτά παράγονται σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας και περιέχουν υπομονάδες του ιού. Για την παραγωγή τους, ο ιός που έχει εμβολιαστεί στο αλλαντοϊκό υγρό καθαρίζεται, συμπυκνώνεται με φυγοκέντρηση ή σε χρωματογραφική στήλης και αδρανοποιείται. Το προϊόν που προκύπτει αναφέρεται ως εμβόλιο ολόκληρου ιού, το οποίο δεν χρησιμοποιείται πλέον. Το παρασκεύασμα στη συνέχεια διασπάται και καθαρίζεται από τα ιικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα. Μετά την εκχύλιση, σχηματίζονται κυστίδια που περιέχουν στις πρωτεΐνες HA και NA από τις οποίες προκύπτουν τα εμβόλια. Κάθε δόση εμβολίου περιέχει 15 mg HA από κάθε ιό για ενήλικες και μεγαλύτερα παιδιά και 7,5 mg για παιδιά ηλικίας <9 ετών (Knipe & Howley, 2013; Wong & Webby, 2013). Η ποσότητα της NA δεν είναι



τυποποιημένη καθώς η γλυκοπρωτεΐνη αυτή είναι ιδιαίτερα ευμετάβλητη κατά τον καθαρισμό και την αποθήκευση. Η μια δόση (0,5 mL) περιέχει 10 δισεκατομμύρια σωματίδια του ιού και ένα αυγό αποδίδει μία έως τρεις δόσεις εμβολίου. Τα αδρανοποιημένα εμβόλια χορηγούνται ενδομυϊκά ή, σπανιότερα, υποδόρια ή ενδοδερμικά (Knipe & Howley, 2013). Τα ΠIV εμβόλια προκαλούν αύξηση του τίτλου αντισωμάτων 2-6 ημέρες μετά των εμβολιασμό με κορύφωση 2 εβδομάδες μετά, τα αντισώματα στη συνέχεια μειώνονται με τη πάροδο του χρόνου, διατηρούνται ωστόσο πάνω από το προστατευτικό όριο (Sridhar κ.ά., 2015).

Τα αδρανοποιημένα εμβόλια (ΠIV) διατίθενται σε φιαλίδια μιας ή πολλαπλών δόσεων και σε προγεμισμένες σύριγγες. Συνιστάται η χορήγηση μιας δόσης στους ενήλικες και δύο δόσεων στα παιδιά. Από το 2019 χρησιμοποιούνται και τα εμβόλια υψηλής δόσης (QIV) που περιέχουν 60 mg HA ανά στέλεχος. Τα εμβόλια υψηλής δόσης προορίζονται για άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω (CDC, 2022a; Walter, 2020).

13.1.2. Εμβόλια με ζωντανό εξασθενημένο ιό

Τα εμβόλια με ζωντανό αδρανοποιημένο ιό γρίπης (LAIV) μιμούνται τη φυσική λοίμωξη προκαλώντας κυτταρική και χυμική ανοσία. Η χορήγησή του γίνεται ενδορινικά και προκαλεί μεγαλύτερης διάρκειας ανοσία ιδιαίτερα στα παιδιά κάτω των 6 ετών (CDC, 2022a; Sridhar κ.ά., 2015). Στις ΗΠΑ το εμβόλιο συνιστάται σε άτομα ηλικίας 2-49 ετών και στην Ευρώπη σε παιδιά ηλικίας 2-18 ετών (Sridhar κ.ά., 2015). Τα εμβόλια εξασθενημένων ιών είναι τριδύναμα ή τετραδύναμα. Μετά τη χορήγηση του εμβολίου στα παιδιά ο ιός απομονώνεται από τις ρινικές εκκρίσεις για έως και 7 ημέρες μετά. Το 2003 αναπτύχθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες αντίστοιχο εμβόλιο με εξασθενημένο ιό. Λόγω του κινδύνου που ενέχει η ανοσοποίηση με ζωντανούς ιούς, το εμβόλιο δεν ενδείκνυται για χρήση σε:

- Άτομα άνω των 50 ετών
- Άτομα με σοβαρές αλλεργίες σε οποιοδήποτε συστατικό του εμβολίου εκτός από την πρωτεΐνη αυγού
- Παιδιά ηλικίας 2-17 ετών που παίρνουν θεραπεία με ασπιρίνη ή σαλικιλικά
- Παιδιά ηλικίας 2-4 ετών που έχουν άσθμα
- Ανοσοκατεσταλμένους
- Έγκυες
- Άτομα με κοχλιακά εμφυτεύματα
- Άτομα που έχουν λάβει πρόσφατα αντιική θεραπεία
- Άτομα που έρχονται σε επαφή με ευπαθείς ομάδες

Επιπλέον, το εμβόλιο δε θα είναι αποτελεσματικό κατά των ιών που αναπτύσσονται στο κατώτερο αναπνευστικό (ιούς των πτηνών) (CDC, 2022a; Sridhar κ.ά., 2015; Wong & Webby, 2013). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι ζωντανοί εξασθενημένοι ιοί εμβολίων παράγονται πλέον με τη χρήση μεθόδων αντίστροφης γενετικής. Στη συνέχεια, τα εμβόλια καλλιεργούνται σε εμβρυοφόρα αυγά, εκκολάπτονται και συμπυκνώνονται (Sridhar κ.ά., 2015).



Οι παρενέργειες που μπορεί να προκαλέσει το εμβόλιο στα παιδιά είναι:

- Καταρροή
- Συριγμός
- Πονοκέφαλος
- Εμετός
- Μυαλγία
- Πονόλαιμος (σε μεγαλύτερα παιδιά)

Στους ενήλικες το εμβόλιο μπορεί να προκαλέσει:

- Καταρροή
- Πονοκέφαλο
- Βήχα (*Live Attenuated Influenza Vaccine [LAIV] (The Nasal Spray Flu Vaccine)* | CDC, 2023)

13.2. Άλλα είδη εμβολίων

13.2.1. Εμβόλιο από κυτταροκαλλιέργειες

Ο όρος “κυτταρικές” αναφέρεται στον τρόπο παρασκευής του εμβολίου κατά τον οποίο χρησιμοποιούνται κύτταρα θηλαστικών. Το μοναδικό εμβόλιο που έχει παρασκευαστεί από κυτταρικές καλλιέργειες θηλαστικών χρησιμοποιείται στις ΗΠΑ με τη φαρμακευτική ονομασία Flucelvax Quadrivalent και χρησιμοποιείται σε ενήλικες και παιδιά άνω των 6 μηνών. Η χρήση του αντενδείκνυται σε βρέφη κάτω των 6 μηνών και σε άτομα με σοβαρές αλλεργίες. Τα κύτταρα για την παρασκευή του Flucelvax Quadrivalent διατηρούνται κατεψυγμένα και αποθηκευμένα, γεγονός που διασφαλίζει την άμεση διάθεσή τους για την παραγωγή εμβολίων (CDC, 2022a).

13.2.2. Εμβόλια με χορήγηση υπό υψηλή πίεση

Το εμβόλιο χορηγείται μέσω μιας συσκευής που χρησιμοποιεί υγρό υπό υψηλή πίεση ώστε αυτό να διεισδύσει στο δέρμα αντί για βελόνα. Η συσκευή εφευρέθηκε το 1960 και έχει χρησιμοποιηθεί σε μαζικό εμβολιασμό για την πρόληψη της ευλογιάς και άλλων ασθενειών. Υπάρχει ένα διαθέσιμο εμβόλιο με χρήση της συσκευής ψεκασμού με φαρμακευτική ονομασία AFLURIA Quadrivalent και είναι τετραδύναμο. Το εμβόλιο αυτό είναι διαθέσιμο για άτομα ηλικίας άνω των 18 ετών και μπορεί να χορηγηθεί και με βελόνα σε παιδιά άνω των 6 μηνών. Πιθανές παρενέργειες είναι ευαισθησία, πρήξιμο και πόνος στο σημείο που χορηγείται καθώς και μυαλγία, κακουχία και πονοκέφαλος.



13.2.3. Συμπληρωματικό εμβόλιο γρίπης

Το συμπληρωματικό εμβόλιο γρίπης παράγεται από καλλιέργεια αυγών και περιέχει το συστατικό MF59 για ενίσχυση την ανοσολογικής απόκρισης. Το εμβόλιο αυτό έχει την ονομασία Flud Quadrivalent είναι τετραδύναμο και προορίζεται για άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών. Το συστατικό MF59 που περιέχει είναι ένα γαλάκτωμα από έλαιο σκουαλενίου, μιας φυσικής ένωσης που απαντάται στους ανθρώπους τα φυτά και τα ζώα. Η χρήση του μπορεί επίσης να μειώσει τη ποσότητα ιού που απαιτείται για την παραγωγή εμβολίων. Το Flud Quadrivalent δε χορηγείται σε άτομα με σοβαρές αλλεργίες στα συστατικά των εμβολίων (CDC, 2022a).

13.2.4. Τα ανασυνδυασμένα εμβόλια

Τα ανασυνδυασμένα εμβόλια παράγονται με τη χρήση ανασυνδυασμένης τεχνολογίας, χωρίς τη χρήση ιών από καλλιέργεια αυγών. Υπάρχει ένα διαθέσιμο εμβόλιο, το οποίο είναι τετραδύναμο και έχει την ονομασία Flublok Quadrivalent. Το FDA το ενέκρινε στις ΗΠΑ το 2013 και είναι κατάλληλο για χορήγηση σε άτομα 18 ετών και άνω και προτείνεται στα άτομα άνω των 65 η χορήγησή τους έναντι άλλων εμβολίων με τυπική δόση. Δεν επιτρέπεται η χορήγηση σε άτομα που δεν ανήκουν στην ηλικιακή ομάδα που εγκρίνει το FDA και σε άτομα με αλλεργίες στα συστατικά οποιουδήποτε εμβολίου (CDC, 2022a).

Όλοι οι ενήλικες και τα παιδιά άνω των 6 μηνών μπορούν να εμβολιαστούν κατά της γρίπης. Η επιλογή του εμβολίου επηρεάζεται από την ηλικία του ατόμου και την κατάσταση της υγείας του και το αν εμφανίζει αλλεργίες σε κάποιο συστατικό του εμβολίου. Για τα άτομα άνω των 65 ετών τα εμβόλια που προτείνονται (Adjuvanted Flu Vaccine και εμβόλιο υψηλής δόσης με αδρανοποιημένο ιό) είναι σχεδιασμένα να προκαλούν ισχυρότερη ανοσολογική απόκριση (CDC, 2023c). Στον Πίνακα 10 αναφέρονται ορισμένα εμβόλια, τα άτομα στα οποία απευθύνονται και ο αριθμός των ιών από τους οποία προστατεύουν.

Η δοσολογία διαφέρει ανάλογα με την ηλικία:

- Για παιδιά 6 μηνών έως 3 ετών που δεν έχουν εμβολιαστεί στο παρελθόν χορηγείται 0,25-0,5 ml εμβολίου σε δύο δόσεις με διαφορά τεσσάρων εβδομάδων
- Για παιδιά 3-8 ετών που δεν έχουν εμβολιαστεί στο παρελθόν χορηγείται 0,5ml εμβολίου σε 2 δόσεις με διαφορά τεσσάρων εβδομάδων, για παιδιά που έχουν ήδη εμβολιαστεί 1-2 δόσεις
- Για άτομα άνω των 9 ετών μια δόση των 0,5 ml
- Για ενήλικες άνω των 65 ετών η δόση του τετραδύναμου εμβολίου είναι 0,70 ml (*Seasonal Influenza Vaccine Dosage & Administration* | CDC, 2023)



Μετά τον εμβολιασμό παρατηρούν οι παρακάτω ανεπιθύμητες ενέργειες:

- Πόνος, ερυθρότητα και πρήξιμο στην περιοχή από την ένεση
- Πονοκέφαλος
- Πυρετός
- Ναυτία
- Μυαλγία (*Flu Vaccine Safety Information | CDC, 2023*)

Vaccine types	Ages	Types of influenza strains protected
Συμπληρωματικό εμβόλιο γρίπης	Ενήλικες άνω των 65 ετών	3
Τετρασθενές εμβόλιο	Άτομα ≥ 6 μηνών	4
Τετρασθενές εμβόλιο από κυτταροκαλλιέργεια	Άτομα ≥ 4 ετών	4
Ανασυνδυασμένο εμβόλιο	Άτομα ≥ 18 ετών	4
Τετρασθενές εμβόλιο με ζωντανό εξασθενημένο ιό	Όχι έγκυες, άτομα ηλικίας 2–49 ετών	4

Πίνακας 9 Εμβόλια, ηλικίες και ιοί από τους οποίους προστατεύουν

13.3. Αντιϊικά φάρμακα

Για την αντιμετώπιση της νόσου χορηγούνται είτε παυσίπονα, που αντιμετωπίζουν τα συμπτώματα της γρίπης χωρίς όμως να μειώνουν τη δράση του ιού, είτε αντιϊικά φάρμακα που μπορούν να μειώσουν τη διάρκεια της νόσου έως και κατά 50%. Προς το παρόν υπάρχουν τρεις καταχωρημένοι τύποι φαρμάκων ειδικοί στον ιό της γρίπης, η αμανταδίνη, οι αναστολείς της νευραμινιδάσης (NAIs) και οι αναστολείς ενδονουκλεάσης που είναι μια νέα ομάδα φαρμάκων κατά της γρίπης (Świerczyńska κ.ά., 2022). Ωστόσο, μεταλλάξεις στη νευραμινιδάση του ιού, όπως η μετάλλαξη H274Y στη γρίπη H1N1 και H5N1, έχουν επιδείξει σημαντική ανθεκτικότητα στα παρακάτω φάρμακα. Η αντιϊκή θεραπεία συνιστάται σε περιπτώσεις σοβαρών περιστατικών γρίπης ή σε άτομα που ανήκουν στις ευπαθείς ομάδες και διατρέχουν υψηλό κίνδυνο σοβαρής λοίμωξης ή επιπλοκών.

13.3.1. Αδαμαντάνες

Η αμανταδίνη και η ριμανταδίνη ανήκουν σε μια ομάδα αντιϊκών φαρμάκων που ονομάζονται αδαμαντάνες και είναι το πρώτο αντιϊκό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση της γρίπης. Είναι ένας αναστολέας διαύλου ιόντων, που σχηματίζονται από την πρωτεΐνη M2. Οι αδαμαντάνες είναι αποτελεσματικές κατά των ιών της γρίπης τύπου A αλλά όχι κατά των ιών της γρίπης τύπου B (Koutsakos κ.ά.,



2016). Με την αναστολή των διαύλων ιόντων, οι αδαμαντάνες εμποδίζει τα vRNPs να εξέλθουν στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων καταστέλλοντας έτσι την αντιγραφή του ιού (Kawaoka & Neumann, 2012). Ωστόσο, μέσω μεταλλάξεων έχουν δημιουργηθεί πολλά νέα στελέχη ανθεκτικά στην αμανταδίνη και τη ριμανταδίνη. Οι περισσότεροι ανθρώπινοι ιοί που κυκλοφορούν σήμερα (H1N1 και H3N2), ο πανδημικός ιός των χοίρων H1N1 και ορισμένοι ιοί της γρίπης (H5N1) υψηλής παθογονικότητας είναι πλέον ανθεκτικοί στους αναστολείς ιοντικών διαύλων (Kawaoka & Neumann, 2012; Świerczyńska κ.ά., 2022). Η χορήγησή της εκτιμάται ότι προκαλεί μείωση των συμπτωμάτων κατά 50%, εάν η θεραπεία αρχίσει τις πρώτες 48 ώρες της. Λόγω της αυξημένης παγκόσμιας αντοχής, οι αδαμαντάνες δεν συνιστάται για τη θεραπεία της γρίπης από το 2006 (Świerczyńska κ.ά., 2022).

13.3.2. Αναστολείς Νευραμινιδάσης

Οι αναστολείς της νευραμινιδάσης, Oseltamivir, Zanamivir και Peramivir εισήχθησαν στην αγορά φαρμάκων στα τέλη της δεκαετίας του 1990 και σήμερα είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος αντιμετώπισης της γρίπης. Η δράση τους είναι ανασταλτική για τον πολλαπλασιασμό του ιού *in vivo* και *in vitro* και έχουν πολύ καλό επίπεδο αποτελεσματικότητας και αποδοτικότητας κατά του ιού Α και Β (Javanian κ.ά., 2021). Οι αναστολείς της νευραμινιδάσης μιμούνται τη θέση δέσμευσης του σιαλικού οξέος και όταν εισάγονται δεσμεύουν τη νευραμινιδάση του εκκολαπτόμενου ιού εμποδίζοντας την ενζυμική της δραστηριότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο ιός της γρίπης να παραμένει δεσμευμένος στην επιφάνεια του κυττάρου του ξενιστή και να μην είναι σε θέση να εξαπλώσει τη μόλυνση. Όλοι είναι αποτελεσματικοί έναντι των ιών Α και Β, εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα σε αντίθεση με τις αδαμαντάνες και είναι λιγότερο πιθανό να προωθήσουν την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών. Προς το παρόν, οι NAIs συνιστώνται για προφύλαξη και χορηγούνται στους ασθενείς με υποψία ή επιβεβαιωμένη νόσος (Gubareva κ.ά., 2000).

13.3.2.1. Zanamivir-Relenza

Το 1999 εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τη θεραπεία της λοίμωξης από γρίπη τύπου Α και Β ο πρώτος αναστολέας νευραμινιδάσης, η ζαναμιβίρη (zanamivir) ως σκεύασμα σκόνης με την εμπορική ονομασία Relenza για χορήγηση από το στόμα και Dectona σε μορφή διαλύματος για ενδοφλέβια χορήγηση (Gubareva κ.ά., 2000; Świerczyńska κ.ά., 2022). Η χορήγησή της συνιστάται για τη θεραπεία της οξείας γρίπης εντός 2 ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων και για προφύλαξη κατά του ιού σε ενήλικες και παιδιά άνω των 7 ετών (Javanian κ.ά., 2021). Η χρήση του zanamivir αντενδείκνυται σε άτομα με σοβαρές αλλεργίες στις πρωτεΐνες του γάλακτος. Οι ανεπιθύμητες παρενέργειες της ζαναμιβίρης περιλαμβάνουν βήχα, πονοκέφαλο, βρογχόσπασμο, ναυτία, έμετο, πυρετό και μυαλγία (Heneghan κ.ά., 2014; Laborda κ.ά., 2016).



13.3.3. Oseltamivir- Tamiflu

Το 2002 εγκρίθηκε η χρήση της οσελταμιβίρης (oseltamivir) η οποία καταχωρίστηκε για πρώτη φορά για ιατρική χρήση το 1999 στις ΗΠΑ για χρήση από το στόμα ως Tamiflu (Gubareva κ.ά., 2000; Świerczyńska κ.ά., 2022). Συνιστάται για τη θεραπεία της οξείας λοίμωξης με χορήγηση έως και 48 ώρες από τη έναρξη των συμπτωμάτων σε ενήλικες και παιδιά ηλικίας άνω των 2 εβδομάδων, χορηγείται επίσης για την προφύλαξη από τη νόσο σε άτομα μεγαλύτερα του 1 έτους. Το oseltamivir εμφανίζει καλύτερη ανασταλτική δράση σε σχέση με το zanamivir έναντι των νευραμινιδασών της γρίπης H2N2 και H3N2 (Laborda κ.ά., 2016). Οι παρενέργειες που έχουν αναφερθεί περιλαμβάνουν ναυτία, έμετο, κοιλιακό άλγος, εξάνθημα, παραλήρημα και αναιμία (Javanian κ.ά., 2021). Ωστόσο, τόσο το zanamivir όσο και το oseltamivir προστατεύουν από το στέλεχος H5N1 που προκάλεσε επιδημία το 1997 στο Χονγκ Κονγκ (Gubareva κ.ά., 2000).

13.3.3.1. Peramivir- Rapivab, Rapiacta, Peramiflu

Το peramivir είναι το πιο πρόσφατο εμπορικό φάρμακο για την αντιμετώπιση του ιού της γρίπης και χορηγείται ενδοφλέβια εντός 48 ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων (Laborda κ.ά., 2016). Η χρήση του δεν έχει εγκριθεί ακόμη για προφύλαξη ή για τη θεραπεία σε παιδιά. Η χορήγηση του επιφέρει μείωση των συμπτωμάτων και της σοβαρότητας της νόσου και οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν διάρροια, δυσκοιλιότητα, αϋπνία και υπέρταση (Javanian κ.ά., 2021).

13.3.3.2. Laninamivir

Το Laninamivir είναι ένας νέος αναστολέας νευραμινιδάσης, σε μορφή εισπνεόμενου, ο οποίος έχει εγκριθεί μόνο στην Ιαπωνία (Gubareva κ.ά., 2000). Η συγκέντρωση του laninamivir υπερβαίνει το επίπεδο που απαιτείται για την αναστολή του πολλαπλασιασμού του ιού για τουλάχιστον 5 ημέρες, επομένως η γρίπη μπορεί να αντιμετωπιστεί με μία μόνο χορήγηση. Το φάρμακο χορηγείται μέσω μιας συσκευής που περιέχει 4 εισπνεόμενες δόσεις. Στα παιδιά χορηγείται μια συσκευή των 4 δόσεων και στους ενήλικες απαιτούνται 2 συσκευές για 8 εισπνοές (Ikematsu & Kawai, 2011).

13.3.4. Αναστολείς ενδονουκλεάσης

Το baloxavir marboxil είναι αναστολέας ενδοκουκλεάσης, έχει παρεμβατική δράση στην μεταγραφή του ιικού RNA και αναστέλλει την ιική αντιγραφή, σταματώντας τον πολλαπλασιασμό του ιού. Το baloxavir χορηγείται, ως εφάπαξ δόση, 48 ώρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων σε ενήλικες και παιδιά άνω των 12 ετών και δεν έχει εγκριθεί



ακόμη η χρήση του για προφύλαξη κατά του ιού. Οι αναφερθείσες παρενέργειες περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, ναυτία και διάρροια (Javanian κ.ά., 2021).

14. Ανθεκτικότητα στα αντιϊικά φάρμακα

Η έγκαιρη αντιϊκή θεραπεία μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για σοβαρή νόσο ή θάνατο από τον ιό της γρίπης. Ωστόσο, η χρήση των αντιϊκών παραγόντων οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικών σε αυτούς στελεχών κάνοντας δύσκολη την επιλογή της φαρμακευτικής αγωγής για θεραπεία ή χημειοπροφύλαξη. Η αμανταδίνη και η ριμανταδίνη είναι συγγενή αντιϊικά φάρμακα, γνωστά και ως αδαμαντάνες. Η χρήση τους οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών, με τα ποσοστά ανθεκτικότητας να αυξάνονται ραγδαία στο 12,3% για το διάστημα 2003-2004 από 0,4% που ήταν κατά την περίοδο 1994-1995. Κατά τη διάρκεια της εποχικής γρίπης το 2005-2006, το CDC διαπίστωσε ότι 193 από τους 209 ιούς γρίπης A/H3N2, δηλαδή το 92%, που απομονώθηκαν από 26 πολιτείες παρουσίαζαν μετάλλαξη στο γονίδιο M2 που τους πρόσδιδε αντοχή στις αδαμαντάνες. Ανθεκτικότητα ανιχνεύτηκε και στο πανδημικό στέλεχος A/H1N1pdm09, κάνοντας τις αδαμαντάνες ακατάλληλες για κλινική χρήση.

Το oseltamivir και το zanamivir είναι τα πιο γνωστά φαρμακευτικά προϊόντα κατά της γρίπης και καλύπτουν >99% των κυκλοφορούντων στελεχών. Ωστόσο, σποραδικές λοιμώξεις από τον ιό A/H1N1pdm09 έδειξαν αντοχή στο oseltamivir με περιορισμένο αντίκτυπο στη δημόσια υγεία (*Antiviral Agents for the Treatment and Chemoprophylaxis of Influenza*, χ.χ.).

15. Άλλα μέτρα πρόληψης και θεραπείας

Εκτός από τη θεραπευτική αγωγή και τον εμβολιασμό, εξίσου σημαντικά για τον περιορισμό της γρίπης είναι και τα μέτρα ατομικής προστασίας. Η χρήση μάσκας, η υγιεινή των χεριών καθώς και η απομόνωση σε περίπτωση ασθένειας είναι τα βασικότερα μέτρα πρόληψης. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η απολύμανση των κλειστών χώρων ειδικά σε περιόδους έξαρσης του ιού (CDC, 2021). Σε περίπτωση νόσησης η συνήθης θεραπεία είναι η κατάκλιση, η λήψη υγρών και η χρήση αναλγητικών για τον έλεγχο του πυρετού. Η χορήγηση ασπιρίνης δε συνιστάται σε παιδιά και εφήβους, καθώς η θεραπεία των ιογενών λοιμώξεων με ασπιρίνη συνδέεται με σύνδρομο Reye (1957 *Flu Pandemic | Cause, History, Deaths, & Facts | Britannica*, 2023).



*«Ντότσικα Ευρυδίκη», «Ανίχνευση του ιού της γρίπης
στα αστικά λύματα»*

Ειδικό μέρος



1. Σκοπός και στόχοι

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανίχνευση του ιού της γρίπης σε αστικά λύματα της Λάρισας, του Βόλου, της Ξάνθης και της Αλεξανδρούπολης. Οι επιμέρους στόχοι της παρούσας εργασίας είναι:

1. Σχεδιασμός, δοκιμή και ενσωμάτωση στις τεχνικές του εργαστηρίου πρωτοκόλλου multiplex real time RT-PCR για ανίχνευση, τυποποίηση και υποτυποποίηση του ιού γρίπης
2. Σύγκριση της μεθόδου συμπύκνωσης κατακρήμνισης με PEG/NaCl και της μεθόδου κατακράτησης με στήλες PROMEGA

2. Υλικά και μέθοδοι

Για τις ανάγκες της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αστικών λυμάτων από 4 πόλεις, 57 από τη Λάρισα, 54 από τον Βόλο, 57 από τη Ξάνθη και 57 από την Αλεξανδρούπολη. Η συλλογή των δειγμάτων γινόταν από τις πύλες εισόδου των βιολογικών καθαρισμών, όπου αυτόματη συσκευή έκανε συλλογή λυμάτων καθ' όλη τη διάρκεια του 24ώρου, ώστε να εξασφαλίζεται η αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος. Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν 2-3 φορές την εβδομάδα για το διάστημα Ιανουάριος 2023-Μάιος 2023. Η μεταφορά των δειγμάτων γινόταν στους 4° C εντός 24 ωρών από την ώρα της συλλογής και ο αρχικός τους όγκος ήταν 500ml. Συλλέχθηκαν συνολικά 225 λύματα σε διάστημα 22 εβδομάδων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε screening με IVD TaqPath™ COVID-19,FluA/B, RSV Combo Kit της ThermoScientific, και στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα θετικά στον ιό της γρίπης δείγματα για τυποποίηση και υποτυποποίηση. Ακολουθεί πίνακας με τις εβδομάδες και τον αριθμό δειγμάτων που ελήφθησαν από κάθε πόλη (**Πίνακας 11**).



«Ντότσικα Ευρυδίκη», «Ανίχνευση του ιού της γρίπης στα αστικά λύματα»

Εβδομάδες Πόλεις		Αριθμός δειγμάτων	Εβδομάδες	Πόλεις	Αριθμός δειγμάτων
1η εβδομάδα	Λάρισα	2	12η εβδομάδα	Λάρισα	2
	Βόλος	0		Βόλος	3
	Ξάνθη	0		Ξάνθη	3
	Αλεξ/πολη	0		Αλεξ/πολη	3
2η εβδομάδα	Λάρισα	3	13η εβδομάδα	Λάρισα	3
	Βόλος	0		Βόλος	3
	Ξάνθη	0		Ξάνθη	3
	Αλεξ/πολη	0		Αλεξ/πολη	3
3η εβδομάδα	Λάρισα	3	14η εβδομάδα	Λάρισα	3
	Βόλος	3		Βόλος	3
	Ξάνθη	3		Ξάνθη	3
	Αλεξ/πολη	3		Αλεξ/πολη	3
4η εβδομάδα	Λάρισα	3	15η εβδομάδα	Λάρισα	2
	Βόλος	3		Βόλος	2
	Ξάνθη	3		Ξάνθη	2
	Αλεξ/πολη	3		Αλεξ/πολη	1
5η εβδομάδα	Λάρισα	3	16η εβδομάδα	Λάρισα	2
	Βόλος	3		Βόλος	2
	Ξάνθη	3		Ξάνθη	3
	Αλεξ/πολη	3		Αλεξ/πολη	3
6η εβδομάδα	Λάρισα	3	17η εβδομάδα	Λάρισα	3
	Βόλος	3		Βόλος	3
	Ξάνθη	2		Ξάνθη	3
	Αλεξ/πολη	3		Αλεξ/πολη	3
7η εβδομάδα	Λάρισα	3	18η εβδομάδα	Λάρισα	2
	Βόλος	3		Βόλος	2
	Ξάνθη	3		Ξάνθη	3
	Αλεξ/πολη	3		Αλεξ/πολη	3
8η εβδομάδα	Λάρισα	3	19η εβδομάδα	Λάρισα	3
	Βόλος	3		Βόλος	3
	Ξάνθη	3		Ξάνθη	3
	Αλεξ/πολη	3		Αλεξ/πολη	3
9η εβδομάδα	Λάρισα	2	20η εβδομάδα	Λάρισα	2
	Βόλος	2		Βόλος	3
	Ξάνθη	3		Ξάνθη	3
	Αλεξ/πολη	3		Αλεξ/πολη	3
10η εβδομάδα	Λάρισα	3	21η εβδομάδα	Λάρισα	3
	Βόλος	3		Βόλος	3
	Ξάνθη	3		Ξάνθη	3
	Αλεξ/πολη	3		Αλεξ/πολη	3



11η εβδομάδα	Λάρισα	2	22η εβδομάδα	Λάρισα	2
	Βόλος	3		Βόλος	1
	Ξάνθη	3		Ξάνθη	2
	Αλεξ/πολη	3		Αλεξ/πολη	2

Πίνακας 10 Πόλεις, εβδομάδες και αριθμός δειγμάτων

2.1. Μέθοδος κατακρήμνισης με PEG/NaCl

Η μέθοδος διήρκησε 3-4 ώρες και χρησιμοποιήθηκε αρχικός όγκος 105 ml και στη συνέχεια συμπυκνώθηκε σε 400 μl. Στο αρχικό δείγμα προστέθηκε 1,5 ml γλυκίνης και ακολούθησε ανάδευση για 30 λεπτά σε μαγνητικό αναδευτήρα ώστε να αποδεσμευτεί ο ιός από τα στερεά στοιχεία. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 4.000 g για 30 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά υλικά. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο στο οποίο προστέθηκαν 10,5 gr PEG και 2,364 gr NaCl και το δείγμα αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε για δύο ώρες στα 12.000 g. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα συλλέχθηκε χρησιμοποιώντας 400 μl PBS για την αποκόλλησή του (Παράρτημα Α).

2.2. Εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος

Μετά τη συμπύκνωση των δειγμάτων με τη μέθοδο κατακρήμνισης ακολουθεί η εκχύλιση του ιικού RNA για την απομάκρυνση του γενετικού υλικού. Χρησιμοποιήθηκε αυτόματη συσκευή ανοιχτού τύπου KingFisher Apex της εταιρείας ThermoScientific και το MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit. Η εκχύλιση βασίζεται στη μέθοδο των μαγνητικών σφαιριδίων όπου χρησιμοποιήθηκαν 200 μl δείγματος και το τελικό έκλουσμα είχε όγκο 50 μl.

Χρησιμοποιήθηκαν 4 πλάκες των 96 βοθρίων (Wash 1, Wash 2, Sample και Elution). Στην πλάκα 1 προστέθηκαν 500 μl Wash 1, στην πλάκα 2 προστέθηκαν 1000 μl διάλυμα αιθανόλης 80% ως Wash 2 και στην πλάκα Elution προστέθηκαν 50 μl H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς σε όσες θέσεις απαιτείτο. Στην πλάκα Samples προστέθηκαν 5 μl πρωτεΐνάσης K, 10 μl βακτηριοφάγου MS2 και 200 μl δείγματος σε κάθε βοθρίο, αφού πρώτα ανακινήθηκαν καλά. Παρασκευάστηκε μίγμα Binding Solution (265μl) και Total Nucleic Acid Magnetic Beads (10μl) για κάθε δείγμα, και μοιράστηκαν 275μl σε κάθε βοθρίο. Οι 4 πλάκες, μαζί με ρύγχη και βάση για τα ρύγχη, τοποθετήθηκαν στην αυτόματη συσκευή ανοιχτού κώδικα KingFisher Apex της ThermoScientific. Το γενετικό υλικό που απομονώθηκε βρίσκεται στην πλάκα Elution. Στη συνέχεια, η πλάκα καλύφθηκε με αυτοκόλλητο MicroAmp™ Clear Adhesive Film, για την αποφυγή οποιαδήποτε επιμόλυνσης και τοποθετήθηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι την ανάλυσή της (Παράρτημα Β).



2.3. Μέθοδος συμύκνωσης PROMEGA

Η μέθοδος του συστήματος κενού PROMEGA είναι μια σύγχρονη και ταχεία μέθοδος, στην οποία ενσωματώνονται η συμύκνωση και η εκχύλιση σε μια διαδικασία διάρκειας 2 ώρες. Ο απαιτούμενος όγκος είναι 40 ml από το αρχικό δείγμα και χρησιμοποιήθηκε το Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit, του οίκου Promega. Στο δείγμα των 40 ml προστέθηκε 500 μl πρωτεϊνάσης για την απελευθέρωση του RNA. Ακολούθησε επώαση και φυγοκέντρηση στα 3.000 g ώστε να καθιζάνουν τα στερεά στοιχεία και στη συνέχεια το υπερκείμενο χωρίστηκε σε δύο falcon, όπου προστέθηκαν σε καθένα από αυτά 12 ml Binding Buffer 1 (BBD) και 0,5 ml Binding Buffer 2 (BBE). Αναμίχθηκαν και προστέθηκαν σε αυτά από 24 ml ισοπροπανόλης. Το μίγμα πέρασε από φίλτρο μέσω της συσκευής κενού Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold και ακολούθησαν δύο στάδια καθαρισμού με 5 ml Column Wash 1 και 20 ml Column Wash 2. Προστέθηκαν 500 μl H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς το οποίο είχε προθερμανθεί στους 60° C και συλλέχθηκαν σε αποστειρωμένο Eppendorf, το οποίο ήταν τοποθετημένο στην Eluator™ κατασκευή, αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές (PROMEGA, 2023).

Στο eppendorf προστέθηκαν 400μl BBD και 100μl BBE, αναδεύτηκαν, μοιράστηκαν σε δύο νέα eppendorf και προστέθηκαν σε αυτά 750 μl ισοπροπανόλης. Το προϊόν που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε σε μικροφυγόκεντρο στις 10.000 rpm για 1 λεπτό και πέρασε από μικροστήλες. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 300μl Column Wash 1 και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm για 1 λεπτό, έπειτα ακολούθησε προσθήκη 500μl Column Wash 2 και φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm για 1 λεπτό, για να περάσει όλη η ποσότητα από το φίλτρο της μικροστήλης. Οι μικροστήλες στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα eppendorf και προστέθηκαν 20μl H₂O απαλλαγμένο από αναστολείς, προθερμασμένο στους 60°C, φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000rpm για 1 λεπτό, ώστε να γίνει εκχύλιση του γενετικού υλικού που ήταν παγιδευμένο στο φίλτρο. Το βήμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Το αποστειρωμένο eppendorf που περιέχει 40μl εκλούμενου γενετικού υλικού αποθηκεύτηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80°C), μέχρι την χρήση του (PROMEGA, 2023) (Παράρτημα Γ).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε συμύκνωση όλων των δειγμάτων με τη μέθοδο PROMEGA.

2.4. Ενίσχυση γενετικού υλικού

Ακολούθησε η ενίσχυση του γενετικού υλικού όπου χρησιμοποιήθηκε IVD kit της ThermoFisher Scientific για το screening και στη συνέχεια ακολούθησε in house πρωτόκολλο με Invitrogen™ SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν προτείνονται από τον WHO. Στην real time RT-PCR πολλαπλών στόχων που διενεργήθηκε χρησιμοποιήθηκαν 5 ζεύγη εκκινητών και ανιχνευτές για την ανίχνευση των ιών A και B και την υποτυποποίησή τους στους ιούς A/H3N2, A/H1N1 και A/H1N1pdm09 στα θετικά από το screening δείγματα. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στόχευσαν στο γονίδιο της πρωτεΐνης (M) για τον ιό



τύπου Α, στο γονίδιο νουκλεοπρωτεΐνης (NP) για τον ιό τύπου Β και για στα γονίδια της αιμοσυγκολλητίνης (HA) για τους υπότυπους Α/Η3Ν2, Α/Η1Ν1 και Α/Η1Ν1pdm09. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

<u>Influenza A (matrix)</u>	
FLU-A-M-F 5'	CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA - 3'
FLU-A-M-R 5'	GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA - 3'
FLU-A-M-P 5'	FAM – TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG -BHQ1 - 3'
<u>Influenza B (HA)</u>	
FLU-B-HA-F 5'	AAATACGGTGGATTAAACAAAAGCAA - 3'
FLU-B-HA-R 5'	CCAGCAATAGCTCCGAAGAAA - 3'
FLU-B-HA-P 5'	TXR – CACCCATATTGGGCAATTTCCTATGGC -BHQ1 - 3'
<u>A(H1)pdm09</u>	
AH1_F 5'	TTA CCA GAT TTT GGC RAT CTA YT - 3'
AH1_R 5'	CCA GGG AGA CTA SCA RTA CCA - 3'
AH1_P1 5'	FAM – ACW GTY GCC AGT TC - MGBNFQ 3'
AH1_P2 5'	FAM – ACW GCY GCC AGT TC - MGBNFQ 3'
<u>Influenza A H3</u>	
AH3_F 5'	TGG GAC CTT TTY GTT GAA MG - 3'
AH3_R 5'	CGG ATG AGG CAA CTA GTG AYC TA - 3'
AH3_P 5'	VIC - CCW ACA GCA ACT GTT AYC - MGBNFQ 3'
<u>Former seasonal A(H1N1)</u>	
H1frm_F 5'	CCCAGGGYATTTTCGCGYACTATGAG - 3'
H1frm_R 5'	CATGATGCTGAYACTCCGGTTACG - 3'
H1frm_P 5'	FAM TCTCAAAYGAAGATACTGAACT -MGBNFQ 3'

Πίνακας 11 Εκκινητές και ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν

Το μίγμα δημιουργήθηκε βάσει πρωτοκόλλου WHO και λοιπής βιβλιογραφίας, οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε δείγμα φαίνονται στον **Πίνακα 13**.

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

Πίνακας 12 Ποσότητες αντιδραστηρίων MasterMix ανά δείγμα



Μετά την παρασκευή του MasterMix σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, μοιράστηκαν 45 μl από αυτό σε πλάκα 96 βοθρίων ανάλογα με τον όγκο των δειγμάτων. Έπειτα προστέθηκαν 5 μl εκλουόμενου RNA και θετικός μάρτυρας στις αντίστοιχες θέσεις. Η πλάκα σφραγίστηκε με αυτοκόλλητο MicroAmp™ Clear Adhesive Film, αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε. Οι θερμοκρασιακές συνθήκες της PCR παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί:

Στάδια	Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
επώαση	1	50o C	20'
αντίστροφη μεταγραφή	1	95oC	2'
ενεργοποίηση πολυμεράσης	1	95oC	25'
ενίσχυση	40	60oC	1'10"

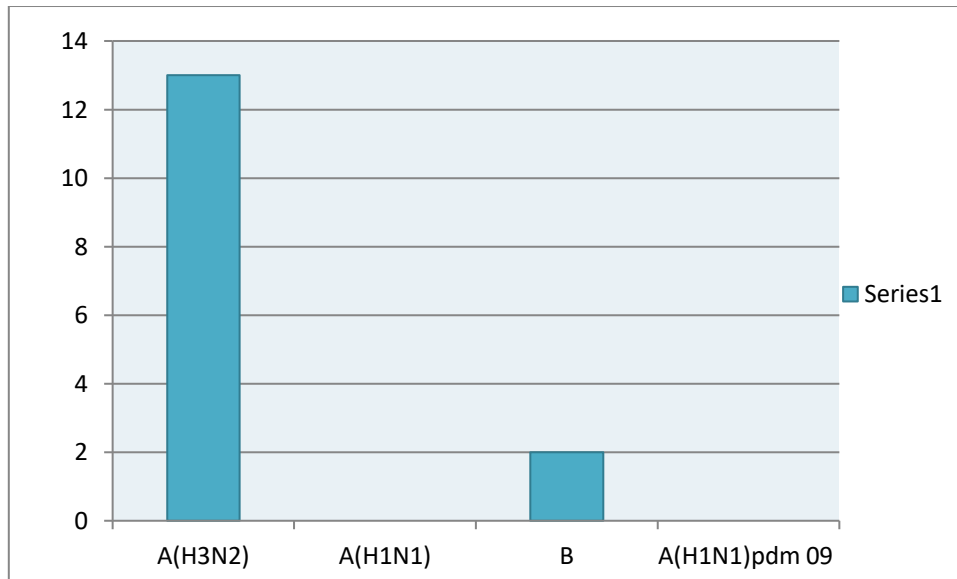
Πίνακας 13 Συνθήκες θερμοκρασιών και χρόνων PCR

Τέλος, η πλάκα τοποθετήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή QuantStudio™ 5 Real-Time της ThermoFisherScientific, ρυθμίστηκαν οι συνθήκες της real time RT-PCR. Το αποτέλεσμα της PCR αναλύεται από το πρόγραμμα Design and Analysis της εταιρείας ThermoFisher Scientific σε πραγματικό χρόνο και αποτυπώνεται με καμπύλες (Παράρτημα Δ).



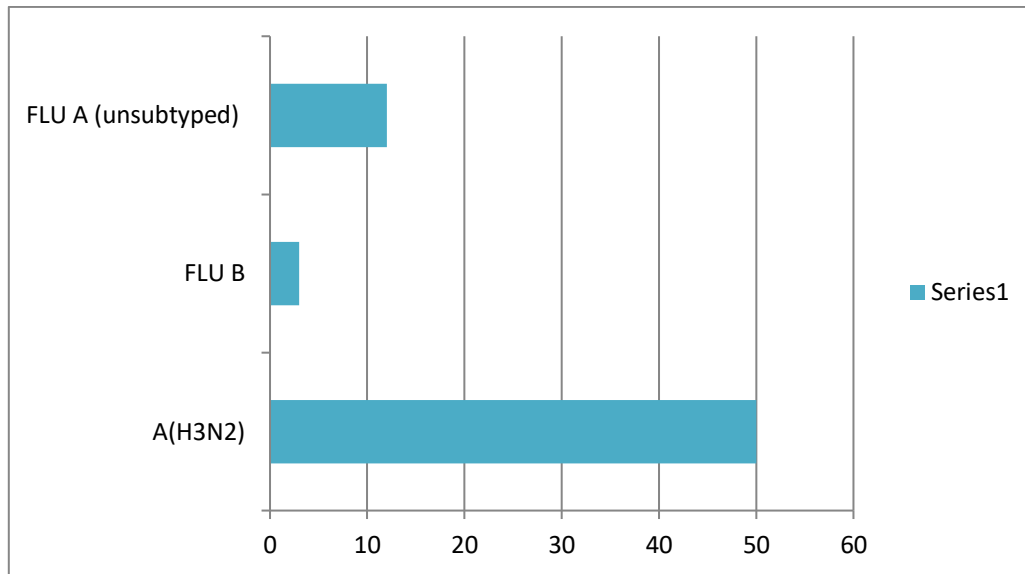
3. Αποτελέσματα

Για τις ανάγκες της εργασίας αναλύθηκαν συνολικά 225 δείγματα λυμάτων. Ο ιός βρέθηκε στο 8,4% (19 δείγματα) του συνόλου των λυμάτων. Από το σύνολο των θετικών δειγμάτων υποτυποποιήθηκαν τα 13, ο ιός τύπου Α απομονώθηκε από το 100% των δειγμάτων που υποτυποποιήθηκαν και ο ιός τύπου Β από το 15,4% (2 δείγματα), ωστόσο δε βρέθηκαν οι A/H1N1 και A/H1N1pdm 09 (**Πίνακας 15**).



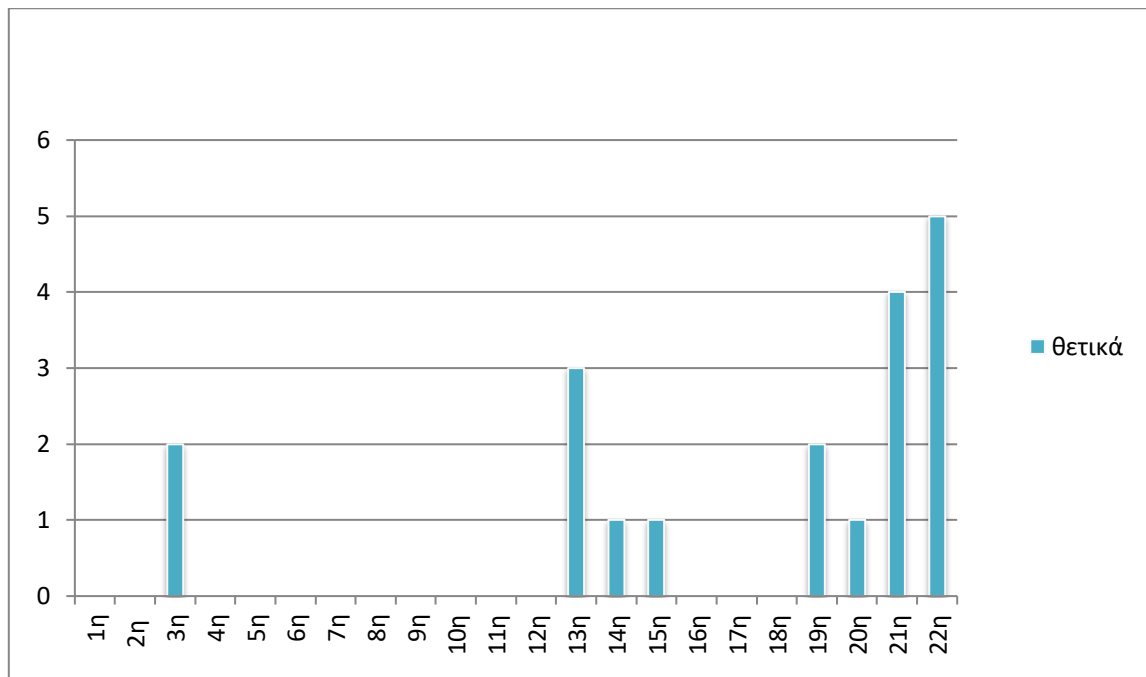
Πίνακας 14 Ανίχνευση του ιού στα λύματα

Τα ευρήματα από το μοριακό έλεγχο των περιβαλλοντικών δειγμάτων συγκρίθηκαν με αποτελέσματα κλινικών δειγμάτων που αναλύθηκαν στο εργαστήριο. Η τυποποίηση και υποτυποποίηση των κλινικών δειγμάτων ανέδειξε παρόμοια αποτελέσματα. Αναλυτικότερα, σε 65 θετικά στον ιό της γρίπης κλινικά δείγματα, ο ιός τύπου Α βρέθηκε στο 95,3% (62 δείγματα) με τον υπότυπο A/H3N2 να κυριαρχεί 77% (50 δείγματα), το 18,5% δεν υποτυποποιήθηκε (12 δείγματα) ενώ ο τύπος Β ανιχνεύτηκε στο 4,7% (3 δείγματα) των δειγμάτων (**Πίνακας 16**).



Πίνακας 15 Ανίχνευση του ιού στα κλινικά δείγματα

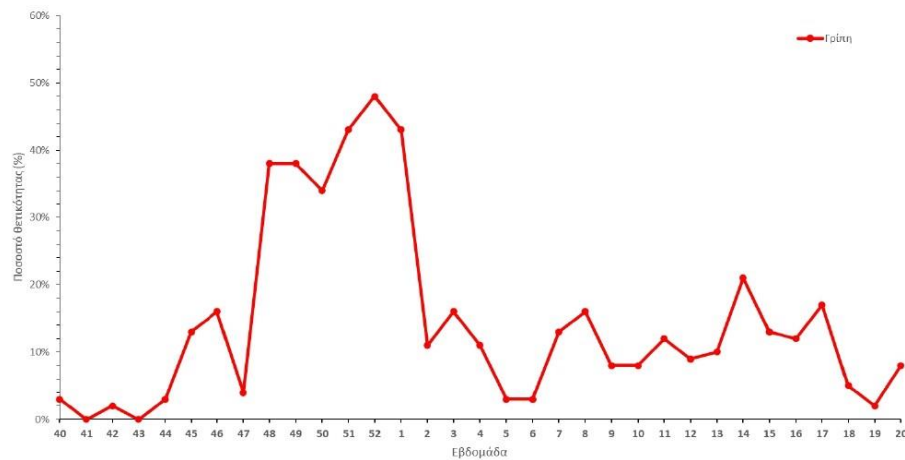
Αύξηση της θετικότητας στα λύματα παρατηρήθηκε στα διαστήματα 13^η-14^η και 21^η-22^η εβδομάδα (**Πίνακας 17**). Από την επιδημιολογική επιτήρηση του ΕΟΔΥ για τη χρονική περίοδο 40^η εβδομάδα/2022 έως 20^η εβδομάδα 2023, αύξηση της θετικότητας παρατηρείται την 52^η/2022 και τις εβδομάδες 13^η-14^η ('Γρίπη και Εποχική Γρίπη', χ.χ.). Τα ευρήματα της εργασίας συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα των εκθέσεων του ΕΟΔΥ για τη χρονική περίοδο 13^η-14^η εβδομάδα.



Πίνακας 16 Θετικά στον ιό λύματα ανά εβδομάδα



«Ντότσικα Ευρυδίκη», «Ανίχνευση του ιού της γρίπης στα αστικά λύματα»



Πίνακας 17 Ποσοστό θετικότητας ρινοφαρυγγικών δειγμάτων για SARS-CoV-2, ιούς γρίπης και αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), από ασθενείς με γριπώδη συνδρομή σε δομές ΠΦΥ (Δίκτυο Sentinel ΠΦΥ), σύνολο χώρας, εβδομάδα 40/2022 – εβδομάδα 20/2023 (‘Γρίπη και Εποχική Γρίπη’, χ.χ.)

Από τη σύγκριση των δύο μεθόδων συμπύκνωσης αποδείχθηκε ότι η μέθοδος PROMEGA παρουσίασε μεγαλύτερη ανάκτηση κατά 4 φορές σε σχέση με τη μέθοδο PEG/NaCl.



4. Συζήτηση

Το πολυτεμαχισμένο γονιδίωμά του ιού της γρίπης ευνοεί τις μεταλλάξεις, στις οποίες οφείλονται οι επιδημίες και οι πανδημίες. Ο ιός τύπου Α, μεταλλάσσεται έντονα και προκαλεί πανδημίες, με πιο πρόσφατη αυτή της γρίπης των χοίρων το 2009, κατά την οποία το εκτιμώμενο εύρος θανάτων κυμαίνεται μεταξύ 151.700 και 575.400 την πρώτη χρονιά της πανδημίας. Υπολογίζεται ότι ετησίως οι θάνατοι από τους ιούς της γρίπης φτάνουν τους 650.000. Οι ομάδες υψηλού κινδύνου διατρέχουν μεγαλύτερες πιθανότητες εμφάνισης επιπλοκών.

Οι ιοί που έχουν επικρατήσει τα τελευταία 14 χρόνια είναι οι υπότυποι A/H3N2 και A/H1N1pdm09 και οι ιοί τύπου Β. Οι ιοί τύπου Α εντοπίζονται στο μεγαλύτερο ποσοστό των κρουσμάτων και είναι πιο πιθανό να προκαλέσουν επιπλοκές και νοσηλεία σε ΜΕΘ. Τα 3 τελευταία χρόνια, μετά την έναρξη της πανδημίας του COVID-19, η μόλυνσεις από ιούς γρίπης μειώθηκαν παγκοσμίως. Τα μέτρα ατομικής προστασίας, η μείωση των μετακινήσεων και η απομόνωση των κρουσμάτων με γριπώδη συνδρομή είχαν ως αποτέλεσμα την ελάττωση των κρουσμάτων γρίπης. Ωστόσο, για την περίοδο 2022-2023 η χαλάρωση των μέτρων κατά της πανδημίας αλλά και η μείωση των εξάρσεων Sars-CoV-2, επανάφερε τις μόλυνσεις από τους ιούς της γρίπης. Πιο συγκεκριμένα, σε πανευρωπαϊκό επίπεδο το 23% των δειγμάτων που εξετάστηκαν, βρέθηκαν θετικά στον ιό της γρίπης. Από αυτά το 67% ανήκε στον ιό τύπου Α και το 33% στον ιό τύπου Β. Ο υπότυπος A/H3N2 επικράτησε με ποσοστό 70% και ο ιός τύπου A/H1N1pdm09 εμφάνισε ποσοστό 30% στα θετικά στον ιό της γρίπης τύπου Α δείγματα (*Seasonal Influenza - Annual Epidemiological Report for 2022/2023*, 2023). Από το σύνολο των θετικών στον ιό τύπου Β, το 30,6 % ανήκε στη γενεαλογική σειρά Victoria. Στην Ελλάδα από την εβδομάδα 40/2022 έως και την εβδομάδα 20/2023, εξετάστηκαν 2252 κλινικά δείγματα, με το 16,4% να είναι θετικά στον ιό. Ο ιός τύπου Α βρέθηκε στο 73,8% των θετικών δειγμάτων και ο ιός τύπου Β στο υπόλοιπο 21,7%. Από τα δείγματα που υποτυποποιήθηκαν, το 90,2% ανήκε στον υπότυπο A/H3N2, και το υπόλοιπο 9,8% στον ιό A/H1N1pdm09 ('Ετήσιες επιδημιολογικές εκθέσεις', χ.χ.)

Τα αποτελέσματα των περιβαλλοντικών δειγμάτων που αναλύθηκαν για τις ανάγκες της εργασίας συμβαδίζουν με αυτά του ΕΟΔΥ και του WHO. Από την ανάλυση 225 δειγμάτων, το 8,4% (19 δείγματα) βρέθηκαν θετικά στον ιό της γρίπης. Ο ιός A/H3N2 ανιχνεύτηκε σε όλα τα θετικά δείγματα που υποτυποποιήθηκαν (13 δείγματα) και ο ιός τύπου Β βρέθηκε σε 2 από αυτά, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν οι ιοί A/H1N1 και A/H1N1pdm09, πιθανώς λόγω μικροποσότητας του ιού στα δείγματα. Ωστόσο αυτό δεν αποκλείει την ύπαρξη του ιού A/H1N1pdm09 σε άλλες περιοχές ή ακόμη και στις ίδιες σε διαφορετική χρονική περίοδο, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα του ΕΟΔΥ ('Γρίπη και Εποχική Γρίπη', χ.χ.). Ο περιορισμένος αριθμός των θετικών δειγμάτων οφείλεται στο γεγονός ότι ο ιός της γρίπης δεν αποβάλλεται τόσο έντονα από τα



κόπρανα όσο ο Sars-CoV-2(Dumke κ.ά., 2022). Πιθανόν απαιτούνται, μεγαλύτεροι όγκοι λυμάτων ώστε να έχουμε υψηλότερες συγκεντρώσεις ιού και γενετικού υλικού. Ωστόσο, αποδείχθηκε ότι οι προτεινόμενοι εκκινητές, ανιχνευτές και συνθήκες αντίδρασης από τον WHO αποδίδουν εξίσου και για τα λύματα

Στην Ελλάδα, η επιδημιολογική επιτήρηση σε περιβαλλοντικά δείγματα, χρησιμοποιήθηκε από Koureas et al, 2023 στην παρακολούθηση της πανδημίας, και στην ανίχνευση ιών του αναπνευστικού. Η επιδημιολογική επιτήρηση μέσω ανάλυσης περιβαλλοντικών δειγμάτων εξετάζει μια ευρύτερη γεωγραφική περιοχή, ανώνυμα και χωρίς να είναι απαραίτητη η καταγραφή του περιστατικού σε κάποια δομή δημόσιας υγείας, δίνοντας έτσι αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα. Κρίνεται οικονομική και γρήγορη, ωστόσο οι αναστολές που μπορεί να περιέχονται στο δείγμα σε συνδυασμό με τη μικρή ποσότητα δείγματος που συμπυκνώνεται και έπειτα αναλύεται αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες της μεθόδου.

Η ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων για την ανίχνευση, τυποποίηση και υποτυποποίηση του ιού της γρίπης είναι ιδιαίτερα χρήσιμη και σε συνδυασμό με WGS (Whole Genome Sequencing) μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην μοριακή επιδημιολογία του ιού.



Βιβλιογραφία

9.3B: *The Baltimore Virus Classification*. (2017, Ιούνιος 24). Biology LibreTexts.

[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_\(Boundless\)/09%3A_Viruses/9.03%3A_Classifying_Viruses/9.3B%3A_The_Baltimore_Virus_Classification](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology_(Boundless)/09%3A_Viruses/9.03%3A_Classifying_Viruses/9.3B%3A_The_Baltimore_Virus_Classification)

1957 flu pandemic | Cause, History, Deaths, & Facts | Britannica. (2023, Αύγουστος 26).

<https://www.britannica.com/event/1957-flu-pandemic>

Γρίπη και Εποχική Γρίπη. (χ.χ.). Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. Ανακτήθηκε 27

Αύγουστος 2023, από <https://eody.gov.gr/disease/gripi-kai-epochiki-gripi/>

Ετήσιες επιδημιολογικές εκθέσεις. (χ.χ.). Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. Ανακτήθηκε 26

Σεπτέμβριος 2023, από [https://eody.gov.gr/epidimiologika-statistika-](https://eody.gov.gr/epidimiologika-statistika-dedomena/etisies-epidimiologikes-ektheseis/)

[dedomena/etisies-epidimiologikes-ektheseis/](https://eody.gov.gr/epidimiologika-statistika-dedomena/etisies-epidimiologikes-ektheseis/)

About ERLI-Net. (2013, Μάρτιος 6). [https://www.ecdc.europa.eu/en/about-](https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/networks/disease-and-laboratory-networks/erlinet-about)

[us/networks/disease-and-laboratory-networks/erlinet-about](https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/networks/disease-and-laboratory-networks/erlinet-about)

Ahmed, W., Bivins, A., Stephens, M., Metcalfe, S., Smith, W. J. M., Sirikanchana, K., Kitajima, M.,

& Simpson, S. L. (2023). Occurrence of multiple respiratory viruses in wastewater in

Queensland, Australia: Potential for community disease surveillance. *The Science of the*

Total Environment, 864, 161023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161023>

Akarsu, H. (2003). Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus

nuclear export protein (NEP/NS2). *The EMBO Journal*, 22(18), 4646–4655.

<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg449>

AKIN, L., & GÖZEL, M. G. (2020). Understanding dynamics of pandemics. *Turkish Journal of*

Medical Sciences, 50(3), 515–519. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-133>

Antiviral Agents for the Treatment and Chemoprophylaxis of Influenza. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 5

Οκτώβριος 2023, από <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6001a1.htm>



Avian influenza A (H7N9) virus outbreak. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 5 Οκτώβριος 2023, από

[https://www.who.int/emergencies/situations/avian-influenza-a-\(h7n9\)-virus-outbreak](https://www.who.int/emergencies/situations/avian-influenza-a-(h7n9)-virus-outbreak)

Azuma, T., Ishiuchi, H., Inoyama, T., Teranishi, Y., Yamaoka, M., Sato, T., Yamashita, N., Tanaka, H., & Mino, Y. (2015). Detection of Peramivir and Laninamivir, New Anti-Influenza Drugs, in Sewage Effluent and River Waters in Japan. *PLoS ONE*, 10(6), e0131412.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131412>

Baltimore classification ~ ViralZone. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 15 Οκτώβριος 2023, από

<https://viralzone.expasy.org/254>

Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., & Ruigrok, R. W. (1994). Structure of influenza virus RNP. I.

Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *The EMBO Journal*, 13(13), 3158–3165.

<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06614.x>

Berche, P. (2022). The Spanish flu. *La Presse Médicale*, 51(3), 104127.

<https://doi.org/10.1016/j.lpm.2022.104127>

Biswas, S. K., Boutz, P. L., & Nayak, D. P. (1998). Influenza Virus Nucleoprotein Interacts with Influenza Virus Polymerase Proteins. *Journal of Virology*, 72(7), 5493–5501.

<https://doi.org/10.1128/JVI.72.7.5493-5501.1998>

Boktor, S. W., & Hafner, J. W. (2023). Influenza. Στο *StatPearls*. StatPearls Publishing.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459363/>

Bouvier, N. M., & Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26, D49–D53.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>

Burden of disease. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 26 Σεπτέμβριος 2023, από

<https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/surveillance-and-monitoring/burden-of-disease>



- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Bustin, S. A., & Mueller, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109(4), 365–379.
<https://doi.org/10.1042/CS20050086>
- CDC. (2021, Αύγουστος 26). *Practice Good Health Habits*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/flu/prevent/actions-prevent-flu.htm>
- CDC. (2022a, Αύγουστος 31). *Different Types of Flu Vaccines*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://t.cdc.gov/2S4D>
- CDC. (2022b, Σεπτέμβριος 20). *Learn more about the flu season*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://t.cdc.gov/C03>
- CDC. (2023a, Μάρτιος 30). *Types of Influenza Viruses*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
- CDC. (2023b, Αύγουστος 25). *People at High Risk of Flu*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/index.htm>
- CDC. (2023c, Αύγουστος 25). *Who Should and Who Should NOT Get Vaccinated*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://t.cdc.gov/2S49>
- CDCespanol. (2023, Απρίλιος 10). *Information on Avian Influenza*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://t.cdc.gov/VAY>
- Danilenko, A. V., Kolosova, N. P., Shvalov, A. N., Ilyicheva, T. N., Svyatchenko, S. V., Durymanov, A. G., Bulanovich, J. A., Goncharova, N. I., Susloparov, I. M., Marchenko, V. Y., Tregubchak, T. V., Gavrilova, E. V., Maksyutov, R. A., & Ryzhikov, A. B. (2021).



- Evaluation of HA-D222G/N polymorphism using targeted NGS analysis in A(H1N1)pdm09 influenza virus in Russia in 2018–2019. *PLOS ONE*, 16(4), e0251019.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251019>
- Dattani, S., Spooner, F., Mathieu, E., Ritchie, H., & Roser, M. (2023). Influenza. *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/influenza>
- Dattani, S., Spooner, F., & Roser, M. (2023). How many people die from the flu? *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/influenza-deaths>
- de Melo, T., Islam, G., Simmons, D. B. D., Desaulniers, J.-P., & Kirkwood, A. E. (2023). An alternative method for monitoring and interpreting influenza A in communities using wastewater surveillance. *Frontiers in Public Health*, 11, 1141136.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1141136>
- Dumke, R., Geissler, M., Skupin, A., Helm, B., Mayer, R., Schubert, S., Oertel, R., Renner, B., & Dalpke, A. H. (2022). Simultaneous Detection of SARS-CoV-2 and Influenza Virus in Wastewater of Two Cities in Southeastern Germany, January to May 2022. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(20), 13374.
<https://doi.org/10.3390/ijerph192013374>
- Elderfield, R. A., Koutsakos, M., Frise, R., Bradley, K., Ashcroft, J., Miah, S., Lackenby, A., & Barclay, W. S. (2016). NB protein does not affect influenza B virus replication in vitro and is not required for replication in or transmission between ferrets. *Journal of General Virology*, 97(3), 593–601. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000386>
- ertnews.gr, Σ. ομάδα. (2023, Απρίλιος 25). Ο ΕΟΦ ανακαλεί rapid test για κορονοϊό και γρίπη. *ertnews.gr*. <https://www.ertnews.gr/eidiseis/ellada/o-eof-anakalei-rapid-test-gia-koronoio-kai-gripi/>
- Estimating disease burden of influenza*. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 26 Σεπτέμβριος 2023, από <https://www.who.int/europe/activities/estimating-disease-burden-of-influenza>



European Influenza Surveillance Network (EISN). (2017, Μάιος 19).

<https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/eisn>

Fachada, N., Lopes, V. V., & Rosa, A. (2009). Simulating antigenic drift and shift in influenza A.

Proceedings of the 2009 ACM Symposium on Applied Computing, 2093–2100.

<https://doi.org/10.1145/1529282.1529744>

Fauquet, C. M., & Martelli, G. P. (2013). Viral Classification and Nomenclature. Στο *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.

<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000440.pub3>

First Global Estimates of 2009 H1N1 Pandemic Mortality Released by CDC-Led Collaboration |

CDC. (2019, Νοέμβριος 20). <https://www.cdc.gov/flu/spotlights/pandemic-global-estimates.htm>

Flu Vaccine Safety Information | CDC. (2023, Σεπτέμβριος 5).

<https://www.cdc.gov/flu/prevent/general.htm>

FluID. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 20 Σεπτέμβριος 2023, από [https://www.who.int/teams/global-](https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/surveillance-and-monitoring/fluid)

[influenza-programme/surveillance-and-monitoring/fluid](https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/surveillance-and-monitoring/fluid)

Flunet. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 20 Σεπτέμβριος 2023, από <https://www.who.int/tools/flunet>

Fodor, E., & Te Velhuis, A. J. W. (2020). Structure and Function of the Influenza Virus

Transcription and Replication Machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(9), a038398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038398>

Fukuyama, S., & Kawaoka, Y. (2011). The pathogenesis of influenza virus infections: The

contributions of virus and host factors. *Current Opinion in Immunology*, 23(4), 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.07.016>

Galani, A., Alygizakis, N., Aalizadeh, R., Kastitis, E., Dimopoulos, M.-A., & Thomaidis, N. S.

(2021). Patterns of pharmaceuticals use during the first wave of COVID-19 pandemic in



- Athens, Greece as revealed by wastewater-based epidemiology. *Science of The Total Environment*, 798, 149014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149014>
- gihsn. (2023, Μάιος 16). *Home page* -. <https://gihsn.org/home-page/>
- Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)*. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 19 Σεπτέμβριος 2023, από <https://www.who.int/initiatives/global-influenza-surveillance-and-response-system>
- Gramer, M. R. (2005). Diagnostic notes: Defining swine influenza virus. *Journal of Swine Health and Production*, 13(3), 157–160.
<https://www.aasv.org/shap/issues/v13n3/v13n3p157.html>
- Gubareva, L. V., Kaiser, L., & Hayden, F. G. (2000). Influenza virus neuraminidase inhibitors. *The Lancet*, 355(9206), 827–835. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)11433-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)11433-8)
- Heijnen, L., & Medema, G. (2011). Surveillance of Influenza A and the pandemic influenza A (H1N1) 2009 in sewage and surface water in the Netherlands. *Journal of Water and Health*, 9(3), 434–442. <https://doi.org/10.2166/wh.2011.019>
- Heneghan, C. J., Onakpoya, I., Thompson, M., Spencer, E. A., Jones, M., & Jefferson, T. (2014). Zanamivir for influenza in adults and children: Systematic review of clinical study reports and summary of regulatory comments. *BMJ*, 348(apr09 2), g2547–g2547.
<https://doi.org/10.1136/bmj.g2547>
- Honda, A., Mizumoto, K., & Ishihama, A. (2002). Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 13166–13171. <https://doi.org/10.1073/pnas.152456799>
- Hutchinson, E. C. (2018). Influenza Virus. *Trends in Microbiology*, 26(9), 809–810.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.013>



- Ikematsu, H., & Kawai, N. (2011). Laninamivir octanoate: A new long-acting neuraminidase inhibitor for the treatment of influenza. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(10), 851–857. <https://doi.org/10.1586/eri.11.112>
- Influenza Data Explorer*. (χ.χ.). Our World in Data. Ανακτήθηκε 14 Σεπτέμβριος 2023, από <https://ourworldindata.org/explorers/influenza>
- Influenza Signs and Symptoms and the Role of Laboratory Diagnostics* | CDC. (2021, Μάιος 6). <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/labrolesprocedures.htm>
- Influenza surveillance outputs*. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 20 Σεπτέμβριος 2023, από <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/surveillance-and-monitoring/influenza-surveillance-outputs>
- Influenza Virus Hemagglutinin—An overview* | ScienceDirect Topics. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 16 Οκτώβριος 2023, από <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/influenza-virus-hemagglutinin>
- Infographic: Influenza in Europe, 2019-2023*. (2023, Ιούνιος 13). <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/infographic-influenza-europe-2019-2023>
- Information on Swine/Variant Influenza* | CDC. (2023, Αύγουστος 16). <https://www.cdc.gov/flu/swineflu/index.htm>
- Jackson, C. (2009). History lessons: The Asian Flu pandemic. *British Journal of General Practice*, 59(565), 622–623. <https://doi.org/10.3399/bjgp09X453882>
- Javanian, M., Barary, M., Ghebrehewet, S., Koppolu, V., Vasigala, V., & Ebrahimpour, S. (2021). A brief review of influenza virus infection. *Journal of Medical Virology*, 93(8), 4638–4646. <https://doi.org/10.1002/jmv.26990>
- Kalarikkal, S. M., & Jaishankar, G. B. (2023). Influenza Vaccine. Στο *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537197/>



- Kalil, A. C., & Thomas, P. G. (2019). Influenza virus-related critical illness: Pathophysiology and epidemiology. *Critical Care*, 23(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2539-x>
- Karakus, U., Cramer, M., Lanz, C., & Yángüez, E. (2018). Propagation and Titration of Influenza Viruses. Στο Y. Yamauchi (Επιμ.), *Influenza Virus* (τ. 1836, σσ. 59–88). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8678-1_4
- Kawaoka, Y., & Neumann, G. (2012). Influenza Viruses: An Introduction. Στο Y. Kawaoka & G. Neumann (Επιμ.), *Influenza Virus* (τ. 865, σσ. 1–9). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-621-0_1
- Kevill, J. L., Lambert-Slosarska, K., Pellett, C., Woodhall, N., Richardson-O'Neill, I., Pântea, I., Alex-Sanders, N., Farkas, K., & Jones, D. L. (2022). Assessment of two types of passive sampler for the efficient recovery of SARS-CoV-2 and other viruses from wastewater. *The Science of the Total Environment*, 838, 156580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156580>
- Kilaru, P., Hill, D., Anderson, K., Collins, M. B., Green, H., Kmush, B. L., & Larsen, D. A. (2022). Wastewater Surveillance for Infectious Disease: A Systematic Review. *American Journal of Epidemiology*, kwac175. <https://doi.org/10.1093/aje/kwac175>
- Knight, M. L., Fan, H., Bauer, D. L. V., Grimes, J. M., Fodor, E., & Keown, J. R. (2021). Structure of an H3N2 influenza virus nucleoprotein. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 77(7), 208–214. <https://doi.org/10.1107/S2053230X2100635X>
- Knipe, D. M., & Howley, P. M. (Επιμ.). (2013). *Fields virology* (6th ed). Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- Koel, B. F., Mögling, R., Chutinimitkul, S., Fraaij, P. L., Burke, D. F., Van Der Vliet, S., De Wit, E., Bestebroer, T. M., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E., Smith, D. J., Fouchier, R. A. M., & De Graaf, M. (2015). Identification of Amino Acid Substitutions Supporting



- Antigenic Change of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses. *Journal of Virology*, 89(7), 3763–3775. <https://doi.org/10.1128/JVI.02962-14>
- Koureas, M., Mellou, K., Vontas, A., Kyritsi, M., Panagoulas, I., Koutsolioutsou, A., Mouchtouri, V. A., Speletas, M., Paraskevis, D., & Hadjichristodoulou, C. (2023). Wastewater Levels of Respiratory Syncytial Virus Associated with Influenza-like Illness Rates in Children—A Case Study in Larissa, Greece (October 2022–January 2023). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(6), 5219. <https://doi.org/10.3390/ijerph20065219>
- Koutsakos, M., Nguyen, T. H., Barclay, W. S., & Kedzierska, K. (2016). Knowns and unknowns of influenza B viruses. *Future Microbiology*, 11(1), 119–135. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.120>
- Labella, A. M., & Merel, S. E. (2013). Influenza. *The Medical Clinics of North America*, 97(4), 621–645, x. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2013.03.001>
- Laborda, P., Wang, S.-Y., & Voglmeir, J. (2016). Influenza Neuraminidase Inhibitors: Synthetic Approaches, Derivatives and Biological Activity. *Molecules*, 21(11), 1513. <https://doi.org/10.3390/molecules21111513>
- Lau, Y. C., Perera, R. A. P. M., Fang, V. J., Luk, L. H., Chu, D. K. W., Wu, P., Barr, I. G., Peiris, J. S. M., & Cowling, B. J. (2020). Variation by lineage in serum antibody responses to influenza B virus infections. *PLOS ONE*, 15(11), e0241693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241693>
- Live Attenuated Influenza Vaccine [LAIV] (The Nasal Spray Flu Vaccine) | CDC. (2023, Αύγουστος 24). <https://www.cdc.gov/flu/prevent/nasalspray.htm>
- Louten, J. (2016). Virus Transmission and Epidemiology. Στο *Essential Human Virology* (σσ. 71–92). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00005-3>



Magazine, S., & Barry, J. M. (χ.χ.). *How the Horrific 1918 Flu Spread Across America*.

Smithsonian Magazine. Ανακτήθηκε 16 Οκτώβριος 2023, από

<https://www.smithsonianmag.com/history/journal-plague-year-180965222/>

Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. (χ.χ.). Ανακτήθηκε

5 Οκτώβριος 2023, από <https://www.who.int/publications-detail-redirect/manual-for-the-laboratory-diagnosis-and-virological-surveillance-of-influenza>

Mao, K., Zhang, H., Pan, Y., & Yang, Z. (2021). Biosensors for wastewater-based epidemiology for monitoring public health. *Water Research*, 191, 116787.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116787>

Mao, K., Zhang, K., Du, W., Ali, W., Feng, X., & Zhang, H. (2020). The potential of wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious disease outbreaks. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 17, 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.04.006>

McAuley, J. L., Gilbertson, B. P., Trifkovic, S., Brown, L. E., & McKimm-Breschkin, J. L. (2019). Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Frontiers in Microbiology*, 10.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00039>

Mercier, E., D'Aoust, P. M., Thakali, O., Hegazy, N., Jia, J.-J., Zhang, Z., Eid, W., Plaza-Diaz, J., Kabir, M. P., Fang, W., Cowan, A., Stephenson, S. E., Pisharody, L., MacKenzie, A. E., Graber, T. E., Wan, S., & Delatolla, R. (2022). Municipal and neighbourhood level wastewater surveillance and subtyping of an influenza virus outbreak. *Scientific Reports*, 12, 15777. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20076-z>

Mohan, S. V., Hemalatha, M., Kopperi, H., Ranjith, I., & Kumar, A. K. (2021). SARS-CoV-2 in environmental perspective: Occurrence, persistence, surveillance, inactivation and challenges. *Chemical Engineering Journal*, 405, 126893.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126893>



Molecular Expressions Cell Biology: The Influenza (Flu) Virus. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 14 Οκτώβριος 2023, από <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/influenzavirus.html>

Monto, A. S., & Fukuda, K. (2019). Lessons From Influenza Pandemics of the Last 100 Years. *Clinical Infectious Diseases*, ciz803. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz803>

Mosterín Höpping, A., Fonville, J. M., Russell, C. A., James, S., & Smith, D. J. (2016). Influenza B vaccine lineage selection—An optimized trivalent vaccine. *Vaccine*, 34(13), 1617–1622. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.042>

National Influenza Centres. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 20 Σεπτέμβριος 2023, από <https://www.who.int/initiatives/global-influenza-surveillance-and-response-system/national-influenza-centres>

Ning, T., Nie, J., Huang, W., Li, C., Li, X., Liu, Q., Zhao, H., & Wang, Y. (2019). Antigenic Drift of Influenza A(H7N9) Virus Hemagglutinin. *The Journal of Infectious Diseases*, 219(1), 19–25. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy408>

Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559–1582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>

Orthomyxoviridae. (2017). Στο *Fenner's Veterinary Virology* (σσ. 389–410). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00021-0>

Overview of Influenza Testing Methods | CDC. (2023, Αύγουστος 24). <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/overview-testing-methods.htm>

Overview of the emergence and characteristics of the avian influenza A(H7N9) virus. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 5 Οκτώβριος 2023, από [https://www.who.int/publications/m/item/overview-of-the-emergence-and-characteristics-of-the-avian-influenza-a\(h7n9\)-virus](https://www.who.int/publications/m/item/overview-of-the-emergence-and-characteristics-of-the-avian-influenza-a(h7n9)-virus)

Paget, J., Spreeuwenberg, P., Charu, V., Taylor, R. J., Iuliano, A. D., Bresee, J., Simonsen, L., & Viboud, C. (2019). Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New



- burden estimates and predictors from the GLaMOR Project. *Journal of Global Health*, 9(2), 020421. <https://doi.org/10.7189/jogh.09.020421>
- Patrozou, E., & Mermel, L. A. (2009). Does Influenza Transmission Occur from Asymptomatic Infection or Prior to Symptom Onset? *Public Health Reports*, 124(2), 193–196. <https://doi.org/10.1177/003335490912400205>
- Pneumonia | Description, Causes, Symptoms, & Treatment | Britannica*. (2023, Αύγουστος 26). <https://www.britannica.com/event/1957-flu-pandemic>
- PROMEGA. (2023). *Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit*. PROMEGA. https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/wizard-enviro-total-nucleic-acid-kit-protocol-tm662.pdf?rev=edab817b067d451fb33f4836e450235b&sc_lang=en
- Puig-Barberà, J., Tormos, A., Trushakova, S., Sominina, A., Pisareva, M., Ciblak, M. A., Badur, S., Yu, H., Cowling, B. J., & Burtseva, E. (2015). The Global Influenza Hospital Surveillance Network (GIHSN): A new platform to describe the epidemiology of severe influenza. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 9(6), 277–286. <https://doi.org/10.1111/irv.12335>
- Rapid Diagnostic Testing for Influenza: Information for Clinical Laboratory Directors | CDC*. (2023, Ιούλιος 11). <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/rapidlab.htm>
- Rapid Influenza Diagnostic Tests | CDC*. (2023, Ιούλιος 6). https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/clinician_guidance_ridt.htm
- Roser, M. (2023). The Spanish flu: The global impact of the largest influenza pandemic in history. *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/spanish-flu-largest-influenza-pandemic-in-history>
- Rothman, J. A., Loveless, T. B., Kapcia, J., Adams, E. D., Steele, J. A., Zimmer-Faust, A. G., Langlois, K., Wanless, D., Griffith, M., Mao, L., Chokry, J., Griffith, J. F., & Whiteson, K. L.



- (χ.χ.). RNA Viromics of Southern California Wastewater and Detection of SARS-CoV-2 Single-Nucleotide Variants. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(23), e01448-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01448-21>
- Ruiz, M., Puig, A., Bassols, M., Fraile, L., & Armengol, R. (2022). Influenza D Virus: A Review and Update of Its Role in Bovine Respiratory Syndrome. *Viruses*, 14(12), 2717. <https://doi.org/10.3390/v14122717>
- Schmidt, C. (2020). Watcher in the wastewater. *Nature Biotechnology*, 38(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0620-2>
- Seasonal influenza, Annual Epidemiological Report for 2018–2019*. (2019, Οκτώβριος 25). <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/seasonal-influenza-annual-epidemiological-report-2018-2019>
- Seasonal Influenza Vaccine Dosage & Administration | CDC*. (2023, Αύγουστος 22). <https://www.cdc.gov/flu/about/qa/vaxadmin.htm>
- Seasonal influenza—Annual Epidemiological Report for 2020-2021*. (2021, Αύγουστος 26). <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/seasonal-influenza-annual-epidemiological-report-2020-2021>
- Seasonal influenza—Annual Epidemiological Report for 2022/2023*. (2023, Ιούλιος 7). <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/seasonal-influenza-annual-epidemiological-report-20222023>
- Sentinel surveillance*. (2013, Μάρτιος 5). <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/surveillance-and-disease-data/facts-sentinel-surveillance>
- Sims, N., & Kasprzyk-Hordern, B. (2020). Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environment International*, 139, 105689. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689>



SITNFlash. (2023, Μάρτιος 9). Something in the Sewage: What watching our wastewater can tell us about infectious diseases. *Science in the News*.

<https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2023/something-in-the-sewage-what-watching-our-wastewater-can-tell-us-about-infectious-diseases/>

Sreenivasan, C. C., Sheng, Z., Wang, D., & Li, F. (2021). Host Range, Biology, and Species Specificity of Seven-Segmented Influenza Viruses—A Comparative Review on Influenza C and D. *Pathogens*, 10(12), 1583. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121583>

Sridhar, S., Brokstad, K., & Cox, R. (2015). Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines*, 3(2), 373–389. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020373>

Steinhauer, D. A., & Skehel, J. J. (2002). Genetics of Influenza Viruses. *Annual Review of Genetics*, 36(1), 305–332. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.052402.152757>

Structural insights into viral RNA synthesis by influenza polymerase. (χ.χ.). Ανακτήθηκε 17

Οκτώβριος 2023, από

<https://www.esrf.fr/home/UsersAndScience/Publications/Highlights/highlights-2014/SB/SB01.html>

Sutton, T. C. (2018). The Pandemic Threat of Emerging H5 and H7 Avian Influenza Viruses. *Viruses*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/v10090461>

Świerczyńska, M., Mirowska-Guzel, D. M., & Pindelska, E. (2022). Antiviral Drugs in Influenza. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), 3018. <https://doi.org/10.3390/ijerph19053018>

Tellier, R. (2009). Aerosol transmission of influenza A virus: A review of new studies. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(suppl_6). <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0302.focus>



Up to 650 000 people die of respiratory diseases linked to seasonal flu each year. (χ.χ.).

Ανακτήθηκε 26 Σεπτέμβριος 2023, από <https://www.who.int/news/item/13-12-2017-up-to-650-000-people-die-of-respiratory-diseases-linked-to-seasonal-flu-each-year>

Vieira, M. C., Donato, C. M., Arevalo, P., Rimmelzwaan, G. F., Wood, T., Lopez, L., Huang, Q. S.,

Dhanasekaran, V., Koelle, K., & Cobey, S. (2021). Lineage-specific protection and immune imprinting shape the age distributions of influenza B cases. *Nature*

Communications, 12(1), 4313. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24566-y>

Vo, V., Harrington, A., Chang, C.-L., Baker, H., Moshi, M. A., Ghani, N., Itorralba, J. Y., Tillett, R.

L., Dahlmann, E., Basazinew, N., Gu, R., Familara, T. D., Boss, S., Vanderford, F., Ghani,

M., Tang, A. J., Matthews, A., Papp, K., Khan, E., ... Oh, E. C. (2023). Identification and

genome sequencing of an influenza H3N2 variant in wastewater from elementary schools during a surge of influenza A cases in Las Vegas, Nevada. *The Science of the*

Total Environment, 872, 162058. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162058>

Walker, A. P., & Fodor, E. (2019). Interplay between Influenza Virus and the Host RNA

Polymerase II Transcriptional Machinery. *Trends in Microbiology*, 27(5), 398–407.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.013>

Walter, K. (2020). Influenza Vaccine. *JAMA*, 324(14), 1476.

<https://doi.org/10.1001/jama.2020.16846>

Wang, D., Zhu, W., Yang, L., & Shu, Y. (2021). The Epidemiology, Virology, and Pathogenicity of

Human Infections with Avian Influenza Viruses. *Cold Spring Harbor Perspectives in*

Medicine, 11(4), a038620. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038620>

Wastewater Surveillance Testing Methods | National Wastewater Surveillance System | CDC.

(2023, Μάρτιος 10). <https://www.cdc.gov/nwss/testing.html>

WHO. (2020). *WHO information for the molecular detection of influenza viruses*. WHO.

<https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/molecular-detection-of->



influenza-

viruses/protocols_influenza_virus_detection_feb_2021.pdf?sfvrsn=df7d268a_5

WHO. (2021). *Review of global influenza circulation, late 2019 to 2020, and the impact of the COVID-19 pandemic on influenza circulation*. WHO.

<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/341995/WER9625-241-264-eng-fre.pdf?sequence=1>

Wolfe, M. K., Duong, D., Bakker, K. M., Ammerman, M., Mortenson, L., Hughes, B., Arts, P., Lauring, A. S., Fitzsimmons, W. J., Bendall, E., Hwang, C. E., Martin, E. T., White, B. J., Boehm, A. B., & Wigginton, K. R. (2022). Wastewater-Based Detection of Two Influenza Outbreaks. *Environmental Science & Technology Letters*, 9(8), 687–692.
<https://doi.org/10.1021/acs.estlett.2c00350>

Wolken, M., Sun, T., McCall, C., Schneider, R., Caton, K., Hundley, C., Hopkins, L., Ensor, K., Domakonda, K., Kalvapalle, P., Persse, D., Williams, S., & Stadler, L. B. (2023). Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 and influenza in preK-12 schools shows school, community, and citywide infections. *Water Research*, 231, 119648.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119648>

Wong, S.-S., & Webby, R. J. (2013). Traditional and New Influenza Vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 476–492. <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-12>

Yang, J., Lau, Y. C., Wu, P., Feng, L., Wang, X., Chen, T., Ali, S. T., Peng, Z., Fang, V. J., Zhang, J., He, Y., Lau, E. H. Y., Qin, Y., Yang, J., Zheng, J., Jiang, H., Yu, H., & Cowling, B. J. (2018). Variation in Influenza B Virus Epidemiology by Lineage, China. *Emerging Infectious Diseases*, 24(8), 1536–1540. <https://doi.org/10.3201/eid2408.180063>

Zeng, Y., Xu, S., Wei, Y., Zhang, X., Wang, Q., Jia, Y., Wang, W., Han, L., Chen, Z., Wang, Z., Zhang, B., Chen, H., Lei, C.-Q., & Zhu, Q. (2021). The PB1 protein of influenza A virus inhibits the innate immune response by targeting MAVS for NBR1-mediated selective



autophagic degradation. *PLOS Pathogens*, 17(2), e1009300.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009300>

Zhang, Y., Duan, L., Wang, B., Du, Y., Cagnetta, G., Huang, J., Blaney, L., & Yu, G. (2019).

Wastewater-based epidemiology in Beijing, China: Prevalence of antibiotic use in flu season and association of pharmaceuticals and personal care products with socioeconomic characteristics. *Environment International*, 125, 152–160.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.061>



Παράρτημα Α: Μέθοδος κατακρήμνισης με την χρήση PEG/NaCl

Απαραίτητα υλικά-εξοπλισμός

- PEG 6000
- NaCl
- Tris
- EDTA
- Glycine
- PBS
- Falcon 50ml
- Μαγνητικός αναδευτήρας, μαγνήτης
- Ζυγαριά ακριβείας
- Φυγόκεντρος, μικροφυγόκεντρος
- Eppendorf 1.5ml, 2ml
- Κωνική φιάλη
- Ογκομετρικός σωλήνας
- Πιπέτες και ρύγχη για όγκους 10, 400 και 1.500μl

Χρήση 105 ml από τον συνολικό όγκο του λύματος, διάρκεια 3 ώρες

1. Διαμοιρασμός 105 ml δείγματος σε 3 falcon των 50ml. Κάθε falcon περιέχει 35ml από το δείγμα.
1. Ανάδευση 105 ml του δείγματος με 1,5 ml γλυκίνης για 30 λεπτά, σε μαγνητικό αναδευτήρα. Η γλυκίνη χρησιμοποιείται για την αποδέσμευση των ιών από τα στερεά στοιχεία.
2. Φυγοκέντρωση στα 4.000 g για 30 λεπτά, στους 4 °C για την καθίζηση των στερεών στοιχείων
3. Συλλογή του υπερκείμενου και προσθήκη 10,5 gr PEG και 2,364 gr NaCl. Το PEG και το NaCl χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των ιών προκαλώντας κατακρήμνιση.
4. Ανάδευση μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα
5. Φυγοκέντρωση στα 12000 g για 2 ώρες, στους 4 °C
6. Απόρριψη του υπερκείμενου. Στον πυθμένα των σωληναρίων βρίσκεται το ίζημα που περιέχει το σύνολο των ιών του δείγματος.
7. Χρήση 400 μl PBS, που αποτελεί συντηρητικό διάλυμα, για την αποκόλληση του ιζήματος
8. Συγκέντρωση του ιζήματος σε αποστειρωμένο eppendorf του 1,5 ml και αποθήκευση σε ψυγείο στους 4 °C.



Παράρτημα Β: Απομόνωση γενετικού υλικού

Η απομόνωση του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε σε ανοιχτού τύπου αυτόματο μηχανήμα KingFisher Apex της ThermoScientific με το αντίστοιχο kit.

Υλικά-εξοπλισμός

- Μηχάνημα ανοιχτού τύπου KingFisher Apex της ThermoScientific
- MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit
- KingFisher™ Deepwell 96 Plate
- Tip Comb Presenting Plate for KF 96
- MicroAmp™ Clear Adhesive Film
- Βακτηριοφάγος MS2
- Vortex
- Πιπέτες

Διαδικασία

1. Ονοματίζονται 4 πλάκες, που περιέχουν 96 βοθρία. (Wash 1, Wash 2, Sample, Elution)
2. Στην πλάκα Wash 1 προστίθενται 500μl Wash 1 σε όσα βοθρία είναι και τα δείγματα προς απομόνωση.
3. Στην πλάκα Wash 2 προστίθενται 1000μl Wash 2 σε όσα βοθρία είναι και τα δείγματα προς απομόνωση. Το Wash 2 είναι 80% αιθανόλη.
4. Στην πλάκα Elution προστίθενται 50μl ddH₂O σε όσα βοθρία είναι και τα δείγματα προς απομόνωση. Σε αυτή τη πλάκα θα συγκεντρωθεί το γενετικό υλικό στο τέλος της διαδικασίας.
5. Στην πλάκα Sample προστίθενται 5μl πρωτεΐνωση K, 10μl βακτηριοφάγου MS2 και 200μl από το δείγμα, αφού έχει ανακινηθεί καλά προηγουμένως.
6. Παρασκευάζεται μίγμα Binding Solution (265μl) και Total Nucleic Acid Magnetic Beads (10μl) για κάθε δείγμα. Ήπια ανάδευση για ομογενοποίηση
7. Στην πλάκα Sample προστίθενται 275μl από το μίγμα Binding Solution και Total Nucleic Acid Magnetic Beads.
8. Οι 4 πλάκες τοποθετούνται το αυτόματο μηχανήμα ανοιχτού τύπου KingFisher Apex της ThermoScientific.
9. Το πρωτόκολλο χρειάζεται περίπου 22 λεπτά για να ολοκληρωθεί.
10. Η πλάκα Elution καλύπτεται με αυτοκόλλητο MicroAmp™ Clear Adhesive Film για να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση.

Η πλάκα Elution τοποθετείται σε πάγο για άμεση χρήση ή σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για μελλοντική χρήση.



Παράρτημα Γ: Μέθοδος PROMEGA

Υλικά-εξοπλισμός

- Wizard® Enviro Total Nucleic Acid Kit
- PureYield™ Midicolumn
- Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold
- Eluator™
- Θερμοπλάκα
- Eppendorf 1.5μl
- Φυγόκεντρος, μικροφυγόκεντρος
- Βακτηριοφάγος MS2
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 95%
- Συσκευή αναρρόφησης
- Ογκομετρικοί σωλήνες
- Πιπέτες

Διαδικασία

1. Όγκος δείγματος 40 ml τοποθετείται σε falcon των 50ml, προστίθενται 0.5 ml πρωτεΐνάσης, με σκοπό την απελευθέρωση του γενετικού υλικού, και επωάζονται για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Φυγοκέντρωση στα 3000 g για 10 λεπτά και στους 25°C έτσι ώστε να καθιζάνουν τα υπάρχοντα στερεά.
3. Το υπερκείμενο συλλέγεται και χωρίζεται σε 2 νέα falcon των 50ml. Κάθε falcon περιέχει 20ml του υπερκείμενου και αναμιγνύεται και αναδεύεται με 12 ml Binding Buffer 1 (BBD), 0.5 ml Binding Buffer 2 (BBE)
4. Προστίθενται 24 ml ισοπροπανόλης στο κάθε falcon και το μίγμα αναδεύεται
5. Όλη η ποσότητα του μίγματος περνάει μέσα από φίλτρο με την χρήση της συσκευής κενού.
6. Πραγματοποιείται πρώτος καθαρισμός με την προσθήκη 5ml από το Column Wash 1 (CWE). Αφήνεται να περάσει όλη η ποσότητα από το φίλτρο.
7. Πραγματοποιείται δεύτερος καθαρισμός με την προσθήκη 20ml από το Column Wash 2 (RWA). Αφήνεται να περάσει όλη η ποσότητα από το φίλτρο.
8. Προστίθεται νερό (0.5 ml) απαλλαγμένο από αναστολείς, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 60°C, περνάει από το φίλτρο και συγκεντρώνεται σε αποστειρωμένο eppendorf. Το βήμα επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά.
9. Στο eppendorf, όπου περιέχει 1 ml από το εκλουμένο δείγμα, προστίθενται 0.4 ml BBD και 0.1 ml BBE και αναδεύονται.
10. Το μίγμα χωρίζεται σε δύο eppendorf με ποσότητα 0,75 ml
11. Προσθήκη 0,75 ml ισοπροπανόλης σε κάθε eppendorf και ανάδευση.



12. Προσθήκη 0,75 ml του μίγματος σε μικροστήλη και φυγοκέντρωση σε μικροφυγόκεντρο στα 10.000 rpm για 1 λεπτό. Απόρριψη της ποσότητας που πέρασε το φίλτρο της μικροστήλης. Επανάληψη του βήματος άλλες 3 φορές, ώστε να περάσει όλος ο όγκος του μίγματος από το φίλτρο (1,5 ml)
13. Προσθήκη 0,3ml WBE στη μικροστήλη και φυγοκέντρωση σε μικροφυγόκεντρο στα 10.000 rpm για 1 λεπτό. Απόρριψη της ποσότητας που πέρασε το φίλτρο της μικροστήλης.
14. Προσθήκη 0,5ml RWA στη μικροστήλη και φυγοκέντρωση σε μικροφυγόκεντρο στα 10.000 rpm για 1 λεπτό. Απόρριψη της ποσότητας που πέρασε το φίλτρο της μικροστήλης.
15. Επανάληψη του βήματος άλλη μία φορά
16. Φυγοκέντρωση για επιπλέον 30 δευτερόλεπτα για την απομάκρυνση υπολειμμάτων
17. Τοποθέτηση της μικροστήλης σε αποστειρωμένο erppendorf
18. Πραγματοποιείται εκχύλιση του γενετικού υλικού που βρίσκεται παγιδευμένο στο φίλτρο της μικροστήλης με την προσθήκη 20μl προθερμασμένου H₂O απαλλαγμένου από αναστολείς και φυγοκέντρωση σε μικροφυγόκεντρο στα 10.000 rpm για 1 λεπτό.
19. Επανάληψη του βήματος άλλη μία φορά
20. Το αποστειρωμένο erppendorf που περιέχει 40μl εκλούόμενου γενετικού υλικού αποθηκεύεται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).



Παράρτημα Δ: Μέθοδος realtime RT-PCR

Υλικά-εξοπλισμός

- Invitrogen™ SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit
- Μικροφυγόκεντρο
- Θερμοκυκλοποιητής QuantStudio™ 5 Real-Time της ThermoFisherScientific
- Vortex
- Αποστειρωμένα eppendorfs
- Πλάκα 96 βοθρίων
- MicroAmp™ Clear Adhesive Film
- Παγοπλάκα

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

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

Πίνακας 18 Ποσότητες αντιδραστηρίων MasterMix ανά δείγμα

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην real time RT-PCR φαίνονται στον παρακάτω πίνακα

Στάδια	Κύκλοι	Θερμοκρασία	Χρόνος
επώαση	1	50o C	20'
αντίστροφη μεταγραφή	1	95oC	2'
ενεργοποίηση πολυμεράσης	1	95oC	25'
ενίσχυση	40	60oC	1'10''

Πίνακας 19 Συνθήκες θερμοκρασίας-χρόνου PCR



Διαδικασία

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