



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ *IL18*
rs1834481 ΚΑΙ *CD14 rs2569190* ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ
ΑΝΟΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ
ΑΠΟ ΙΟ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ**

Ματζίρη Αλεξία του Ιωάννη

Τριμελής επιτροπή:

- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Καλαλά Φανή, Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας, Συνεπιβλέπουσα
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων νοσημάτων, Μέλος

Λάρισα, 2025

Περίληψη

Ο Ιός του Δυτικού Νείλου – West Nile Virus (WNV) αποτελεί σημαντική πρόκληση για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Η λοίμωξη μπορεί να εκδηλωθεί με ευρύ κλινικό φάσμα. Η πλειοψηφία των περιστατικών παραμένει ασυμπτωματική ή με ήπια κλινική εικόνα ενώ μικρό ποσοστό (<1%) παρουσιάζει σοβαρά συμπτώματα από το νευρικό σύστημα και μπορεί να καταλήξει. Οι μηχανισμοί που αιτιολογούν την κλινική βαρύτητα της λοίμωξης παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Μηχανισμοί του ανοσιακού συστήματος πιθανώς να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, όπως συμβαίνει και σε άλλες λοιμώξεις.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνάται η επίδραση των πολυμορφισμών rs183448 του γονιδίου *IL18* και rs2569190 του *CD14* στην κλινική εικόνα της λοίμωξης από WNV. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως συγκεκριμένες γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο *IL18*, κρίσιμο για την πυροδότηση της φλεγμονώδους απόκρισης του οργανισμού, και στο γονίδιο *CD14*, που κωδικοποιεί ένα μόριο χρήσιμο για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών, μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να καταπολεμήσει ιογενείς λοιμώξεις, όπως η COVID-19.

Στη μελέτη συμμετείχαν 67 άτομα από το Νομό Ημαθίας. Το ιστορικό νόσησης προέκυψε έπειτα από ανίχνευση θετικού τίτλου αντισωμάτων στον ορό των συμμετεχόντων είτε από το ιστορικό νοσηλείας τους. Από τους συμμετέχοντες ζητήθηκαν δημογραφικά δεδομένα καθώς και καταγραφή υποκείμενων νοσημάτων και κλινικής εικόνας. Ο πληθυσμός της μελέτης ήταν 37 (53.6%) γυναίκες, ενώ οι άνδρες είναι 32 (46.4%) με μέση ηλικία 55,2 έτη (εύρος: 11 - 85 έτη). Το 70,2 % (47 / 67) είχε τουλάχιστον ένα υποκείμενο νόσημα. Από τους 67 συμμετέχοντες, νοσηλεύτηκαν οι 16 (23,8%). Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών στο γονιδίωμα των συμμετεχόντων, αφού έγινε εξαγωγή γενετικού υλικού από δείγμα ολικού αίματος, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR-RFLP.

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση δεδομένων για τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ της παρουσίας των γενετικών παραλλαγών και της σοβαρότητας της κλινικής εκδήλωσης της λοίμωξης σε συνδυασμό με την παρουσία υποκείμενων νοσημάτων, χρησιμοποιώντας Chi-square, Fisher's exact test και λογιστική παλινδρόμηση.

Η στατιστική ανάλυση δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού *CD14* rs2569190 και της νοσηλείας (p -value = 0.481). Καμία από τις συγκρίσεις μεταξύ γονότυπων του πολυμορφισμού αυτού δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Ωστόσο, 4 από τους 8 νοσηλευόμενους ετεροζυγώτες του πολυμορφισμού είχαν αρτηριακή υπέρταση σε αντίθεση με την ομάδα των μη νοσηλευόμενων όπου 1 στους 19 είχαν αρτηριακή υπέρταση με στατιστικά σημαντική διαφορά (P -value = 0.017) μεταξύ των δύο ομάδων, ενισχύοντας την πιθανότητα νοσηλείας στους ετεροζυγώτες του πολυμορφισμού με αρτηριακή υπέρταση. Επιπλέον, η τάση υψηλότερου Odds Ratio στους ετεροζυγώτες υποδηλώνει την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού με τη νοσηλεία. Παρότι τα δεδομένα υποδεικνύουν μία τάση μεγαλύτερης παρουσίας του ετεροζυγώτη τύπου για τον πολυμορφισμό *IL18* rs1834481 σε νοσηλευόμενους ασθενείς, η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική (p = 0.074).

Απαιτείται όμως περαιτέρω έρευνα με μεγαλύτερου μεγέθους δείγμα για να καθοριστεί η δυνατότητα χρήσης αυτών των πολυμορφισμών ως αξιόπιστων βιοδεικτών για την καθοδήγηση της κλινικής διαχείρισης και των εξατομικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών σε λοιμώξεις από WNV και άλλες ιογενείς λοιμώξεις.

Abstract

West Nile Virus (WNV) is a significant global public health challenge. The infection presents a wide clinical spectrum, with most cases being asymptomatic or mild, while a small percentage (<1%) develop severe neurological complications, which can be fatal. The mechanisms underlying the clinical severity of WNV infection remain largely unknown. However, immune system mechanisms may play a crucial role, as observed in other viral infections.

This study investigates the impact of the rs1834481 polymorphism in the *IL18* gene and the rs2569190 polymorphism in the *CD14* gene on the clinical manifestations of WNV infection. Previous studies have shown that specific genetic variants in the *IL18* gene, which is critical for triggering the inflammatory response, and the *CD14* gene, which encodes a molecule involved in pathogen recognition, may significantly influence the immune system's ability to combat viral infections such as COVID-19.

The study included 67 individuals from the Imathia region, Greece. Infection history was determined through the detection of positive antibody titers in serum or from hospitalization records. Participants provided demographic data, along with a medical history of underlying conditions and clinical symptoms. The study population consisted of 37 females (53.6%) and 32 males (46.4%), with a mean age of 55.2 years (range: 11–85 years). A total of 70.2% (47/67) had at least one underlying condition, and 16 participants (23.8%) required hospitalization. DNA extraction from whole blood samples was performed, and genotyping of the polymorphisms was conducted using the PCR-RFLP method.

A statistical analysis was conducted to assess the association between the presence of genetic variants and the severity of clinical manifestations, in combination with underlying conditions, using Chi-square, Fisher's exact test, and logistic regression analysis.

The statistical analysis indicates no significant association between the *CD14* rs2569190 polymorphism and hospitalization ($p = 0.481$), as none of the genotype comparisons showed a statistically significant correlation. However, 4 out of 8 hospitalized heterozygous individuals for the polymorphism had arterial hypertension, compared to 1 out of 19 in the non-hospitalized group, showing a statistically significant difference ($p = 0.017$). This finding suggests a potential association between hospitalization and the heterozygous genotype in individuals with arterial hypertension. Additionally, a higher Odds Ratio (OR) in heterozygous individuals suggests the need for further investigation into a potential link between this polymorphism and hospitalization risk. Although the data indicate a trend of higher prevalence of the heterozygous genotype for *IL18* rs1834481 in hospitalized patients, this difference was not statistically significant ($p = 0.074$).

Further research with a larger sample size is required to determine the potential use of these polymorphisms as reliable biomarkers for guiding clinical management and personalized therapeutic strategies in WNV and other viral infections.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από Μάιο 2024 έως Νοέμβριο 2024, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Σπελέτα Ματθαίου, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του ερευνητικού αυτού θέματος. Ιδιαίτερα, εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου για την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές του και τη συνεχή υποστήριξή του, που υπήρξαν καθοριστικές καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές κα Καλαλά Φανή και Μπόγδανο Δημήτριο, οι οποίοι αποδέχθηκαν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου. Οι γνώσεις και η καθοδήγησή τους συνέβαλαν σημαντικά στη διαμόρφωση της εργασίας αυτής.

Σε δεύτερο χρόνο θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και το Εργαστήριο Μοριακής Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την διευθύντρια κα Μουχτούρη Βαρβάρα που μου επέτρεψαν να χρησιμοποιήσω τις εγκαταστάσεις για την εκπόνηση αυτής της μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς την κα Βουλγαρίδη Ιωάννα για τη βοήθεια, τις συμβουλές και την εξαιρετική συνεργασία μας. Μεγάλη βοήθεια για την διεκπεραίωση των στατιστικών αναλύσεων μου δέχθηκα και από την κα Κοντούλη Κατερίνα Μαρία, η οποία με καθοδήγησε ως προς αυτό το κομμάτι της ανάλυσης. Είμαι ευγνώμων και προς την κα Φουσίκα Αθανασία, την τεχνολόγο του εργαστηρίου, καθώς και προς όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας για την υποστήριξή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αδιάκοπη στήριξή της και την ενθάρρυνσή της σε κάθε μου βήμα.

Περιεχόμενα	
Περίληψη	1
Abstract	2
Ευχαριστίες	3
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
Εισαγωγή	6
Ο Ιός Δυτικού Νείλου - West Nile Virus (WNV)	6
Γενικές πληροφορίες για τον ιό του Δυτικού Νείλου	6
Επιδημιολογικά δεδομένα	6
Μετάδοση του ιού	10
Δομή και γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV)	10
Κλινική εικόνα της λοίμωξης από ιό του Δυτικού Νείλου	12
Παράγοντες κινδύνου σοβαρής ασθένειας του Ιού του Δυτικού Νείλου	13
Ανοσιακή απάντηση έναντι του Ιού του Δυτικού Νείλου και ανοσολογική διαφυγή	13
Φυσική ανοσολογική απόκριση	15
Χυμική ανοσία	17
Γενετικοί παράγοντες στην ανοσολογική απόκριση	18
CD14	19
Γενικές πληροφορίες	19
Γενετική βάση	19
Ρόλος στις ανοσολογικές αποκρίσεις	19
Ρόλος στην αναγνώριση των ιών	20
Ενίσχυση των αποκρίσεων κυτταροκινών	20
Γενετικές παραλλαγές και ευαισθησία στις ιογενείς λοιμώξεις	20
Λειτουργικός πολυμορφισμός rs2569190	22
Λειτουργική σημασία του rs2569190	22
IL 18	23
Γενικές πληροφορίες	23
Γενετική βάση της IL-18	23
Μονοπάτια σηματοδότησης IL-18 και γενετική ρύθμιση	23
Ρόλος της στην ανοσολογική απόκριση	25
Συμμετοχή της IL-18 στην ανοσιακή απάντηση έναντι των ιογενών λοιμώξεων	25
Γενετικές παραλλαγές της IL-18	26
Πολυμορφισμός <i>IL18</i> rs1834481	27

Πιθανός λειτουργικός αντίκτυπος του rs1834481 στην IL-18	27
Κλινική σημασία του rs1834481	27
ΣΚΟΠΟΣ	29
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	30
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	30
Πληθυσμός μελέτης.....	30
Μεθοδολογία	32
Απομόνωση DNA.....	32
Ποσοτικοποίηση με Qubit	33
PCR.....	33
Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης.....	36
Πέψη	38
Στατιστική Ανάλυση.....	41
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
Επαγωγική στατιστική	48
Έλεγχος υποθέσεων για τον πολυμορφισμό <i>CD14</i> rs2569190	52
Λογιστική παλινδρόμηση για τον πολυμορφισμό <i>CD14</i> rs2569190 C-159T	54
Έλεγχος υποθέσεων για τον πολυμορφισμό <i>IL18</i> rs1834481	55
Λογιστική παλινδρόμηση για τον πολυμορφισμό <i>IL18</i> rs1834481.....	57
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62
Περιεχόμενα Εικόνων	62
Περιεχόμενα Πινάκων.....	63
Αναφορές	64

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Ο Ιός Δυτικού Νείλου - West Nile Virus (WNV)

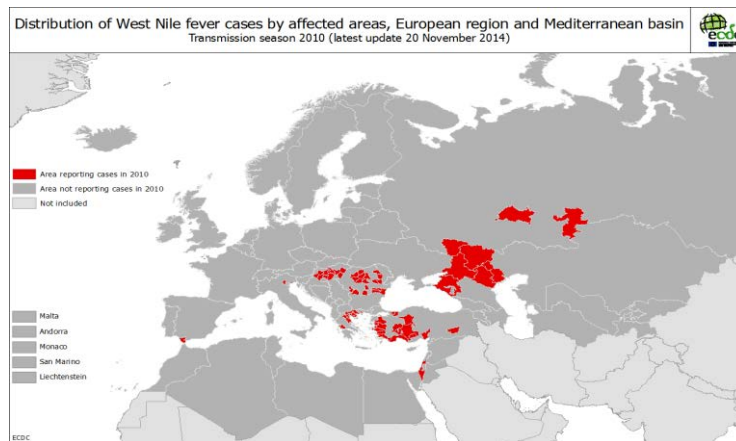
Γενικές πληροφορίες για τον ιό του Δυτικού Νείλου

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (West Nile Virus - WNV) είναι ένας RNA αρμποϊός που μεταδίδεται μέσω δήγματος κουνουπιού του γένους *Culex* που είναι ο κύριος φορέας του ιού. Έχει ως βασική φυσική δεξαμενή του (reservoir) στην φύση τα πτηνά ενώ προσβάλλει στην συνέχεια τον άνθρωπο και διάφορα ζώα (Ciota, 2017) (Boga, Alvarez-Arguelles, & Rojo-Alba, 2019). Είναι μέλος της οικογένειας *Flaviviridae*, γένος *Flavivirus*. Οι φλαβοϊοί είναι μια ομάδα μονόκλωνων ιών RNA, που παρά τις ομοιότητες στη δομή και στο τρόπο μετάδοσης, διαφέρουν ως προς τη γεωγραφική κατανομή, τις κλινικές εκδηλώσεις (π.χ. αιμορραγικός πυρετός στον Δάγκειο έναντι νευροδισδυτικής νόσου στη λοίμωξη από WNV) και το μηχανισμό διαφυγής από το ανοσιακό σύστημα. Η κλιματική αλλαγή (αυξημένες θερμοκρασίες, ξηρασίες, απρόβλεπτες βροχοπτώσεις) ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των κουνουπιών και, κατ' επέκταση, την εξάπλωση του WNV.

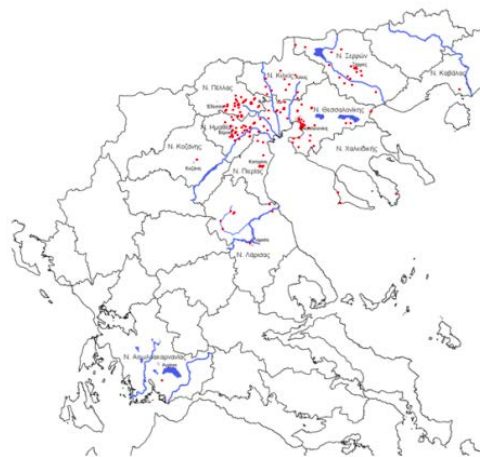
Επιδημιολογικά δεδομένα

Το 2010, αρκετές χώρες της Ευρώπης και της Μεσογείου ανέφεραν εγχώρια κρούσματα πυρετού του Δυτικού Νείλου, συμπεριλαμβανομένων της Αυστρίας, της Ελλάδας, της Ουγγαρίας, της Ιταλίας, της Ρουμανίας και της Ισπανίας. Ταυτόχρονα, εξάρσεις της νόσου καταγράφηκαν και στην Τουρκία και τη Ρωσία. (ECDC, 2025)

Το καλοκαίρι του 2010 εμφανίστηκε στην Ελλάδα το πρώτο κρούσμα λοίμωξης από τον Ιό του Δυτικού Νείλου ενώ εντός πέντε μηνών εμφανίστηκαν 262 περιστατικά του ιού εκ των οποίων τα 197 με κλινική εικόνα από το κεντρικό νευρικό σύστημα όπως μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, οξεία χαλαρή παράλυση ενώ τα υπόλοιπα παρουσίασαν ήπιες κλινικές εκδηλώσεις με κύριο σύμπτωμα τον πυρετό (Εικόνα 3). Συνολικά 35 ασθενείς κατέληξαν οι οποίοι στο σύνολο τους ήταν μεγάλης ηλικίας και με υποκείμενα νοσήματα (Eleni Patsoula, 2016).



Εικόνα 1 Κρούσματα πυρετού του Δυτικού Νείλου ανά πληγείσα περιοχή στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο, περίοδος μετάδοσης 2010 (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-fever-cases-affected-areas-europe-and-mediterranean-2010-transmission>)



Εικόνα 2 Χάρτης αποτύπωσης ασθενών με λοίμωξη από τον Ιό του Δυτικού Νείλου με εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα, 2010 (https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/etisia_ekthesi_idn_2010_ellada_revised_2013.pdf)

Η γεωγραφική κατανομή των κρουσμάτων WNV στην Ελλάδα αναδεικνύει τόσο χρονικές όσο και περιφερειακές διακυμάνσεις, με ορισμένες περιοχές να εμφανίζουν υψηλότερο αριθμό κρουσμάτων από άλλες. Ένας συνδυασμός περιβαλλοντικών, κλιματικών και οικολογικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των υδροβιότοπων που υποστηρίζουν πληθυσμούς κουνουπιών, συμβάλλουν σε αυτή την κατανομή. Μετά από την μεγάλη επιδημία το 2010, ο ιός θεωρήθηκε ενδημικός στη χώρα, με εμφάνιση επαναλαμβανόμενων κρουσμάτων κυρίως κατά τους καλοκαιρινούς και πρώιμους φθινοπωρινούς μήνες. Ειδικότερα, τα έτη 2018 και 2022 σημειώθηκε σημαντική αναζωπύρωση των κρουσμάτων WNV. Το 2018, η Ελλάδα βίωσε μία από τις μεγαλύτερες επιδημίες της με καταγραφή 317 κρουσμάτων, εκ των οποίων τα 51 ήταν θανατηφόρα. Μετά από μια μικρή μείωση του αριθμού των κρουσμάτων τα επόμενα έτη, το 2022 σημειώθηκε νέα σημαντική αύξηση, με 286 αναφερόμενα κρούσματα και 33 θανάτους (Πίνακας 1). Η αύξηση των κρουσμάτων το 2022 αποδίδεται κυρίως στις ευνοϊκές συνθήκες για την αναπαραγωγή κουνουπιών, συμπεριλαμβανομένων των θερμότερων θερμοκρασιών και των αυξημένων βροχοπτώσεων, οι

οποίες δημιούργησαν ιδανικό οικοσύστημα για την αναπαραγωγή του κουνουπιού *Culex spp*, τον κύριο φορέα του WNV.

Σύμφωνα με τις ετήσιες εκθέσεις επιδημιολογικής επιτήρησης της λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα που συντάσσονται από τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ), η πλειονότητα των κρουσμάτων καταγράφηκε σε αγροτικές και ημιαστικές περιοχές της Κεντρικής Μακεδονίας, της Θεσσαλίας και της Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από εκτεταμένα υδροτοπικά οικοσυστήματα. Οι περιοχές αυτές ευνοούν την αναπαραγωγή κουνουπιών και υποστηρίζουν μεγάλους πληθυσμούς μεταναστευτικών πτηνών, τα οποία λειτουργούν ως φυσικές δεξαμενές του ιού. Πιο συγκεκριμένα, μεταξύ 2010 και 2023, καταγράφηκαν πάνω από 1.800 κρούσματα WNV σε ανθρώπους, με κορύφωση το 2018 (300+ κρούσματα, 51 θάνατοι). Οι κλιματικές συνθήκες (ήπιοι χειμώνες, θερμά και υγρά καλοκαίρια) επηρεάζουν σημαντικά τις διακυμάνσεις των κρουσμάτων (ΕΟΔΥ).

Η Ημαθία, στην Κεντρική Μακεδονία, συγκαταλέγεται στις πιο πληγείσες περιοχές. Από το 2010 έως το 2023, καταγράφηκαν περίπου 120 επιβεβαιωμένα κρούσματα, με μέγιστες τιμές τα έτη 2010 (39 από το 197 περιστατικά) (Εικόνα 3), 2018 (35 από τα 316 περιστατικά) και 2022 (36 από τα 286 περιστατικά) (Εικόνα 4). Παρά τις στοχευμένες ενέργειες ελέγχου (ψεκασμοί, λαρβιοκτόνα), η περιοχή συνεχίζει να αντιμετωπίζει προκλήσεις, αν και τα τελευταία στοιχεία (2021–2023) υποδεικνύουν σχετική ύφεση των κρουσμάτων χάρη στις εντατικές προσπάθειες επιτήρησης και ενημέρωσης (ΕΟΔΥ).

Κρούσμα τα λοιμώξη ς από ιό του ΔΝ	Έτος													
	20 10	20 11	20 12	20 13	20 14	20 15	20 16	20 17	20 18	20 19	20 20	20 21	20 22	20 23
Σύνολο κρουσμά των	26 2	10 0	16 1	86	15	0	0	48	31 7 ²	22 7	14 5	59	28 6	16 2
Με προσβολ ή του ΚΝΣ¹	19 7	75	10 9	51	14	0	0	28	24 3	14 0	11 6	38	18 4	11 9
Χωρίς προσβολ ή του ΚΝΣ	65	25	52	35	1	0	0	20	74	87	29	21	10 2	43
Αριθμός θανούντ ων	35	9	18	11	6	0	0	5	51 ³	35	23	8	33	23

Πίνακας 1 Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου (ΔΝ), με και χωρίς προσβολή του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), και αριθμός θανάτων σε ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό, Ελλάδα, 2010 – 2023 1)Εγκεφαλίτιδα ή/και μηνιγγίτιδα ή/και οξεία χαλαρή παράλυση. 2)Περιλαμβάνεται ένα περιστατικό που μολύνθηκε το 2018, αλλά διαγνώσθηκε το 2019. 3)Περιλαμβάνεται ένας θάνατος νοσηλευόμενου ασθενούς που μολύνθηκε το 2018 και κατέληξε το 2019.



Εικόνα 3 Επίπτωση (ανά 100,00 πληθυσμού) ασθενών που έχουν διαγνωσθεί με λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου με εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα ανά Καλλικρατικό Δήμο, Ελλάδα, 2010. ΕΟΔΥ



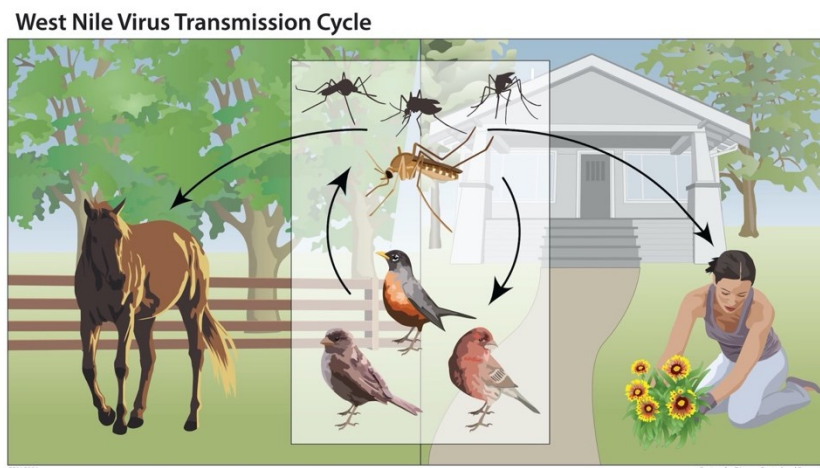
Εικόνα 4 Γεωγραφική κατανομή κρουσμάτων λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου, Ελλάδα, 2022

Σε εθνικό επίπεδο, οι δράσεις του ΕΟΔΥ, σε συνεργασία με το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων και διεθνείς φορείς όπως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), έχουν ενισχύσει την έγκαιρη ανίχνευση του ιού, την επιτήρηση των κουνουπιών και τις εκστρατείες ευαισθητοποίησης του κοινού (εντομοαπωθητικά, σήτες, απομάκρυνση στάσιμων νερών). Ωστόσο, η συνεχιζόμενη κλιματική αλλαγή και οι ευνοϊκές

συνθήκες αναπαραγωγής των κουνουπιών απαιτούν διαρκή εγρήγορση, ιδιαίτερα σε περιοχές όπως η Ημαθία, όπου ο WNV παραμένει σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία.

Μετάδοση του ιού

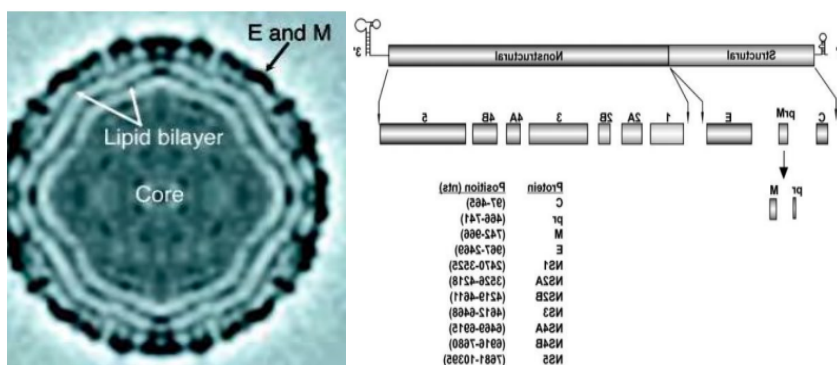
Ο ιός του Δυτικού Νείλου μεταδίδεται κυρίως μέσω τσιμπήματος μολυσμένων κουνουπιών, ιδιαίτερα του γένους *Culex*. Τα κουνούπια μολύνονται όταν τρέφονται με μολυσμένα πτηνά, τα οποία μπορούν να αναπτύξουν υψηλά επίπεδα του ιού στο αίμα τους. Στη συνέχεια, τα μολυσμένα κουνούπια μπορούν να μεταδώσουν τον ιό σε ανθρώπους και άλλα θηλαστικά μέσω τσιμπήματος. Οι άνθρωποι, τα άλογα και άλλα θηλαστικά θεωρούνται "αδιέξοδοι ξενιστές", καθώς δεν αναπτύσσουν υψηλά επίπεδα του ιού στο αίμα τους και δεν μπορούν να τον μεταδώσουν σε άλλα κουνούπια. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ο ιός έχει μεταδοθεί μέσω μετάγγισης αίματος, μεταμόσχευσης οργάνων, από μητέρα σε παιδί κατά την εγκυμοσύνη, τον τοκετό ή τον θηλασμό, καθώς και μέσω έκθεσης σε εργαστηριακό περιβάλλον. Δεν μεταδίδεται μέσω βήχα, φτερνίσματος, αγγίγματος, επαφής με ζωντανά ζώα ή κατανάλωσης μολυσμένου κρέατος, εφόσον το κρέας είναι πλήρως μαγειρεμένο. (CDC, 2024) (Εικόνα 5)



Εικόνα 5 Κύκλος μετάδοσης του Ιού του Δυτικού Νείλου (πηγή : <https://www.cdc.gov/west-nile-virus/php/transmission/index.html>)

Δομή και γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV)

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV) είναι μέλος του γένους *Flavivirus*, μέρος της οικογένειας *Flaviviridae*, η οποία περιλαμβάνει άλλους σημαντικούς αρμποϊούς όπως ο δάγκειος πυρετός, ο Ζίκα και ο κίτρινος πυρετός. Το ιικό σωματίδιο του ιού έχει διάμετρο περίπου 50nm, είναι μικρό, σφαιρικό και περιβάλλεται από φάκελο. Η σύνθεση του ιικού σωματιδίου συνίσταται από τρεις δομικές πρωτεΐνες, το RNA γονιδίωμα και τη λιπιδιακή μεμβράνη δύο στρωμάτων που προέρχεται από τον ξενιστή. Ο WNV διαθέτει μονόκλωνο, θετικής φοράς γονιδίωμα RNA περίπου 11.000 νουκλεοτιδίων με φορά 5'-3', με ένα open reading frame (ORF) που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη. Το γονιδίωμα αποτελείται από τρεις περιοχές: 5' UTR, ORF (δομικές/μη δομικές πρωτεΐνες) και 3' UTR. (Campbell GL, 2002) (Chancey C, 2015) (Drzewnioková, 2019)



Εικόνα 6 Η δομή και το γονιδίωμα του WNV (Mukhopadhyay S., Kim, B.S., Chipman P.R., Rossmann M.G., and Kuhn R.J. (2003). Structure of West Nile virus. Science 302, 248. και Brinton MA. (2002). The Molecular Biology of West Nile Virus: A New Invader of the Western

- **Μη μεταφραζόμενη περιοχή 5' (5' UTR):** Ρυθμίζει τη μετάφραση και την αντιγραφή του RNA και επηρεάζει τη διαμόρφωση των ανοσολογικών αποκρίσεων του ξενιστή, συμβάλλοντας στην ικανότητα του WNV να αποφεύγει την έγκαιρη ανοσολογική αντίχρηση. (Koo QY, 2009)
- **Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF):** κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη, η οποία διασπάται τόσο από ικές πρωτεάσες όσο και από πρωτεάσες του ξενιστή σε τρεις δομικές πρωτεΐνες και επτά μη δομικές πρωτεΐνες, καθεμία από τις οποίες έχει διακριτές λειτουργίες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του ιού, την παθογονικότητα και την ανοσολογική αποφυγή. (Campbell GL, 2002) (Koo QY, 2009)
- **Μη μεταφραζόμενη περιοχή 3' (3' UTR):** είναι μια κρίσιμη μη κωδικοποιούμενη αλληλουχία που εμπλέκεται στη ρύθμιση της αντιγραφής του ιού, της σταθερότητας του RNA και της μετάφρασης. Επιπλέον, η 3' UTR παίζει ρόλο στον καθορισμό της νευροδιεισδυτικής δυνατότητας του ιού, το οποίο αποτελεί βασικό παράγοντα στην εγκεφαλίτιδα που προκαλείται από τον WNV. (Rizzo S, 2020)

Δομικές Πρωτεΐνες

Οι τρεις ικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από γονίδια κοντά στο 5' άκρο του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης :

- **Capsid (C):** Εγκλείει το ιικό RNA, σχηματίζοντας το πυρηνοκαψίδιο και διευκολύνοντας τη συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων. (Koo QY, 2009)
- **Pre-membrane (prM):** Σταθεροποιεί την πρωτεΐνη E και αποτρέπει την πρόωρη σύντηξη. Κατά τη διαδικασία ωρίμανσης διασπάται σε πρωτεΐνη M.
- **Envelop (E):** Κύρια επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη, υπεύθυνη για την πρόσδεση σε υποδοχείς και τη σύντηξη των μεμβρανών. Κεντρικός στόχος για εξουδετερωτικά αντισώματα και ανάπτυξη εμβολίων. (Rizzo S, 2020)

Μη Δομικές Πρωτεΐνες

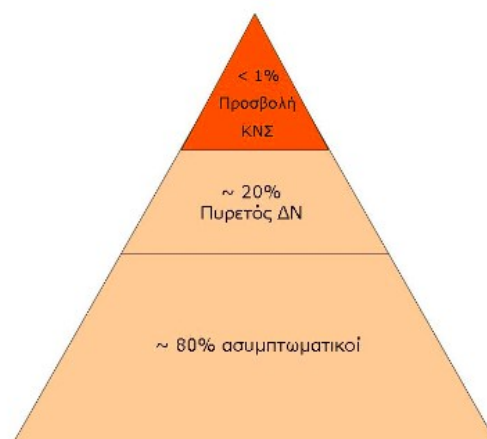
Οι επτά αυτές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από γονίδια κοντά στο 3' άκρο του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης. Οι μη δομικές πρωτεΐνες του ιού είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση των ιικών μηχανισμών μετάφρασης, μετάφρασης και αντιγραφής και περιορίζουν τις αντιικές αποκρίσεις του ξενιστή :

- **NS1:** Ρυθμίζει την αναγνώριση από το σύστημα συμπληρώματος
- **NS2A:** Απαραίτητη για την αντιγραφή, καταστέλλει την μεταγραφή της IFN-β
- **NS2B:** Λειτουργεί ως συμπαράγοντας της NS3.
- **NS3:** Πολυλειτουργική πρωτεΐνη (πρωτεάση, ελικάση, τριφωσφατάση RNA), ουσιαστική για τη διάσπαση της πολυπρωτεΐνης και για τον μηχανισμό αντιγραφής του ιού και τη συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων.
- **NS4A, NS4B:** Τροποποιούν τις μεμβράνες των κυττάρων-ξενιστών για τη δημιουργία συμπλόκων αντιγραφής. Η NS4B αναστέλλει τη σηματοδότηση ιντερφερόνης.
- **NS5:** RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, κρίσιμη για την αντιγραφή και ανοσολογική διαφυγή (Colpitts, Conway, & Montgomery, 2012) (Koo QY, 2009) (Valiakos, 2013).

Η πρωτεΐνη E του WNV καθορίζει την είσοδό του στα κύτταρα ξενιστές (σύνδεση σε υποδοχείς, ενδοκυττάρωση και μεμβρανική σύντηξη). Μεταλλάξεις σε αυτήν μπορεί να ενισχύσουν τη διεισδυτική ικανότητα του ιού στο κεντρικό νευρικό σύστημα, αυξάνοντας την ικανότητα μόλυνσης των νευρικών κυττάρων και διάσχισης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Επιπλέον, τροποποιήσεις σε μη δομικές πρωτεΐνες (NS3, NS5) μπορούν να επηρεάσουν την ταχύτητα αντιγραφής και την ανοσολογική απόκριση, διαμορφώνοντας τη σοβαρότητα της νόσου. (Koo QY, 2009) (Rani A, 2024)

Κλινική εικόνα της λοίμωξης από ιό του Δυτικού Νείλου

Η λοίμωξη από τον WNV εμφανίζει ευρύ κλινικό φάσμα, με την πλειονότητα των ατόμων (περίπου 80%) να παραμένει ασυμπτωματική. Στο υπόλοιπο 20% των περιπτώσεων, εμφανίζονται ήπια συμπτώματα, κυρίως χαμηλός πυρετός, κεφαλαλγία, μυαλγίες/αρθραλγίες, γενικευμένη αδυναμία και κόπωση (καταβολή), που ενίοτε δυσχεραίνουν την αρχική διάγνωση επειδή μοιάζουν με άλλες ιογενείς λοιμώξεις. Σε ορισμένα άτομα μπορεί να παρουσιαστούν επίσης συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα (ναυτία, έμετοι, διάρροιες, ανορεξία, κοιλιακός πόνος), δερματικά εξανθήματα και διόγκωση των λεμφαδένων. Τα ήπια αυτά συμπτώματα είναι συνήθως αυτοϊώμενα και υποχωρούν μέσα σε λίγες ημέρες έως μερικές εβδομάδες, συχνά χωρίς ιατρική παρέμβαση. (Colpitts, Conway, & Montgomery, 2012) Ωστόσο, περίπου 1% των ατόμων που μολύνονται αναπτύσσουν σοβαρή μορφή της νόσου η οποία εξελίσσεται σε νευροδιεισδυτική μορφή, πλήττοντας το κεντρικό νευρικό σύστημα. Αυτή μπορεί να εκδηλωθεί ως εγκεφαλίτιδα (φλεγμονή του εγκεφάλου), μηνιγγίτιδα (φλεγμονή των μεμβρανών γύρω από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό) ή οξεία χαλαρή παράλυση (ξαφνική μυϊκή αδυναμία). Οι ασθενείς που αναπτύσσουν σοβαρή νόσο εμφανίζουν συχνά υψηλό πυρετό, κεφαλαλγία, δυσκαμψία στον αυχένα, αποπροσανατολισμό και διαταραχές επιπέδου συνείδησης, και άλλα νευρολογικά συμπτώματα όπως τρόμο/σπασμούς και αστάθεια, διαταραχές όρασης και μυϊκή αδυναμία, ενώ σε πολύ σοβαρές περιπτώσεις ο ασθενής μπορεί να καταλήξει. Επιπρόσθετα, ασθενείς με σοβαρή λοίμωξη WNV έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης νευρολογικών διαταραχών, όπως γνωστικά ελλείμματα, κινητικές διαταραχές ή χρόνια κόπωση, και μετά την ίαση της λοίμωξης (Koch M, 2021) (Suen WW, 2014) (ΕΟΔΥ).



Εικόνα 7 Κλινική εικόνα λοίμωξης από τον Ιό του Δυτικού Νείλου στον άνθρωπο (<http://www.malwest.gr/el-gr/>)

Παράγοντες κινδύνου σοβαρής ασθένειας του Ιού του Δυτικού Νείλου

Σοβαρή εκδήλωση της νόσου μπορεί να συμβεί σε κάθε ασθενή. Τα άτομα άνω των 60 ετών όπως και όσοι πάσχουν από χρόνιες παθήσεις (διαβήτη, υπέρταση, νεφρική νόσο, καρκίνο) ή βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή διατρέχουν ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν σοβαρή νόσο με εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Επιπλέον, το αρσενικό φύλο έχει μεγαλύτερες πιθανότητες για εμφάνιση μηνιγγίτιδας (Lindsey NP, 2012). Πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν τα γενετικά χαρακτηριστικά νοσούντων από ιογενείς λοιμώξεις με τη βαρύτητα της κλινικής εικόνας του ασθενή. Πολυμορφισμοί σε γονίδια που σχετίζονται με την ανοσιακή απόκριση, όπως στα γονίδια *IL18* και *CD14*, έχουν μελετηθεί για τον πιθανό ρόλο τους στην έκβαση της νόσου. (Colpitts, Conway, & Montgomery, 2012) (Campbell GL, 2002) (Koch M, 2021) (Suen WW, 2014) (Bakaros E, 2023) (De Filette M, 2012)

Ανοσιακή απάντηση έναντι του Ιού του Δυτικού Νείλου και ανοσολογική διαφυγή

Η ανοσιακή απάντηση έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV) συνιστάται από τη συνεργασία του έμφυτου όσο και προσαρμοστικού ανοσιακού συστήματος. Ο ιός ενεργοποιεί μια αλληλουχία συμβάντων που αποσκοπούν στον έλεγχο του ιικού πολλαπλασιασμού και στον περιορισμό της εξάπλωσης της λοίμωξης. Η εξέλιξη και η σοβαρότητα της νόσου του WNV καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από την αποτελεσματικότητα της ανοσιακής απάντησης του ξενιστή. (Suthar, 2013).

Σε απόκριση στη μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου (WNV), τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και τα μακροφάγα εκκρίνουν ιντερφερόνες τύπου I (IFNs) και άλλες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ενώ υφίστανται ωρίμανση και ενεργοποίηση. Αυτά τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι απαραίτητα για τον προγραμματισμό τόσο της έμφυτης-προσαρμοστικής διασύνδεσης όσο και της προσαρμοστικής ανοσιακής απόκρισης. Ωστόσο, παραμένει ασαφές το πώς οι οδοί έμφυτης ανοσιακής ανίχνευσης, όπως οι υποδοχείς τύπου RIG-I (RLR), οι υποδοχείς τύπου Toll (TLR) ή οι υποδοχείς τύπου NOD (NLR), ρυθμίζουν αυτές τις αποκρίσεις κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από τον WNV.

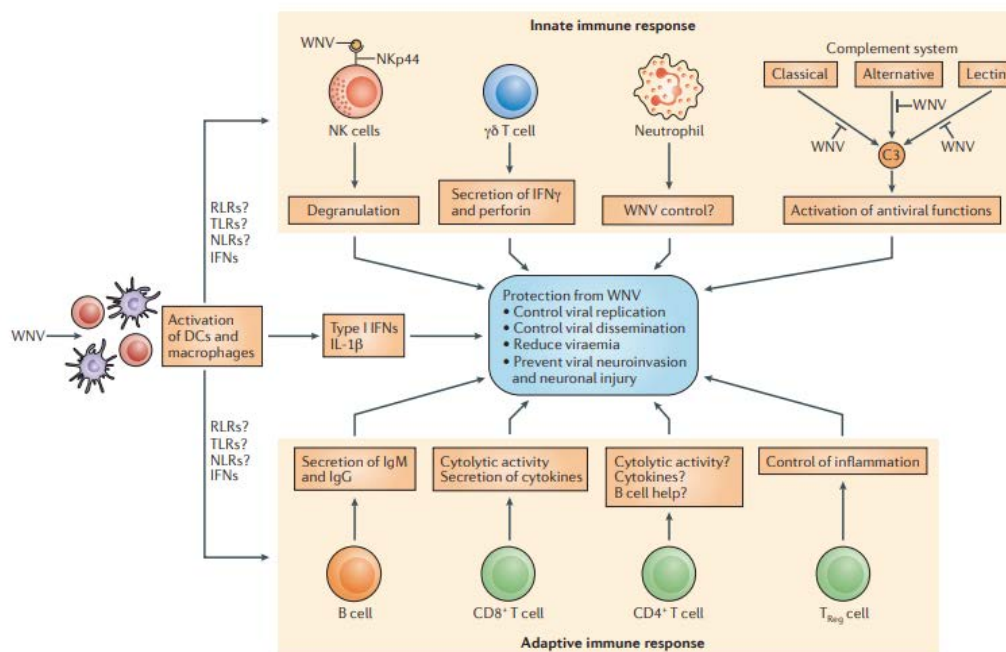
Στο πλαίσιο της διασύνδεσης μεταξύ έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας, τα ουδετερόφιλα, τα γδ Τ κύτταρα και πιθανώς τα φυσικά κυτταροκτόνα (NK) κύτταρα διαδραματίζουν ρόλο στον πρώιμο έλεγχο της μόλυνσης από τον WNV. Αντίθετα, η προσαρμοστική ανοσιακή απόκριση, που περιλαμβάνει τη χυμική (κύτταρα Β) και την κυτταρική ανοσία (CD8⁺ Τ κύτταρα, CD4⁺ Τ κύτταρα και ρυθμιστικά Τ (Treg) κύτταρα), είναι ζωτικής σημασίας για την εκκαθάριση του ιού και την προστασία από τη μόλυνση.

Η ανοσιακή απόκριση που περιγράφεται σε αυτό το μοντέλο είναι καθοριστική για την προστασία από τον WNV, περιλαμβάνοντας τον έλεγχο του ιικού πολλαπλασιασμού στα περιφερικά όργανα (όπως οι αποχετευτικοί λεμφαδένες και ο σπλήνας), τη μείωση της αιμίας, τον περιορισμό του τροπισμού στους ιστούς, την αποτροπή της νευροδιείσδυσης, τη ρύθμιση της ιικής αναπαραγωγής και διασποράς στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και την πρόληψη νευρωνικής βλάβης.

Παράλληλα, ο WNV έχει αναπτύξει μηχανισμούς που του επιτρέπουν να αποφεύγει την κυτταρο-ενδογενή ανοσία, συμπεριλαμβανομένης της πρώιμης ανίχνευσης από τους RLRs, του αποκλεισμού της σηματοδότησης μέσω του TLR3 και των ιντερφερονών τύπου Ι, καθώς και της αναστολής της ενεργοποίησης του συμπληρώματος.

Μια αποτυχία σε αυτές τις ανοσολογικές αποκρίσεις μπορεί να οδηγήσει σε πιο σοβαρές εκβάσεις, όπως η νευροδιεισδυτική νόσος. (Keller BC, 2007)

Ο WNV μπορεί να διαφύγει της ανοσιακής απάντησης του από τον ξενιστή κυρίως μέσω των μη δομικών πρωτεϊνών του. Η NS1 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αναστολή της ενεργοποίησης του συστήματος του συμπληρώματος του ξενιστή, αποτρέποντας έτσι την καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων από τους μηχανισμούς του ανοσιακού συστήματος. Ομοίως, έχει αποδειχθεί ότι η NS4B διαταράσσει τη σηματοδότηση της ιντερφερόνης επιτρέποντας στον ιό να πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα στα αρχικά στάδια της λοίμωξης. Αυτοί οι μηχανισμοί διαφυγής υπογραμμίζουν τη σημασία συγκεκριμένων γονιδιωματικών περιοχών στην ικανότητα του ιού να εγκαθιδρύει τη λοίμωξη και να συμβάλλει στο παθογόνο δυναμικό του. (Keller BC, 2007)



Εικόνα 8 Κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία στη μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου (10.1038/nrmicro2950)

Φυσική ανοσολογική απόκριση

Το έμφυτο ανοσιακό σύστημα αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας κατά της λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου (WNV). Η αναγνώριση του WNV από τον ξενιστή διαμεσολαβείται από υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs) που ανιχνεύουν το ιικό RNA εντός των μολυσμένων κυττάρων. Μεταξύ των σημαντικότερων PRRs είναι οι υποδοχείς τύπου toll (Toll like receptors, TLRs), ειδικά ο TLR3, ο οποίος αναγνωρίζει το δίκλωνο RNA (ένα ενδιάμεσο προϊόν αντιγραφής του WNV). Επιπλέον, οι κυτταροδιαλυτοί υποδοχείς RIG-I-like receptors (RLRs), όπως το επαγωγίμο από ρετινοϊκό οξύ γονίδιο I (RIG-I) και το μελανοκυτταρικό αντιγόνο διαφοροποίησης 5 (MDA5), οι οποίοι εκφράζονται σε πληθώρα κυτταρικών τύπων έχουν την τάση να αυξάνονται κατά την ιική μόλυνση ανιχνεύοντας το ιικό RNA εντός του κυτταροπλάσματος καθώς και σε απάντηση της μετέπειτα παραγωγής ιντερφερονών τύπου I. Ταυτόχρονα, η εμπλοκή αυτών των PRRs πυροδοτεί μεταγενέστερα σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στην παραγωγή ιντερφερονών τύπου I (IFN- α και IFN- β) και άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, οι οποίες είναι κρίσιμες αντι-ιικές κυτταροκίνες (εικόνα 8). (Mehul S. Suthar)

Οδός RIG-I-like receptors (RLRs)

Οι υποδοχείς RIG-I, MDA5 και LGP2 ανιχνεύουν το ιικό RNA στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιούνται μέσω υδρόλυσης ATP, προκαλώντας διαμορφωτικές αλλαγές και ολιγομερισμό. Στη συνέχεια, μετακινούνται προς τις κυτταρικές μεμβράνες και αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη προσαρμογέα MAVS (mitochondrial antiviral signaling). Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση και πυρηνική μετατόπιση των IRF3 και NF κ B, που επάγουν την έκφραση IFN- β . Ο WNV παρεμποδίζει αυτήν την οδό πιθανώς μέσω απόκρυψης ή δέσμευσης του ιικού RNA, ενώ οι ιικές πρωτεΐνες μπορεί να αναστέλλουν την παραγωγή IFN-I. (Loo, 2011) (Bruns, 2012)

Οδός Toll-like receptors (TLRs)

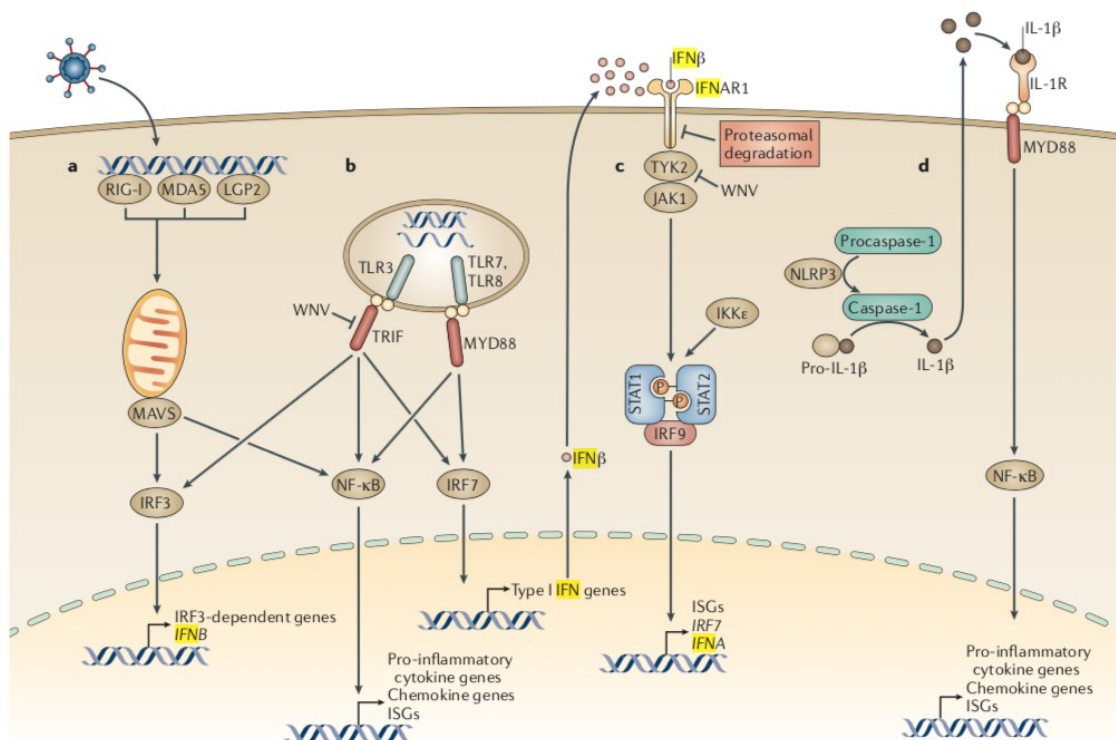
Οι υποδοχείς TLR3, TLR7 και TLR8 ανιχνεύουν ιικό RNA στα ενδοσώματα και ενεργοποιούν μονοπάτια σηματοδότησης μέσω των TRIF και MYD88. Αυτά τα μονοπάτια προάγουν την έκφραση γονιδίων εξαρτώμενων από NFκB, IRF3 και IRF7, οδηγώντας στην παραγωγή IFN-β και προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Ο WNV αναστέλλει τη σηματοδότηση μέσω TLR3 και μπορεί επίσης να αναστείλει την παραγωγή IFN-I. (Akira, 2006) (Wilson, 2008)

Οδός τύπου I ιντερφερονών (IFN)

Η IFN-β που εκκρίνεται από το μολυσμένο κύτταρο δεσμεύεται σε αυτοκρινή και παρακρινή μορφή στον υποδοχέα IFNAR1/IFNAR2, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση των TYK2 και JAK1. Αυτό προάγει τη συναρμολόγηση του συμπλόκου ISGF3 (STAT1-STAT2-IRF9), το οποίο μετατοπίζεται στον πυρήνα και επάγει την έκφραση IFN-stimulated genes (ISGs), ενισχύοντας την ενδογενή αντική ανοσία. Ο WNV αναστέλλει την ενεργότητα του TYK2 και προάγει την αποικοδόμηση του IFNAR1, διαταράσσοντας τη σηματοδότηση των ιντερφερονών τύπου I. Ποντίκια με ανεπάρκεια στη σηματοδότηση IFN-I εμφανίζουν ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του WNV και καταλήγουν γρήγορα. Ο WNV αντιστέκεται στην IFN-I μέσω των μη δομικών πρωτεϊνών NS2A και NS4B, που αναστέλλουν τη σηματοδότηση IFN. (Keller BC, 2007) (Mehul S. Suthar) (Benzarti E, 2023) (Tenoever, 2007) (Perwitasari, 2011)

Οδός φλεγμονοσώματος NLRP3

Το NLRP3 inflammasome ενεργοποιείται μετά τη μόλυνση με WNV, οδηγώντας σε πρωτεολυτική διάσπαση της προ-IL-1β στη λειτουργική IL-1β. Η εκκρινόμενη IL-1β δεσμεύεται στον υποδοχέα IL-1R, ενεργοποιώντας το NFκB και προάγοντας την έκφραση γονιδίων εξαρτώμενων από NFκB, καθώς και τη ρύθμιση των ISGs. (Ichikawa, 2002)



Εικόνα 9 Κυτταρική-ενδογενής έμφυτη ανοσολογική απόκριση στη μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου. (10.1038/nrmicro2950)

Το σύστημα συμπληρώματος, μέσω των κλασικού, λεκτινικού και εναλλακτικού μονοπατιών, προάγει την οψωνοποίηση, λύση του ιού, ενεργοποίηση B κυττάρων και ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας των T κυττάρων, συμβάλλοντας στην προστασία έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV). Η ανεπάρκεια C3, C1q, C4, factor B ή C5 αυξάνει την ευαισθησία στη μόλυνση, επιβεβαιώνοντας τον ρόλο του συμπληρώματος στην αντική άμυνα. Ωστόσο, ο WNV αναστέλλει το συμπλήρωμα μέσω της πρωτεΐνης NS1, η οποία δεσμεύει τον παράγοντα H, μειώνοντας την εναπόθεση C3b, ενώ παρεμβαίνει στα C1s, C4 και C4BP, αποδυναμώνοντας την ενεργοποίηση των κλασικών και λεκτινικών μονοπατιών. Η αναστολή του συμπληρώματος, ιδιαίτερα σε περιφερικούς ιστούς, επιτρέπει στον WNV να αποφύγει την ανοσολογική εξουδετέρωση και να διαφύγει από τον ανοσιακό έλεγχο. (Suthar, 2013)

Χυμική ανοσία

Η χυμική ανοσία, κυρίως μέσω B κυττάρων και εξουδετερωτικών αντισωμάτων, παίζει καθοριστικό ρόλο στην άμυνα κατά του WNV. Τα αντισώματα που στοχεύουν την ιική πρωτεΐνη E εμποδίζουν την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή και τη διάχυσή του στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αρχικά παράγονται αντισώματα IgM, τα οποία περιορίζουν τη λοίμωξη, ενώ στη συνέχεια παράγονται IgG, εξασφαλίζοντας μακροχρόνια προστασία. Μελέτες παθητικής μεταφοράς αντισωμάτων υπογραμμίζουν τη ζωτική συμβολή της χυμικής απόκρισης, καθώς άτομα ή οργανισμοί με μειωμένη παραγωγή αντισωμάτων διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο σοβαρών και παρατεταμένων λοιμώξεων. (Fredericksen, 2013) (Michael S. Diamond, 2009)

Γενετικοί παράγοντες στην ανοσολογική απόκριση

Η γενετική παραλλακτικότητα, όπως μεταλλάξεις και ανασυνδυασμοί, στα γονίδια της ανοσιακής απόκρισης μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία σε σοβαρή νόσο WNV. Ο περισσότερο μελετημένος πολυμορφισμός, που φαίνεται να επηρεάζει τη σοβαρότητα της λοίμωξης είναι στο γονίδιο *OAS1*. Το *OAS1* είναι ένα κρίσιμο γονίδιο της έμφυτης ανοσίας, που συμμετέχει στην αντι-ιική άμυνα μέσω της ενεργοποίησης της RNase L (Ριβονουκλεάση L), οδηγώντας στην αποικοδόμηση του ιικού RNA. Συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του *OAS1* επηρεάζουν την ικανότητα αναγνώρισης και καταστολής του WNV, με ορισμένα αλληλόμορφα να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο σοβαρής λοίμωξης και νευροδισειδυτικής νόσου. Συγκεκριμένα, φορείς προστατευτικών αλληλόμορφων εμφανίζουν ισχυρότερη αντι-ιική απόκριση, μειώνοντας έτσι τη σοβαρότητα της νόσου.

Άλλοι μελετημένοι πολυμορφισμοί είναι σε γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης της ιντερφερόνης, όπως το *IFNAR* (Interferon-Alpha/Beta Receptor), μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα του ξενιστή να ελέγχει τον πολλαπλασιασμό του WNV. Επιπλέον, γενετικές διαφορές σε γονίδια ανοσιακής απόκρισης, όπως τα *IL28B* και *CCR5*, έχουν συσχετιστεί με αυξημένη ευαισθησία για εμφάνιση νευροδισειδυτικής νόσου. Η κατανόηση αυτών των γενετικών παραγόντων μπορεί να παράσχει πληροφορίες σχετικά με το γιατί ορισμένα άτομα εμφανίζουν σοβαρότερες εκδηλώσεις μετά από μόλυνση από WNV. (Glass, 2005)

Σε μελέτη που διεξήχθη από το εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη σοβαρότητα της COVID-19, εντοπίστηκε πως ο πολυμορφισμός *IL18* rs1834481 συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πνευμονίας και σοβαρής νόσου. Το G αλληλόμορφο του rs1834481, το οποίο έχει προηγουμένως συσχετιστεί με χαμηλότερα επίπεδα IL-18, φάνηκε να προδιαθέτει για πιο σοβαρές εκβάσεις μετά από μόλυνση με SARS-CoV-2, πιθανώς λόγω ανεπαρκούς αρχικής ανοσιακής απόκρισης και επακόλουθης απορρύθμισης του ανοσιακού συστήματος. Δεδομένου ότι η IL-18 παίζει κεντρικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία, ο πολυμορφισμός αυτός θα μπορούσε να λειτουργήσει ως μοριακός προγνωστικός δείκτης της σοβαρότητας της νόσου.

Επιπλέον, ενώ ορισμένες μελέτες ανέφεραν πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού *CD14* rs2569190 με τη σοβαρότητα της COVID-19, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δεν υποστήριξαν ισχυρή συσχέτιση. Ωστόσο, δεδομένου ότι το CD-14 λειτουργεί ως βασικός συνυποδοχέας στην ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας, η μελέτη της παραμένει σημαντική στο πλαίσιο των ιογενών λοιμώξεων

Καθώς τόσο η IL-18 όσο και το CD-14 είναι θεμελιώδεις παράγοντες της έμφυτης ανοσιακής απόκρισης, και οι πολυμορφισμοί τους έχουν συσχετιστεί με ιογενή παθογένεια (δηλαδή, τους μηχανισμούς με τους οποίους ένας ιός προκαλεί νόσο), επεκτείναμε την έρευνά μας στη λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου (WNV). Δεδομένου ότι τόσο ο WNV όσο και ο SARS-CoV-2 ενεργοποιούν παρόμοιους ανοσιακούς μηχανισμούς, η μελέτη μας στοχεύει να εξετάσει κατά πόσο οι πολυμορφισμοί rs1834481 και rs2569190 επηρεάζουν την κλινική πορεία και σοβαρότητα της λοίμωξης από WNV. Αυτή η ανάλυση μπορεί να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου αυτών των πολυμορφισμών στην ιογενή ανοσία, δηλαδή, στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού έναντι ιογενών λοιμώξεων, και στην εξέλιξη της νόσου.

CD14

Γενικές πληροφορίες

Το μόριο CD-14 είναι μια κρίσιμη γλυκοπρωτεΐνη στο έμφυτο ανοσιακό σύστημα, που λειτουργεί κυρίως ως υποδοχέας αναγνώρισης προτύπων (PRR). Διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην ανίχνευση μοριακών προτύπων που σχετίζονται με παθογόνα (PAMPs), τα οποία είναι μοριακές υπογραφές που βρίσκονται συνήθως στην επιφάνεια εισβαλόντων μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, ιοί και μύκητες. Ως συνυποδοχέας για τους υποδοχείς τύπου Toll (TLRs), το CD-14 συνεργάζεται στενά με τον TLR4, μεταξύ άλλων, για τον εντοπισμό των λιποπολυσακχαριτών (LPS) που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Αυτή η αναγνώριση ξεκινά μια ισχυρή έμφυτη ανοσολογική απόκριση, που δρα ως μία από τις πρώτες γραμμές άμυνας κατά των λοιμώξεων. (Sharygin D, 2023)

Ο ρόλος του CD-14 στην έμφυτη ανοσία εκτείνεται πέρα από την αναγνώριση βακτηρίων. Συμμετέχει στην αναγνώριση συστατικών από μια ευρεία ποικιλία παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων ιικών και μυκητιακών δομών, συμμετέχοντας έτσι σε ένα ευρύτερο φάσμα ανοσολογικών αποκρίσεων. Η ικανότητα του CD-14 να αναγνωρίζει πολλαπλούς τύπους PAMPs και να συνεργάζεται με άλλους ανοσολογικούς υποδοχείς τον καθιστά έναν ευέλικτο παράγοντα στην έμφυτη ανοσία, εξασφαλίζοντας την άμυνα του ξενιστή έναντι ενός ευρέος φάσματος μολυσματικών παραγόντων. (Sharygin D, 2023)

Γενετική βάση

Το γονίδιο *CD14* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q31.3, μια περιοχή πλούσια σε γονίδια που ρυθμίζουν το ανοσιακό σύστημα. Εκτείνεται σε ~1,4 kb και διαθέτει υποκινητή περιοχή κρίσιμη για την έκφρασή του. Ο πολυμορφισμός *CD14* rs2569190 (C-159T) επηρεάζει αυτή την περιοχή και έχει συσχετιστεί με μεταβολές στην έκφραση του CD-14, επηρεάζοντας την ανοσιακή απόκριση. Έρευνες δείχνουν ότι συγκεκριμένα αλληλόμορφα του *CD14* rs2569190 τροποποιούν την ευαισθησία σε φλεγμονώδεις και μολυσματικές ασθένειες, όπως άσθμα, σήψη, COVID-19 και λοιμώξεις από WNV και SARS-CoV-2. Λόγω του ρόλου του στη φλεγμονώδη απόκριση, ο *CD14* rs2569190 αποτελεί αντικείμενο μελετών στις λοιμώξεις και φλεγμονώδεις παθήσεις (Zhenghao Wu, 2019) (Kamel MA, 2023) .

Ρόλος στις ανοσολογικές αποκρίσεις

Ως υποδοχέας αναγνώρισης προτύπων (PRR), ο CD-14 είναι κρίσιμος στην πρώτη γραμμή άμυνας του έμφυτου ανοσιακού συστήματος, ανιχνεύοντας PAMPs και ξεκινώντας φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η πρωταρχική του λειτουργία είναι η αναγνώριση λιποπολυσακχαριτών (LPS) από αρνητικά κατά Gram βακτήρια, διαδραματίζοντας κρίσιμο ρόλο στην αναγνώριση βακτηριακών λοιμώξεων. Το CD-14 σχηματίζει σύμπλοκο με τους TLR4 και MD2 για την αναγνώριση του LPS, ενεργοποιώντας στη συνέχεια τη σηματοδότηση NF-κB, η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNF-α, η IL-1β και η IL-6. Αυτός ο φλεγμονώδης καταρράκτης είναι ζωτικής σημασίας για τον περιορισμό και την εξάλειψη των λοιμώξεων. (Arroyo-Espliguero R, 2004)

Ρόλος στην αναγνώριση των ιών

Το *CD14* συμβάλλει σημαντικά στην αναγνώριση των ικών συστατικών μέσω των αλληλεπιδράσεών του με τους υποδοχείς τύπου Toll (TLRs), ιδίως τον TLR4, καθώς και τους TLR3, TLR7 και TLR9, ανάλογα με τις εμπλεκόμενες ικές δομές. Αυτοί οι TLRs είναι υπεύθυνοι για την ανίχνευση ικών νουκλεϊκών οξέων, όπως το δίκλωνο RNA (dsRNA) και το μονόκλωνο RNA (ssRNA), τα οποία παράγονται συνήθως κατά την αντιγραφή των ιών. Ενώ οι TLRs μπορούν να αναγνωρίσουν από μόνοι τους τα ιικά συστατικά, το *CD14* χρησιμεύει ως συνυποδοχέας που ενισχύει τη διαδικασία ανίχνευσης και διευκολύνει μια πιο ισχυρή ανοσολογική απόκριση. (Zhenghao Wu, 2019)

Επιπλέον, η συνεργασία του CD-14 με τον TLR4 διευκολύνει την αναγνώριση ικών πρωτεϊνών, όπως οι γλυκοπρωτεΐνες των ιικών φακέλων (π.χ. gp120 του HIV), προωθώντας την ενεργοποίηση προφλεγμονωδών σημάτων. Αυτό οδηγεί στην έκκριση κυτταροκινών όπως η IL-6 και ο TNF- α , οι οποίες όχι μόνο ενισχύουν την αντιική άμυνα αλλά και προσελκύουν ανοσοκύτταρα στο σημείο της λοίμωξης, συμβάλλοντας στην αποτελεσματική κάθαρση των μολυσμένων κυττάρων. (Persaud AT, 2024 MAY)

Η συνεργιστική δράση του CD-14 με τους TLRs εξασφαλίζει την ταχεία και ισχυρή ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης, καθιστώντας το έναν κρίσιμο παράγοντα στην άμυνα κατά των ιογενών λοιμώξεων. (Sharygin D, 2023)

Ενίσχυση των αποκρίσεων κυτταροκινών

Μετά την ανίχνευση των ικών συστατικών, το CD-14 ενισχύει την παραγωγή κυτταροκινών και χημειοκινών που είναι απαραίτητες για μια αποτελεσματική αντιική απάντηση. Ειδικότερα, η παραγωγή ιντερφερόνης- α (IFN- α) και ιντερφερόνης- β (IFN- β) διαδραματίζει βασικό ρόλο στην αναστολή του ιικού πολλαπλασιασμού και στην προώθηση της εκκαθάρισης των μολυσμένων κυττάρων. Επιπλέον, το CD-14 προάγει την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων- α (TNF- α), οι οποίες συμβάλλουν στη δημιουργία ενός αντιικού περιβάλλοντος με την προσέλκυση ανοσιακών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων, στο σημείο της λοίμωξης. (Kunhee Na, 2023)

Γενετικές παραλλαγές και ευαισθησία στις ιογενείς λοιμώξεις

Γενετικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο *CD14*, όπως ο rs2569190, έχουν συνδεθεί με παραλλαγές στις ανοσολογικές αποκρίσεις σε ιογενείς λοιμώξεις. Αυτοί οι πολυμορφισμοί μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα έκφρασης του CD-14, επηρεάζοντας δυνητικά την αποτελεσματικότητα της ικής αναγνώρισης και των επακόλουθων ανοσολογικών αποκρίσεων. Για παράδειγμα, τα άτομα με ορισμένους πολυμορφισμούς του *CD14* μπορεί να παρουσιάζουν αυξημένη ή μειωμένη ευαισθησία σε σοβαρές ιογενείς λοιμώξεις, όπως ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV), ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) και οι ιοί του αναπνευστικού συστήματος. Η κατανόηση αυτών των γενετικών παραγόντων είναι ζωτικής σημασίας για τον εντοπισμό ατόμων με υψηλότερο κίνδυνο για σοβαρή ιογενή νόσο και την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του CD-14 κατά τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων. (Girón-Ortega JA, 2021) (Medhat E, 2015)

Μέσω των αλληλεπιδράσεών του με τους TLRs και τα ιικά συστατικά, το CD-14 ενισχύει τις ανοσολογικές αποκρίσεις, ενισχύοντας την παραγωγή κυτταροκινών και προωθώντας τη φλεγμονή για τον έλεγχο του ιικού πολλαπλασιασμού. Ωστόσο, η ρύθμιση της δραστηριότητας του CD-14 είναι απαραίτητη για την αποφυγή της υπερβολικής φλεγμονής, η οποία μπορεί να συμβάλει στην παθογένεια της νόσου. Οι γενετικές παραλλαγές του *CD14* υπογραμμίζουν περαιτέρω την ανάγκη για καλύτερη κατανόηση των ατομικών ανοσολογικών αποκρίσεων στις ιογενείς λοιμώξεις, προσφέροντας ενδεχομένως μονοπάτια για εξατομικευμένες ιατρικές θεραπείες στο μέλλον.

Λειτουργικός πολυμορφισμός rs2569190

Ο πολυμορφισμός rs2569190 εντοπίζεται στον υποκινητή (promoter) του γονιδίου *CD14* και αφορά την αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου (συνήθως C σε T ή αντίστροφα). Αυτή η μετάλλαξη μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα έκφρασης του *CD-14*, είτε αυξάνοντάς τα είτε μειώνοντάς τα, ανάλογα με τον φαινότυπο (C/C, C/T ή T/T). Το γονίδιο *CD14* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *CD-14*, ένα βασικό μόριο που εμπλέκεται στην έμφυτη ανοσολογική απόκριση, ιδίως στην αναγνώριση μοριακών προτύπων που σχετίζονται με παθογόνα (PAMPs), όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) από αρνητικά κατά Gram βακτήρια.

Λειτουργική σημασία του rs2569190

Ρύθμιση της έκφρασης του *CD-14*: Ο πολυμορφισμός rs2569190 επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου *CD14*, η οποία μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης *CD-14* στην επιφάνεια των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος (π.χ. μονοκύτταρα, μακροφάγα). Μελέτες δείχνουν ότι το αλληλόμορφο T σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του *CD14* σε σύγκριση με το αλληλόμορφο C. Αυτή η υψηλότερη έκφραση μπορεί να οδηγήσει σε ενισχυμένη ανοσολογική απόκριση στον LPS και σε άλλα μικροβιακά συστατικά. (Lin J, 2007) (Keskin O, 2006)

Διαμόρφωση της ανοσολογικής απόκρισης: Το *CD-14* δρα ως συνυποδοχέας για τον υποδοχέα 4 τύπου Toll (TLR4) στην αναγνώριση του βακτηριακού LPS και άλλων PAMPs. Η αυξημένη έκφραση του *CD14* μπορεί να ενισχύσει την ευαισθησία των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος σε μικροβιακά ερεθίσματα, πυροδοτώντας έτσι πιο ισχυρές φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Ενώ αυτό μπορεί να είναι ευεργετικό για την καταπολέμηση των λοιμώξεων, μπορεί επίσης να συμβάλει στην υπερβολική φλεγμονή, η οποία συνδέεται με χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους ή σοβαρές αντιδράσεις σε λοιμώξεις.

Ο πολυμορφισμός rs2569190 έχει διερευνηθεί στο πλαίσιο διαφόρων ασθενειών όπου η ρύθμιση του ανοσιακού συστήματος και η φλεγμονή είναι κρίσιμες, όπως:

Λοιμώδη νοσήματα: Ορισμένες μελέτες υποδηλώνουν ότι τα άτομα με το αλληλόμορφο T μπορεί να έχουν διαφορετικές ανοσολογικές αποκρίσεις σε ορισμένες ιογενείς λοιμώξεις, λόγω τροποποιημένων φλεγμονωδών αποκρίσεων. (Wu YQ, 2018) (Ojurongbe O, 2017)

Σήψη: Ο πολυμορφισμός rs2569190 έχει συσχετιστεί με την ευαισθησία στη σήψη, ιδίως στο σηπτικό σοκ, καθώς τα άτομα με το αλληλόμορφο T μπορεί να έχουν αυξημένη ανοσολογική απόκριση σε βακτηριακά συστατικά όπως ο LPS. (Mansur A, 2015)

Άσθμα και αλλεργίες: Ο πολυμορφισμός rs2569190 έχει συνδεθεί με υψηλότερο κίνδυνο άσθματος και αλλεργικών ασθενειών λόγω του ρόλου του στην ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος και πιο συγκεκριμένα με τα αυξημένα επίπεδα sCD14. (Zhao L, 2011) (Nieto-Fontarigo JJ, 2018)

Χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα: Ο πολυμορφισμός έχει συνδεθεί με παθήσεις όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD), η αθηροσκλήρωση και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, όπου η χρόνια φλεγμονή διαδραματίζει κεντρικό ρόλο. (Bank, 2014)

IL 18

Γενικές πληροφορίες

Η ιντερλευκίνη-18 (*IL-18*) είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στην έμφυτη όσο και στην προσαρμοστική ανοσία. Ανήκει στην οικογένεια των κυτταροκινών *IL-1* και παράγεται από ένα ευρύ φάσμα κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των δενδριτικών κυττάρων, των κερατινοκυττάρων, ακόμη και ορισμένων επιθηλιακών κυττάρων. Η πρωταρχική λειτουργία της *IL-18* είναι να διεγείρει το ανοσιακό σύστημα προάγοντας την παραγωγή ιντερφερόνης- γ (*IFN- γ*), ιδίως μέσω της ενεργοποίησης των κυττάρων φυσικών δολοφόνων (*NK*) και των Τ-βοηθητικών κυττάρων τύπου 1 (*Th1*). Αυτή η κυτταροκίνη είναι απαραίτητη για τη διαμεσολάβηση των μηχανισμών άμυνας του οργανισμού έναντι ιογενών, βακτηριακών και μυκητιασικών λοιμώξεων. (Yasuda, Nakanishi, & Tsutsui, 2019)

Γενετική βάση της IL-18

Το γονίδιο *IL18* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11q22.2-q22.3 και αποτελείται από έξι εξόνια και πέντε ιντρόνια. Η έκφρασή του ρυθμίζεται σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο, επαγόμενη από μικροβιακά προϊόντα, κυτταροκίνες και φλεγμονώδη σήματα (Ihim SA, Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment., 2022).

Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο *IL18* επηρεάζουν την έκφραση και λειτουργία της. Ο *IL18* rs1834481, εντοπιζόμενος στην περιοχή του υποκινητή, ρυθμίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα και τα επίπεδα παραγωγής της *IL-18*, επηρεάζοντας την ανοσιακή απόκριση (Ihim SA, Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment., 2022).

Αυτές οι γενετικές παραλλαγές επηρεάζουν την ευαισθησία σε λοιμώξεις, φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες νόσους. Υψηλότερη παραγωγή *IL-18* σχετίζεται με ενισχυμένη ανοσολογική απόκριση, αλλά και αυξημένο κίνδυνο για φλεγμονώδεις νόσους όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα και νόσος του Crohn. Αντίθετα, χαμηλότερη έκφραση *IL-18* μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία σε λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων των ιογενών ασθενειών όπως ο WNV και ο SARS-CoV-2, όπου απαιτείται ισχυρή ανοσολογική απόκριση (Yasuda K, 2019).

Μονοπάτια σηματοδότησης IL-18 και γενετική ρύθμιση

Η σηματοδότηση της *IL-18* περιλαμβάνει το σύμπλοκο υποδοχέα *IL-18R α /IL-18R β* , το οποίο, μετά τη σύνδεση με την *IL-18*, ενεργοποιεί τα μονοπάτια *NF- κ B* και *MAPK*, οδηγώντας στην παραγωγή *IFN- γ* , *TNF- α* και *IL-6*, κυτταροκινών κρίσιμων για την αντιική άμυνα και τη φλεγμονή.

Γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο *IL18* επηρεάζουν τη σταθερότητα του mRNA και την παραγωγή της IL-18, τροποποιώντας τη σοβαρότητα φλεγμονωδών αποκρίσεων σε σήψη, αυτοάνοσα και ιογενείς λοιμώξεις.

Η δομή της IL-18 βασίζεται στην αναδίπλωση β-τριφυλλιού και η σύνδεσή της με τον υποδοχέα είναι κρίσιμη για την ανοσιακή ενεργοποίηση. Ο πολυμορφισμός rs1834481 μεταβάλλει τη σηματοδότηση και την παραγωγή της, επηρεάζοντας την ανοσολογική απόκριση. Η κατανόηση αυτών των μηχανισμών συμβάλλει στην ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών για παθήσεις που συνδέονται με υπερβολική φλεγμονή ή μειωμένη ανοσιακή απόκριση.

Ρόλος της στην ανοσολογική απόκριση

Η IL-18 αποτελεί βασική κυτταροκίνη για τη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης, κυρίως στην έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία. Ως μέλος της οικογένειας κυτταροκινών IL-1, ενισχύει την παραγωγή ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) από τα κύτταρα φυσικών φονέων (NK) και τα Τ-βοηθητικά κύτταρα 1 (Th1). Με αυτόν τον τρόπο, συμβάλλει στην άμυνα του οργανισμού έναντι παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των ιών. Η ικανότητα της IL-18 να αυξάνει τα επίπεδα IFN- γ είναι κρίσιμη, καθώς η IFN- γ ενεργοποιεί μακροφάγα, βελτιώνει την παρουσίαση αντιγόνων και διευκολύνει την καταστροφή ενδοκυτταρικών παθογόνων.

Η IL-18 αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς της (IL-18R α , IL-18R β) στην επιφάνεια ανοσοκυττάρων, ενεργοποιώντας τα μονοπάτια NF- κ B και MAPK. Αυτή η διαδικασία προάγει την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και ενισχύει τις κυτταροτοξικές λειτουργίες των NK κυττάρων και των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (CTL). Έτσι, τα μολυσμένα κύτταρα στοχεύονται αποτελεσματικότερα.

Πέρα από την ενίσχυση των Th1 αποκρίσεων, η IL-18 γεφυρώνει την έμφυτη με την μη ειδική ανοσία, βοηθώντας στην προσέλκυση και ενεργοποίηση δενδριτικών κυττάρων (DC) και ουδετερόφιλων. Με αυτόν τον τρόπο, συμβάλλει στην ανάπτυξη πιο ολοκληρωμένων προσαρμοστικών ανοσολογικών αντιδράσεων έναντι διαφόρων παθογόνων.

Συμμετοχή της IL-18 στην ανοσιακή απάντηση έναντι των ιογενών λοιμώξεων

Η IL-18 είναι θεμελιώδης για την αντιική ανοσία, καθώς παράγεται ταχέως από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα σε ιογενείς λοιμώξεις, προάγοντας την έκκριση IFN- γ και ενεργοποιώντας κύτταρα NK και κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CTL). Η συνεργασία της με την IL-12 αυξάνει περαιτέρω την παραγωγή IFN- γ , ενισχύοντας τον έλεγχο του ιικού πολλαπλασιασμού και την εξάλειψη μολυσμένων κυττάρων.

Οι ιογενείς λοιμώξεις αυξάνουν τα επίπεδα της IL-18 μέσω αναγνώρισης μοριακών προτύπων (PAMPs), όπως το δίκλωνο RNA (dsRNA), από υποδοχείς τύπου Toll (TLR3, TLR7). Η ανοσολογική απόκριση που ακολουθεί περιλαμβάνει την έκκριση IFN- γ και την ενεργοποίηση των κυττάρων NK, περιορίζοντας έγκαιρα τον ιό.

Η IL-18 έχει μελετηθεί σε διάφορες ιογενείς λοιμώξεις, αναδεικνύοντας τη σημασία της στην ανίχνευση ιών και στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης.

Γρίπη: Οι υψηλές τιμές της IL-18 στη λοίμωξη από τον ιό της γρίπης συμβάλλουν στην παραγωγή IFN- γ και στον γρήγορο έλεγχο του ιού. Σε πειραματικά μοντέλα, έλλειψη της IL-18 οδηγεί σε καθυστερημένη κάθαρση του ιού. (G., 2018)

Ηπατίτιδα C (HCV): Αυξημένα επίπεδα IL-18 παρατηρούνται σε ασθενείς με HCV, ενισχύοντας την παραγωγή IFN- γ από NK και Τ κύτταρα. Ωστόσο, στη χρόνια λοίμωξη, η δυσρυθμισμένη IL-18 μπορεί να συμβάλει σε ηπατική φλεγμονή και ίνωση. (Yu Y, 2019) (Niu ZL, 2015)

HIV: Στα αρχικά στάδια της HIV λοίμωξης, η IL-18 υποστηρίζει την αντιική ανοσία, ενώ σε χρόνια λοίμωξη τυχόν ανισορροπία των επιπέδων της μπορεί να επιτείνει τη φλεγμονή και την ανοσολογική εξάντληση. (Samarani S, 2016)

SARS-CoV-2: Στα αρχικά στάδια της λοίμωξης COVID-19, η IL-18 ενισχύει την παραγωγή της IFN-γ και ενδυναμώνει την αντιική ανοσία, ενώ σε αντίθεση η αυξημένη παραγωγή της μετά την αναγνώριση του SARS-CoV-2 μπορεί να συμβάλλει στην υπερβολική φλεγμονώδη αντίδραση και σε μετέπειτα βλάβη των πνευμόνων. (Marino L, 2023) (Vecchié A, 2021)

Η IL-18 συμβάλλει καθοριστικά στην αντιική άμυνα, προωθώντας την παραγωγή IFN-γ και την ενεργοποίηση NK κυττάρων και CTL. Ωστόσο, η υπερβολική της έκκριση μπορεί να οδηγήσει σε υπερφλεγμονή και ανοσοπαθολογία, όπως έχει παρατηρηθεί σε λοιμώξεις από τον ιό του Δυτικού Νείλου (WNV). Σε χρόνιες λοιμώξεις (π.χ. ηπατίτιδα B, C, HIV), η παρατεταμένη ενεργοποίηση της IL-18 μπορεί να συμβάλει στη χρόνια φλεγμονή και στην ανοσολογική εξάντληση. Επομένως, η ομαλή ρύθμιση της IL-18 είναι κρίσιμη για την προστασία του οργανισμού από τα ιογενή παθογόνα χωρίς να προκαλείται βλάβη στους ιστούς, καθιστώντας την πιθανό θεραπευτικό στόχο σε οξείες και χρόνιες ιογενείς νόσους.

Γενετικές παραλλαγές της IL-18

Το γονίδιο *IL18*, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11q23.1, κωδικοποιεί την κυτταροκίνη IL-18, η οποία είναι αναπόσπαστο μέρος των ανοσολογικών αποκρίσεων, ιδίως όσον αφορά την προώθηση της παραγωγής της ιντερφερόνης-γάμμα (IFN-γ). Οι παραλλαγές στο γονίδιο *IL18*, συγκεκριμένα στην περιοχή του υποκινητή του, μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα της IL-18 που εκφράζονται κατά τη διάρκεια ανοσολογικών αποκρίσεων, γεγονός που με τη σειρά του επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο ο οργανισμός αντιδρά στις λοιμώξεις, στις φλεγμονές, ακόμη και στις αυτοάνοσες καταστάσεις. (Gao SJ, 2015)

Οι γενετικοί πολυμορφισμοί στην *IL-18* παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, επειδή μπορούν να μεταβάλουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου. Οι πολυμορφισμοί στην περιοχή του υποκινητή της IL-18 μπορεί να ρυθμίζουν την ποσότητα της IL-18 που παράγεται ως απάντηση σε ανοσολογικά ερεθίσματα. Αυτές οι παραλλαγές έχουν συσχετιστεί με διαφορετική ευαισθησία σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των μολυσματικών ασθενειών, των καρκίνων και των αυτοάνοσων διαταραχών. (Al-ardawy, 2024) (Haghshenas MR, 2009)

Πολυμορφισμός *IL18* rs1834481

Ο πολυμορφισμός rs1834481 στο γονίδιο *IL-18* είναι ένας πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (SNP) που βρίσκεται στην αμετάφραστη περιοχή 5' (UTR), ο οποίος θα μπορούσε να επηρεάσει τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου και να μεταβάλει τα επίπεδα έκφρασης της *IL-18*. Δεδομένου ότι η 5' UTR επηρεάζει τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, πολυμορφισμοί όπως ο rs1834481 μπορεί να επηρεάσουν τον τρόπο με τον οποίο συντίθεται η *IL-18* κατά τη διάρκεια των ανοσολογικών αποκρίσεων, μεταβάλλοντας ενδεχομένως την ικανότητα του ξενιστή να ανταποκρίνεται σε ιογενείς λοιμώξεις όπως ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV). (Koch W, 2011)

Πιθανός λειτουργικός αντίκτυπος του rs1834481 στην *IL-18*

Παραγωγή κυτταροκινών: Οι παραλλαγές σε αυτή τη θέση μπορεί είτε να ενισχύσουν είτε να μειώσουν την παραγωγή της *IL-18*. Τα αυξημένα επίπεδα της *IL-18* είναι γενικά ευεργετικά σε ιογενείς λοιμώξεις όπως ο WNV λόγω του ρόλου της κυτταροκίνης στην προώθηση της παραγωγής IFN-γ, στην ενίσχυση της κυτταροτοξικής απόκρισης και στην προσέλκυση άλλων ανοσιακών κυττάρων. Ωστόσο, η υπερπαραγωγή της *IL-18* μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική φλεγμονή, συμβάλλοντας στην ανοσοπαθολογία, η οποία μπορεί να επιδεινώσει την κλινική έκβαση.

Ευαισθησία στη λοίμωξη από τον WNV: Στο πλαίσιο του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV), τα άτομα που φέρουν τον πολυμορφισμό rs1834481 ενδέχεται να εμφανίζουν διαφορές στην αναγνώριση και την εξάλειψη του ιού λόγω των μεταβαλλόμενων επιπέδων *IL-18*. Για παράδειγμα:

Η αυξημένη παραγωγή *IL-18* θα μπορούσε να βελτιώσει την εξάλειψη του ιού μέσω ενισχυμένων αποκρίσεων IFN-γ και ενεργοποίησης των κυττάρων NK, οδηγώντας σε ταχύτερη εξάλειψη του ιού.

Η μειωμένη παραγωγή *IL-18* μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητα της ανοσολογικής απόκρισης, επιτρέποντας στον ιό να επιμείνει ή να προκαλέσει πιο σοβαρά συμπτώματα, ιδίως ελλείψει επαρκούς παραγωγής IFN-γ.

Ισορροπία φλεγμονής: Ενώ η *IL-18* διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο των ιογενών λοιμώξεων, η υπερβολική παραγωγή, που ενδεχομένως πυροδοτείται από ορισμένους πολυμορφισμούς, μπορεί να οδηγήσει σε υπερφλεγμονή. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στο νευρικό σύστημα κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από τον WNV, όπου η αυξημένη φλεγμονή θα μπορούσε να προκαλέσει νευροδιείσδυση και σοβαρές επιπλοκές όπως εγκεφαλίτιδα ή μηνιγγίτιδα.

Κλινική σημασία του rs1834481

Ο πολυμορφισμός rs1834481 εντοπίζεται στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της *IL-18*, πιθανώς επηρεάζοντας τη μεταγραφή και τα επίπεδα της κυτταροκίνης. Αν και δεν έχει μελετηθεί τόσο εκτενώς όσο άλλοι πολυμορφισμοί (π.χ. rs187238, rs1946518), ορισμένες

έρευνες συνδέουν συγκεκριμένους γονότυπους με αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα IL-18. (Gao SJ, 2015) (Yu Y, 2019) (Koch W, 2011)

Σε επιμέρους πληθυσμιακές μελέτες, ο rs1834481 έχει συσχετιστεί με διαφοροποιημένο φλεγμονώδες προφίλ και πιθανή ευαισθησία σε νοσήματα που σχετίζονται με τη δράση της IL-18. Ωστόσο, τα έως τώρα ευρήματα δεν επαρκούν για να καθορίσουν σαφή κλινική σημασία, και απαιτούνται μεγαλύτερες έρευνες για την επιβεβαίωση και εμβάθυνση αυτών των συσχετίσεων.

ΣΚΟΠΟΣ

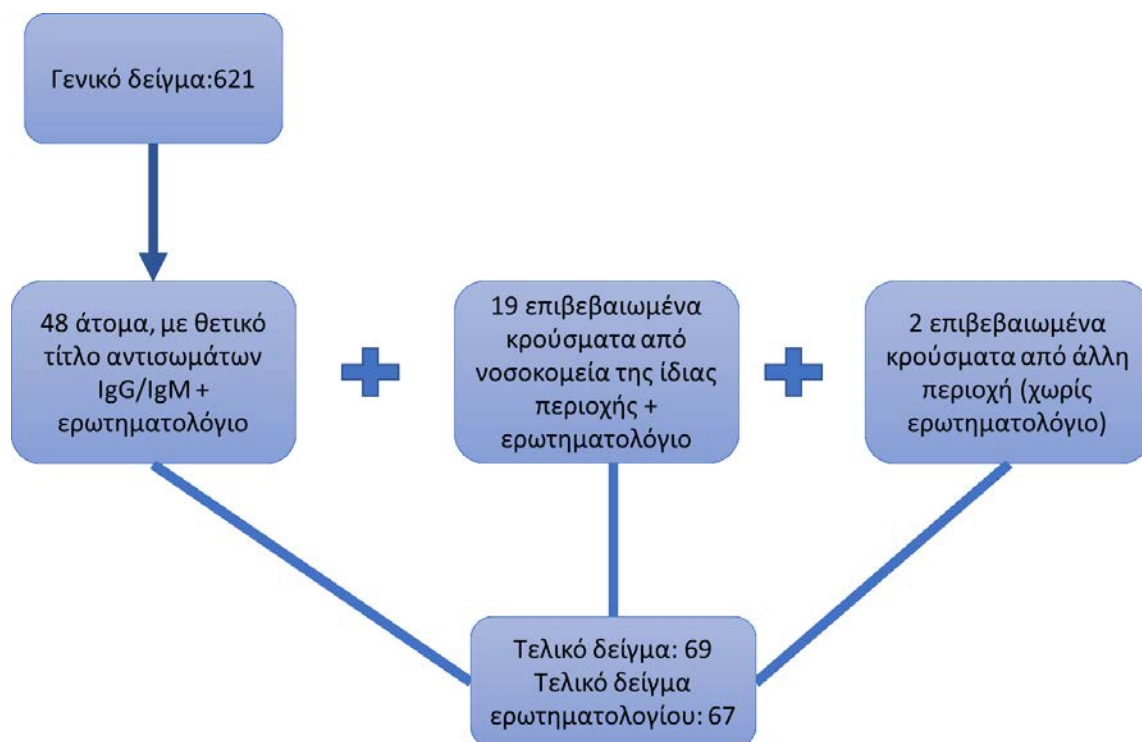
Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να διερευνηθεί η επίδραση των γενετικών πολυμορφισμών *IL18* rs1834481 και *CD14* rs2569190 στην ανοσολογική απόκριση μετά από λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου (WNV) και στη σοβαρότητα και την πρόγνωση της λοίμωξης. Η ανάδειξη συσχέτισης θα μπορούσε να αξιολογηθεί για την καταλληλότητα αυτών των γενετικών πολυμορφισμών ως βιοδείκτες πρόβλεψης της σοβαρότητας της λοίμωξης από τον WNV και της νευροδιεισδυτικής νόσου.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πληθυσμός μελέτης

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από άτομα στα οποία έχουν προσδιοριστεί θετικοί τίτλοι αντισωμάτων έναντι του Ιού του Δυτικού Νείλου με ή χωρίς συμπτωματολογία στο πλαίσιο οροεπιδημιολογικής μελέτης η οποία διενεργείται στο Νομό Ημαθίας. Ο νομός επιλέχθηκε λόγω της ενδημικότητας του ιού στην περιοχή. Συγκεκριμένα, εντάχθηκαν 621 άτομα από διαφορετικές περιοχές του νομού, ο αριθμός των οποίων για κάθε περιοχή προέκυψε αναλογικά με βάση την τελευταία απογραφή. Από τον εργαστηριακό έλεγχο προέκυψαν συνολικά 51 άτομα τα οποία είχαν θετικό τίτλο αντισωμάτων IgG και/ή IgM έναντι του Ιού του Δυτικού Νείλου.



Εικόνα 10 Πληθυσμός μελέτης

Οι συμμετέχοντες μελετήθηκαν ως προς την παρουσία συμπτωμάτων και παρουσίας επιβαρυντικών παραγόντων .

Συμπτώματα:

- Πυρετός
- Διάρροια
- Δύσπνοια
- Φαρυγγαλγία

- Καταρροή
- Επιπεφυκίτιδα
- Μυαλγίες
- Κεφαλαλγία
- Δερματικά εξανθήματα
- Αρθραλγίες
- Καταβολή
- Ναυτία/έμετος
- Κοιλιακό άλγος
- Δυσκαμψία αυχένα
- Αποπροσανατολισμός
- Τρόμος/σπασμούς

Επιβαρυντικοί Παράγοντες:

- Αρτηριακή Υπέρταση
- Υπερλιπιδαιμία
- Καρδιαγγειακό νόσημα
- Σακχαρώδης διαβήτης
- Κακοήθης νόσος
- Νεφρική νόσος
- Ηπατική νόσος
- Άσθμα
- Χρόνια αναπνευστική νόσος
- Χρόνια νευρολογική νόσος
- Παχυσαρκία
- Κύηση-λοχεία
- Κάπνισμα
- Διαταραχές πήκτικότητας
- Μεσογειακή αναιμία ή στίγμα
- Δρεπανοκυτταρική αναιμία ή στίγμα
- Πολυμεταγγιζόμενος
- Ανοσοανεπάρκεια
- Ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (κορτιζόνη, βιολογικοί παράγοντες, κα)

Μεθοδολογία

Δειγματοληψία

Από κάθε συμμετέχοντα ελήφθησαν με φλεβοκέντηση 7-8 ml ολικού αίματος. Πιο συγκεκριμένα :

1. Δείγμα σε φιαλίδιο με επιταχυντή (Clot activator) για ορολογική εξέταση (5 ml) από τα οποία προέκυψαν 3 ml ορού προς εξέταση των δειγμάτων ως προς τον τίτλο αντισωμάτων IgG και IgM.
2. Γενική αίματος K2 EDTA (2ml) για απομόνωση γονιδιωματικού DNA για τη διεξαγωγή των μοριακών αναλύσεων.

Για την μελέτη των πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τη χρήση περιοριστικού ενζύμου (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) η οποία έχει προτυπωθεί στο Εργαστήριο Ανοσολογίας. Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε περιλαμβάνει :

Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Απομόνωση DNA με την μέθοδο μικροστηλών
- Έλεγχος της συγκέντρωσης του DNA με το φθοριόμετρο (Qubit 4, Thermo Fisher Scientific)
- Χρήση πρωτοκόλλου ανίχνευσης και ενίσχυσης με PCR των συγκεκριμένων τμημάτων των γονιδίων όπου παρατηρούνται οι υπό μελέτη πολυμορφισμοί. (Παλιάτσα, 2021) (Αλεξίου, 2021)
- Έλεγχος μέσω ηλεκτροφόρησης αгарόζης για την ύπαρξη του επιθυμητού μεγέθους του προϊόντος της PCR.
- Πέψη με περιοριστικό ένζυμο (HaeIII) και για τα 2 προϊόντα και ηλεκτροφόρηση για να εντοπίσουμε την ύπαρξη του πολυμορφισμού.

Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιήθηκε το ExtractMe Kit (Blirt). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν βασίζονται στην διαδικασία όπως προτείνεται από τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

Σε φιαλίδια eppendorf χωρητικότητας 1,5mL, σημασμένα με τον κωδικό του κάθε δείγματος, τοποθετήθηκαν 200μL περιφερικού αίματος.

Στην συνέχεια, τοποθετήθηκε ίση ποσότητα διαλύματος λύσης (200μL) για την διάλυση των ερυθροκυττάρων και έγινε ήπια ανακίνηση του κάθε φιαλιδίου έτσι ώστε να γίνει ομογενοποίηση του διαλύματος λύσης και του δείγματος.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση των φιαλιδίων σε σχετική φυγόκεντρη δύναμη 8.600 x g για 4 λεπτά.

Μετά την φυγοκέντρηση, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε δεύτερο λυτικό διάλυμα (375μL) όπου και αυτό ομογενοποιήθηκε με ανακίνηση με το ίζημα που προέκυψε από την φυγοκέντρηση.

Προσθήκη 6μL πρωτεϊνάσης K και ανάμιξη με την χρήση vortex.

Στην συνέχεια, τα δείγματα επωάστηκαν στους 55°C για 10 λεπτά.

Προσθήκη 4μL RNAάσης A και δεύτερη επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
Μετά το πέρας των επώασεων, έγινε προσθήκη 400μL GB Buffer και ανάδευση με την χρήση vortex.

Έγινε μεταφορά του υλικού από τα φιαλίδια σε ειδικές μικροστήλες όπου διενεργείται η μικροδιήθηση με σκοπό την έκλυση του γενετικού υλικού.

Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση όλου του υλικού σε σχετική φυγόκεντρη δύναμη 13.000g για 1 λεπτό και ακολούθησαν δύο πλύσεις με 600μL πλυστικού διαλύματος 1 και 500μL πλυστικού διαλύματος 2 αντίστοιχα και φυγοκεντρήσεις σε σχετική φυγόκεντρη δύναμη 13.000g για 1 λεπτό μετά από κάθε πλύση και μία τελική φυγοκέντρηση σε σχετική φυγόκεντρη δύναμη 16.000g για 2 λεπτά.

Τέλος, προστέθηκαν 100μL Elution Buffer στη στήλη, η οποία προηγουμένως είχε τοποθετηθεί σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης χωρητικότητας 1,5mL, όπου μετά από επώαση στον πάγκο για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε φυγοκέντρηση σε σχετική φυγόκεντρη δύναμη 13.000g για 1 λεπτό.

Ποσοτικοποίηση με φθοριόμετρο

Με το πέρας της εκχύλισης του γενετικού υλικού από τα δείγματα περιφερικού αίματος ακολούθησε έλεγχος της συγκέντρωσης (ng/μL) του στο έκλουσμα. Έγινε με τη χρήση φθοριόμετρου για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης DNA. Το Qubit χρησιμοποιεί χρωστικές οι οποίες φθορίζουν μόνο όταν συνδέονται με τον στόχο ενδιαφέροντος, ελαχιστοποιώντας τις επιδράσεις των προσμίξεων -συμπεριλαμβανομένου του αποικοδομημένου DNA ή RNA- στο αποτέλεσμα.

PCR

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών των γονιδίων της *IL18* και *CD14* χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί από το Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Bakaros E, 2023) με σκοπό την ενίσχυση τμήματος των γονιδίων όπου βρίσκεται ο αντίστοιχος υπό μελέτη πολυμορφισμός. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του εργαλείου Primer Blast και του προγράμματος Oligo. Τα ζεύγη εκκινητών, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2 για το γονίδιο της *IL 18* και στον πίνακα 3 για το γονίδιο του *CD14* :

Primer <i>IL-18</i> rs1834481	Sequence	PCR Product
Forward	5' - TTCTGTTGTAGGGGGAGCGT - 3'	522 bp
Reverse	5' - CATCAGGTTGCTTCCAGCCA - 3'	

Πίνακας 2 Εκκινητές γονιδίου *IL18* rs1834481

Στην εικόνα 11 με πράσινο χρώμα σημαίνεται η θέση του πρόσθιου εκκινητή στην αλληλουχία, με μπλε χρώμα η θέση του οπίσθιου εκκινητή στην αλληλουχία και με έντονη κόκκινη γραμματοσειρά, μεγαλύτερο μέγεθος και κίτρινο φόντο, σημαίνεται το σημείο όπου δύναται να παρατηρηθεί ο πολυμορφισμός rs1834481 του γονιδίου *IL18*.

TGAAGTCATGGA **TTCTGTTGTAGGGGGAGCGT** TGCATAGGAAAAAGGGATTGAAGCATTAGAATTGTCCAAAATC
AGTAACACCTCCTCTCAGAAATGCTTTGGGAAGAAGCCTGGAAGGTTCCCGGGTTGGTGGTGGGGTGGGGCAGAA
AATTCTGGAAGTAGAGGAGATAGGAATGGGTGGGGCAAGAAGACCACATTGAGA **GgGc** AAAAGCTGAAAGAAAC
CATGGCATTATGATGAATTGAGGGTAATTGAGAATGGAAGTAGAGTAGGAGTAGGAGACTGGTGAGAGAAGCTA
GAGTGATAAACAGGGTGTAGAGCAAGACGTTCTCTCACCCCAAGATGTGAAATTTGGACTTTATCTTGGAGATAA
TAGGGTTAATTAAGCACAAATATGTATTAGCTAGGGTAAAGATTAGTTTGTGTGAACAAAGACATCCAAAGATACA
GTAGCTGAATAAGATAGAGAAATTTTCTCTCAAAGAAAGTCTAAGTAGGCAGCTCAGAAGTAGTA **TGGCTGGAAG**
CAACCTGATGATATTGGGACCCCCAACTTTCTTCAGTCTTGTACCCATCATCCCTAGTTGTTGATCTCACTCAC
ATAGTTGAAAATCATCATACTTCTGGGTTTCATATCCAGTTATCAAGAAAGGGTCAAGAGAAGTCAGGCTCATT
CCTTTCAAAGACTCTAATTGG

Εικόνα 11 Αλληλουχία του γονιδίου *IL18* μαζί με τους εκκινητές (πράσινο/μπλε) και την θέση του πολυμορφισμού rs1834481 (κίτρινο)

Primer <i>CD-14</i> rs2569190	Sequence	PCR Product
Forward	5' – GCCAACAGATGAGGTTTACACA – 3'	641 bp
Reverse	5' – GTTCGACCCCAAGACCCTAC – 3'	

Πίνακας 3 Εκκινητές γονιδίου *CD14* rs2569190

Στην εικόνα 12 με πράσινο χρώμα σημαίνεται η θέση του πρόσθιου εκκινητή στην αλληλουχία, με μπλε χρώμα η θέση του οπίσθιου εκκινητή στην αλληλουχία και με έντονη κόκκινη γραμματοσειρά, μεγαλύτερο μέγεθος και κίτρινο φόντο, σημαίνεται το σημείο όπου δύναται να παρατηρηθεί ο πολυμορφισμός rs2569190 του γονιδίου *CD14*.

TCTTTAGACCAACTTCCTTTTCTTGAACCTAATTCTACCCCTTGGT **GCCAACAGATGAGGTTTACACA** AAT
CTCTTCCACAAAACATGCAGTTAAATATCTGAGGATATTGAGGGACTTGGATTTGGTGGCAGGAGATCAA
CATAAACCAAGACAAGGAAGAAGTCAAAGAAATGAATCAAGTAGATTCTCTGGGATATAAGGTAGGGGGA
TTGGGGGGTGGATAGTGCAGAGTATGGTACTGGCCTAAGGCACTGAGGATCATCCTTTTCCACACCCA
CCAGAGAAGGCTTAGGCTCCCGAGTCAACAGGGCATTACCCGCTGGGGCGCCTGAGTCATCAGGACACT
GCCAGGAGACACAGAACCCTAGATGCCCTGCAGAATCCTTCTGTTAC **GGTc** CCCCTCCCTGAAACATCC
TTCATTGCAATATTTCCAGGAAAGGAAGGGGGCTGGCTCGGAGGAAGAGAGGTGGGGAGGTGATCAGGGT
TCACAGAGGAGGGAACTGAATGACATCCAGGATTACATAAACTGTGAGAGGCAGCCGAAGAGTTTACAA
GTGTGAAGCCTGGAAGCCGGCGGGTGCCGCTGTGTAGGAAAGAAGCTAAAGCACTTCCAGAGCCTGTCCG
GAGCTCAGAGGTTCCGAAGACTTATCGACCATGGTGAGT **GTAGGGTCTTGGGGTCTGAAC** GCGTGCCACTC

Εικόνα 12 Αλληλουχία του γονιδίου *CD14* μαζί με τους εκκινητές (πράσινο/μπλε) και την θέση του πολυμορφισμού rs2569190 (κίτρινο)

Η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης περιλαμβάνει τη δημιουργία μείγματος συγκεκριμένης σύστασης και όγκου (πίνακας 4, πίνακας 5, πίνακας 6) το οποίο περιλαμβάνει ολιγονουκλεοτίδια, ζεύγος εκκινητών και ενισχυτές αντίδρασης και το οποίο

προστίθεται στο ένζυμο της πολυμεράσης μαζί με το υπό εξέταση γενετικό υλικό για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 30 μL ενώ ο όγκος του γονιδιωματικού DNA σε αυτό είναι 2 μL . Οι συνθήκες για την πραγματοποίηση της αλυσισιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης περιγράφονται στον Πίνακα 7.

Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι η DFS όπου για κάθε αντίδραση προστέθηκαν στα PCR Tubes:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
Master Mix	22 μL
DFS Mix	6 μL
DNA Template	2 μL
Σύνολο	30μL

Πίνακας 4 Αντιδραστήρια προς PCR reaction

Αντίστοιχα παρακάτω παραθέτονται 2 πίνακες με την σύσταση των μειγμάτων των 2 αντιδραστηρίων Master Mix και DFS Mix.

Master Mix		
Αντιδραστήρια	Ποσότητα (1 δείγμα)	Όγκος (89 δείγματα + 10%)
H ₂ O	14,8 μL	1448,92 μL
PCR Buffer 10x	3,05 μL	298,595 μL
dNTPs (2.5 mM)	2,45 μL	239,855 μL
MgCl ₂	0,5 μL	48,95 μL
5' Primer (50 pmol)	0,6 μL	58,74 μL
3' Primer (50 pmol)	0,6 μL	58,74 μL
Σύνολο	22 μL	2153,8 μL

Πίνακας 5 Σύνθεση αντιδραστηρίων του Master mix

DFS Mix	
Αντιδραστήρια	Όγκος (8 δείγματα +10%)
DFS Polymerase	2,2 μL
H ₂ O	50 μL
Σύνολο	52,2 μL

Πίνακας 6 Σύνθεση αντιδραστηρίων του DFS mix

Μετά την σύνθεση των αντιδράσεων προς την υλοποίηση της PCR προγραμματίστηκαν στον θερμοκυκλοποιητή οι ακόλουθες συνθήκες:

Συνθήκες PCR			
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	94°C	2 λεπτά	x 1
Αποδιάταξη	94°C	30 δευτερόλεπτα	x 30
Υβριδισμός εκκινητών	60°C	30 δευτερόλεπτα	
Επέκταση εκκινητών	72°C	30 δευτερόλεπτα	
Τελική επέκταση	72°C	1 λεπτό	x 1
Συντήρηση	4°C	∞	

Πίνακας 7 Πίνακας συνθηκών PCR

Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Με την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου της PCR χρειάζεται να γίνει η επιβεβαίωση της επιτυχούς ανίχνευσης και ενίσχυσης των τμημάτων του γενωμικού DNA με την περιγραφόμενη τεχνική. Αυτό επιτυγχάνεται με τον έλεγχο των προϊόντων της PCR ως προς το μέγεθός τους με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε γέλη αγαρόζης. Η σύσταση της γέλης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1,7% και παρασκευάστηκε προσθέτοντας 2,55 gr αγαρόζης σε 150 mL ρυθμιστικού διαλύματος (TBE). Για την δυνατότητα εμφάνισης των προϊόντων PCR στην γέλη με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας χρειάζεται να προστεθεί εντός της γέλης μία ποσότητα χρωστικής ουσίας. Η ουσία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα περίπτωση είναι της εταιρείας Lonza (GelStar Nucleic Acid Gel Stain). Έγινε ανάμειξη με αναλογία 1/10 του δείγματος και της χρωστικής (1 μL χρωστική και 9 μL δείγμα). Στην συνέχεια κάθε μείγμα δείγματος χρωστικής μεταφέρθηκε στα πηγαδάκια της γέλης και οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης τέθηκαν στα 120V- 400mA για περίπου 45 λεπτά.

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους 100 bp DNA Ladder της εταιρείας InVitrogen. Τέλος, έγινε φωτογράφιση της γέλης υπό υπεριώδες φως (UVITEC) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems) ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή tiff.

Πέψη

Μετά την επιβεβαίωση της ενίσχυσης του υπό μελέτη τμήματος του γονιδίου *CD14* και *IL18* ακολούθησε η πέψη των προϊόντων της PCR με το περιοριστικό ένζυμο *HaeIII* για την ανίχνευση της ύπαρξης του πολυμορφισμού rs2569190 και rs1834481 για τα γονίδια *CD14* και *IL18* αντίστοιχα.

Οι θέσεις στις οποίες τέμνει το ένζυμο φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 13 Θέσεις όπου τέμνει το περιοριστικό ένζυμο *HaeIII*

Για την δημιουργία των μειγμάτων για την διεξαγωγή της διαδικασίας της πέψης με το ένζυμο *HaeIII* ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

Enzyme Mix	
Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
H ₂ O	150 μL
CutSmart Buffer	30 μL
HaeIII	5 μL
Σύνολο	180 μL

Πίνακας 8 Σύνθεση αντιδραστηρίων προς *Enzyme mix*

Τα δείγματα επωάζονται από 4 ώρες έως και 12-16 ώρες (νυχτερινή επώαση) στους 37°C

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης της πέψης είναι:

- 9 μL Enzyme Mix
- 6 μL PCR product

Για την οπτικοποίηση των ζωνών χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης με γέλη αгарόζης 3% η οποία προετοιμάζεται και ελέγχεται όπως αναλύθηκε παραπάνω.

Για τον πολυμορφισμό στο γονίδιο *CD14* όταν:

- δεν υπάρχει ο πολυμορφισμός (CC) τότε το ένζυμο κόβει σε 2 σημεία της αλληλουχίας, επομένως δημιουργούνται 3 κομμάτια του προϊόντος, όπως φαίνεται παρακάτω.

CD14 WT C>T 196+156+289

```
TCTTTAGACCAACTTCCTTTTCTTGAACCTAATTCTACCCCCCTTGGTGCCAACAGATGAGGTTCACAAT
CTCTTCCACAAAACATGCAGTTAAATATCTGAGGATATTCAAGGACTTGGATTTGGTGGCAGGAGATCAA
CATAAACCAAGACAAGGAAGAAGTCAAAGAAATGAATCAAGTAGATTCTCTGGGATATAAGGTAGGGGGA
TTGGGGGGTTGGATAGTGCAGAGTATGGTACTGGCCTAAGGCACTGAGGATCATCCTTTTCCACACCCCA
CCAGAGAAGGCTTAGGCTCCCGAGTCAACAGGGCATTACCGCCTGGGGCGCCTGAGTCATCAGGACACT
GCCAGGAGACACAGAACCCTAGATGCCCTGCAGAATCCTTCCTGTTACGGCCCCCCTCCCTGAAACATCC
TTCATTGCAATATTTCCAGGAAAGGAAGGGGGCTGGCTCGGAGGAAGAGAGGTGGGGAGGTGATCAGGGT
TCACAGAGGAGGGAACTGAATGACATCCAGGATTACATAAACTGTCAGAGGCAGCCGAAGAGTTCACAA
GTGTGAAGCCTGGAAGCCGGCGGGTGCCGCTGTGTAGGAAAGAAGCTAAAGCACTTCCAGAGCCTGTCCG
GAGCTCAGAGGTTTCGGAAGACTTATCGACCATGGTGAGTGTAGGGTCTTGGGGTCGAACGCCTGCCACTC
```

Εικόνα 14 Θέσεις στις οποίες κόβει το ένζυμο *HaeIII* στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *CD14* για την ανεύρεση του πολυμορφισμού rs2569190, όταν δεν υπάρχει ο πολυμορφισμός

- υπάρχει ο πολυμορφισμός (TC/TT) τότε το ένζυμο τέμνει σε 1 σημείο της αλληλουχίας, επομένως δημιουργούνται 2 κομμάτια του προϊόντος.

CD14 HO 196+445

```
TCTTTAGACCAACTTCCTTTTCTTGAACCTAATTCTACCCCCCTTGGTGCCAACAGATGAGGTTCACAAT
CTCTTCCACAAAACATGCAGTTAAATATCTGAGGATATTCAAGGACTTGGATTTGGTGGCAGGAGATCAA
CATAAACCAAGACAAGGAAGAAGTCAAAGAAATGAATCAAGTAGATTCTCTGGGATATAAGGTAGGGGGA
TTGGGGGGTTGGATAGTGCAGAGTATGGTACTGGCCTAAGGCACTGAGGATCATCCTTTTCCACACCCCA
CCAGAGAAGGCTTAGGCTCCCGAGTCAACAGGGCATTACCGCCTGGGGCGCCTGAGTCATCAGGACACT
GCCAGGAGACACAGAACCCTAGATGCCCTGCAGAATCCTTCCTGTTACGGTCCCCCTCCCTGAAACATCC
TTCATTGCAATATTTCCAGGAAAGGAAGGGGGCTGGCTCGGAGGAAGAGAGGTGGGGAGGTGATCAGGGT
TCACAGAGGAGGGAACTGAATGACATCCAGGATTACATAAACTGTCAGAGGCAGCCGAAGAGTTCACAA
GTGTGAAGCCTGGAAGCCGGCGGGTGCCGCTGTGTAGGAAAGAAGCTAAAGCACTTCCAGAGCCTGTCCG
GAGCTCAGAGGTTTCGGAAGACTTATCGACCATGGTGAGTGTAGGGTCTTGGGGTCGAACGCCTGCCACTC
```

Εικόνα 15 Θέσεις στις οποίες κόβει το ένζυμο *HaeIII* στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *CD14* για την ανεύρεση του πολυμορφισμού rs2569190, όταν υπάρχει ο πολυμορφισμός

Έτσι, σε έναν συμμετέχοντα στην μελέτη αγρίου τύπου όπου δεν εντοπίζεται ο πολυμορφισμός θα παρατηρηθούν 3 ζώνες (156 bp, 196 bp, και 289 bp), σ έναν ασθενή ομόζυγο προς τον πολυμορφισμό θα παρατηρηθούν 2 ζώνες (196 bp και 445 bp), ενώ 4 ζώνες (156 bp, 196 bp, 289 bp και 445 bp) θα παρατηρηθούν σε συμμετέχοντες οι οποίοι είναι ετερόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό.

Για τον πολυμορφισμό στο γονίδιο *IL18* όταν:

- δεν υπάρχει ο πολυμορφισμός (CC) τότε το ένζυμο τέμνει σε 1 σημείο της αλληλουχίας, επομένως δημιουργούνται 2 κομμάτια του προϊόντος, όπως φαίνεται παρακάτω.

IL-18 WT C>G) (194+328)

```
TGAAGTCATGGATCTGTTGTAGGGGGAGCGTTGCATAGGAAAAAGGGATTGAAGCATTAGAATTGTCCAAAATC
AGTAACACCTCCTCTCAGAAATGCTTTGGGAAGAAGCCTGGAAGGTTCCCGGGTTGGTGGTGGGGTGGGGCAGAA
AATTCTGGAAGTAGAGGAGATAGGAATGGGTGGGGCAAGAAGACCACATTGGCgAAAAAGCTGAAAGAAAC
CATGGCATTATGATGAATTCAGGGTAATTCAGAATGGAAGTAGAGTAGGAGTAGGAGACTGGTGAGAGAAGCTA
GAGTGATAAACAGGGTGTAGAGCAAGACGTTCTCTCACCCCAAGATGTGAAATTTGGACTTTATCTTGGAGATAA
TAGGGTTAATTAAGCACAATATGTATTAGCTAGGGTAAAGATTAGTTTGTGTGAACAAAGACATCCAAAGATACA
GTAGCTGAATAAGATAGAGAATTTTCTCTCAAAGAAAGTCTAAGTAGGCAGCTCAGAAGTAGTATGGCTGGAAG
CAACCTGATGATATTGGGACCCCCAACTTTCTTCAGTCTTGTACCCATCATCCCCTAGTTGTTGATCTCACTCAC
ATAGTTGAAAAATCATCATACTTCCTGGGTTTCATATCCCAGTTATCAAGAAAGGGTCAAGAGAAGTCAGGCTCATT
CCTTTCAAAGACTCTAATTGG
```

Εικόνα 16 Θέσεις στις οποίες κόβει το ένζυμο *HaeII* στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *IL18* για την ανεύρεση του πολυμορφισμού *rs1834481*, όταν δεν υπάρχει ο πολυμορφισμός

- υπάρχει ο πολυμορφισμός (GC/GG) τότε το ένζυμο δεν τέμνει σε κανένα σημείο της αλληλουχίας, επομένως βλέπουμε το προϊόν της ενίσχυσης αυτούσιο.

IL-18 HO G>C (522)

```
TGAAGTCATGGATCTGTTGTAGGGGGAGCGTTGCATAGGAAAAAGGGATTGAAGCATTAGAATTGTCCAAAATC
AGTAACACCTCCTCTCAGAAATGCTTTGGGAAGAAGCCTGGAAGGTTCCCGGGTTGGTGGTGGGGTGGGGCAGAA
AATTCTGGAAGTAGAGGAGATAGGAATGGGTGGGGCAAGAAGACCACATTGGGgAAAAAGCTGAAAGAAAC
CATGGCATTATGATGAATTCAGGGTAATTCAGAATGGAAGTAGAGTAGGAGTAGGAGACTGGTGAGAGAAGCTA
GAGTGATAAACAGGGTGTAGAGCAAGACGTTCTCTCACCCCAAGATGTGAAATTTGGACTTTATCTTGGAGATAA
TAGGGTTAATTAAGCACAATATGTATTAGCTAGGGTAAAGATTAGTTTGTGTGAACAAAGACATCCAAAGATACA
GTAGCTGAATAAGATAGAGAATTTTCTCTCAAAGAAAGTCTAAGTAGGCAGCTCAGAAGTAGTATGGCTGGAAG
CAACCTGATGATATTGGGACCCCCAACTTTCTTCAGTCTTGTACCCATCATCCCCTAGTTGTTGATCTCACTCAC
ATAGTTGAAAAATCATCATACTTCCTGGGTTTCATATCCCAGTTATCAAGAAAGGGTCAAGAGAAGTCAGGCTCATT
CCTTTCAAAGACTCTAATTGG
```

Εικόνα 17 Θέσεις στις οποίες κόβει το ένζυμο *HaeII* στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *IL18* για την ανεύρεση του πολυμορφισμού *rs1834481*, όταν υπάρχει ο πολυμορφισμός

Έτσι, σε έναν συμμετέχοντα στην μελέτη αγρίου τύπου όπου δεν εντοπίζεται ο πολυμορφισμός θα παρατηρηθούν 2 ζώνες (194 bp, και 328 bp), σ έναν ασθενή ομόζυγο προς τον πολυμορφισμό θα παρατηρηθεί 1 ζώνη (522 bp), ενώ 3 ζώνες (194 bp, 328 bp και 522 bp) θα παρατηρηθούν σε συμμετέχοντες οι οποίοι είναι ετερόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό.

Στατιστική Ανάλυση

Η ανάλυση δεδομένων περιλαμβάνει τη χρήση διαφόρων στατιστικών μεθόδων για την περιγραφή και κατανόηση των χαρακτηριστικών των δεδομένων. Συγκεκριμένα, για τις συνεχείς μεταβλητές η περιγραφική στατιστική (descriptive statistics), περιλαμβάνει μέτρα κεντρικής τάσης, τον μέσο όρο (mean) με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση (standard deviation), όπως επίσης και την διάμεσο (median), μαζί με τα άκρα των τιμών τους, το ελάχιστο (min) και το μέγιστο (max). Αυτά τα μέτρα βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση της κατανομής των δεδομένων. Για κατηγορικά δεδομένα (categorical data), οι συχνότητες (frequencies) και τα ποσοστά (percentages) χρησιμοποιήθηκαν, καθώς αποτελούν κατάλληλα μέτρα για την περιγραφή τη κατανομής των κατηγοριών.

Επιπλέον, έγινε ανάλυση επαγωγικής στατιστικής, όπου πραγματοποιήθηκε έλεγχος υποθέσεων. Ο έλεγχος υποθέσεων εξετάζει δύο υποθέσεις: τη μηδενική υπόθεση (H_0), η οποία υποστηρίζει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μεταβλητών και ότι οι μεταβλητές είναι ανεξάρτητες (Independent variables), και την εναλλακτική υπόθεση (H_1), που δηλώνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Στην παρούσα διπλωματική στόχος είναι να γίνει σύγκριση κατηγορικών μεταβλητών (categorical variables), οπότε και προχωρήσαμε σε έλεγχο (Chi-square), όπου είναι κατάλληλος έλεγχος για κατηγορικά δεδομένα. Σε περιπτώσεις όπου οι αναμενόμενες τιμές ήταν μικρότερες από 5 σε κάποια κατηγορία προχωρήσαμε στον έλεγχο ακριβείας Fisher (Fisher exact Test). Επιπλέον, για να ελέγξουμε αν τα δεδομένα ακολουθούν την κανονική κατανομή (normal distribution), έγιναν έλεγχοι κανονικότητας, τεστ Shapiro-Wilk και ιστογράμματα.

Η απλή λογιστική παλινδρόμηση (simple logistic regression) είναι μια στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εύρεση σχέσης μεταξύ μιας εξαρτημένης διχότομης μεταβλητής (dependent variables), που αποτελεί την έκβαση και μιας ανεξάρτητης μεταβλητής (επιβαρυντικός παράγοντας). Συγκεκριμένα, ως ανεξάρτητη μεταβλητή ορίστηκε η νοσηλεία (hospitalization), η οποία είναι διχότομη μεταβλητή με τιμές Ναι (Yes) ή Όχι (No). Η εξαρτημένη μεταβλητή είναι η νοσηλεία (Yes/No), ενώ η ανεξάρτητη μεταβλητή (independent variable) είναι ο εκάστοτε πολυμορφισμός (polymorphism). Η απλή λογιστική παλινδρόμηση υπολογίζει το πόσο πιο πιθανό είναι ένα άτομο να νοσηλευτεί ή όχι, με βάση την παρουσία ή την απουσία του πολυμορφισμού, και εκτιμά το πόσο ισχυρή είναι η σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού και της νοσηλείας. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης ερμηνεύεται ως τις εκτιμήσεις των συντελεστών της παλινδρόμησης (regression coefficients -odds ratios), μαζί με τα αντίστοιχα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% Confidence intervals) που δείχνουν την επίδραση του πολυμορφισμού στην εμφάνιση νοσηλείας. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με την χρήση του στατιστικού πακέτου R version 4.2. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 0.05 για όλη την διπλωματική εργασία. (_R)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο πληθυσμός της μελέτης στον οποίο πραγματοποιήθηκε ορολογικός έλεγχος ήταν 621 άτομα. Από τον πληθυσμό αυτό, 48 άτομα ανιχνεύθηκαν θετικά σε ορολογικό έλεγχο ανίχνευσης αντισωμάτων IgG ή/και IgM έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου. Επιπλέον, 19 συμμετέχοντες προήλθαν από αρχείο νοσηλίων σε νοσοκομεία της ίδιας γεωγραφικής περιοχής, με τη διάγνωσή τους να επιβεβαιώνεται μέσω ορολογικού ή/και μοριακού ελέγχου από την αντίστοιχη υγειονομική μονάδα. Συνολικά 67 άτομα συμμετείχαν στη μελέτη μέσω συμπλήρωσης ερωτηματολογίου ενώ δύο συμμετέχοντες με επιβεβαιωμένη διάγνωση σε υγειονομικές μονάδες δεν παρείχαν απαντήσεις στο ερωτηματολόγιο.

Από τους 67 συμμετέχοντες, ζητήθηκε η συμπλήρωση ερωτηματολογίου που περιλάμβανε δημογραφικά δεδομένα, κλινική συμπτωματολογία και συννοσηρότητες. Στη συνέχεια, προστέθηκαν δύο επιπλέον συμμετέχοντες από διαφορετική γεωγραφική περιοχή, με επιβεβαιωμένη διάγνωση από υγειονομική μονάδα, για τους οποίους υπήρχαν διαθέσιμα μόνο δημογραφικά δεδομένα, καθώς δεν ολοκληρώθηκε η συμπλήρωση του ερωτηματολογίου. Συνολικά το δείγμα της μελέτης ανέρχεται σε N=69 άτομα. Δημογραφικά δεδομένα είναι διαθέσιμα για όλους τους συμμετέχοντες, ενώ πληροφορίες σχετικά με την κλινική συμπτωματολογία έχουν συλλεχθεί για N=67 εξ αυτών.

Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων (N=69). Οι γυναίκες συμμετέχουσες είναι 37 (53.6%), ενώ οι άνδρες είναι 32 (46.4%). Η μέση ηλικία των συμμετεχόντων είναι 55.2 έτη, με τυπική απόκλιση 16.3, και η διάμεσος είναι τα 55 έτη. Υπάρχει μικρή διαφορά στην μέση τιμή και την διάμεσο όσον αφορά την ηλικία και κατά συνέπεια τα δεδομένα με βάση αυτή την μεταβλητή ακολουθούν κανονική κατανομή. Τέλος, η εθνικότητα των συμμετεχόντων είναι επί το πλείστον ελληνική με εξαίρεση δύο συμμετέχοντες, όπου ο ένας έχει αλβανική και ο άλλος βουλγαρική εθνικότητα. Παρόλα αυτά, όλες οι προαναφερθείσες εθνικότητες ανήκουν στην καυκάσια φυλή και έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά.

Χαρακτηριστικά	Mean(SD)	Median (min-max)
Ηλικία	55.20 (16.30)	55 (11-85)
Χαρακτηριστικά	Συχνότητα	Ποσοστό
Φύλο		
Άρρεν	32	46.40%
Θήλυ	37	53.60%
Εθνικότητα		
Ελληνική	67	96.90%
Βουλγαρική	1	1.60%
Αλβανική	1	1.60%

Πίνακας 9 Δημογραφικά δεδομένα δείγματος

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται η συχνότητα των υποκείμενων νοσημάτων των συμμετεχόντων καθώς και επιβαρυντικοί παράγοντες για την εκδήλωση σοβαρής λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου. Στην συγκεκριμένη μελέτη, καταγράφησαν μέσω ερωτηματολογίου γνωστοί από τη βιβλιογραφία επιβαρυντικοί παράγοντες τόσο για τη λοίμωξη από ιό του Δυτικού Νείλου όσο και για την υγεία γενικότερα. Συγκεκριμένα, στο

δείγμα της μελέτης παρατηρήθηκε ότι ο πιο συχνός επιβαρυντικός παράγοντας είναι το κάπνισμα, με 21 από τους 67 συμμετέχοντες (31.3%) να δηλώνουν καπνιστές. Στην συνέχεια, ο δεύτερος πιο συχνός παράγοντας είναι η αρτηριακή υπέρταση που δηλώθηκε από 20 συμμετέχοντες (29.9%). Σε παρόμοια υψηλά επίπεδα βρέθηκε και ο σακχαρώδης διαβήτης με 18 συμμετέχοντες (26.9%). Η υπερλιπιδαιμία καταγράφηκε σε 10 συμμετέχοντες (14.9%), ενώ παχύσαρκοι δήλωσαν 9 συμμετέχοντες (13.40%). Καρδιαγγειακά νοσήματα δηλώθηκαν από 7 συμμετέχοντες (10.4%), ενώ με άσθμα βρέθηκαν 6 (9.0%). Όλοι οι υπόλοιποι επιβαρυντικοί παράγοντες βρέθηκαν σε μικρότερα ποσοστά.

Επιβαρυντικός Παράγοντας	Συχνότητα (N=67)
Αρτηριακή Υπέρταση	20/67 (29.9%)
Υπερλιπιδαιμία	10/67 (14.9%)
Καρδιαγγειακό νόσημα	7/67 (10.4%)
Σακχαρώδης διαβήτης	18/67 (26.9%)
Κακοήθης νόσος	1/67 (1.5%)
Νεφρική νόσος	0/67 (0%)
Ηπατική νόσος	1/67 (1.5%)
Άσθμα	6/67 (9.0%)
Χρόνια αναπνευστική νόσος	5/67 (7.5%)
Χρόνια νευρολογική νόσος	1/67 (1.5%)
Παχυσαρκία	9/67 (13.4%)
Κάπνισμα	21/67 (31.3%)
Διαταραχές πηκτικότητας	4/67 (6.0%)
Μεσογειακή αναιμία ή στίγμα	1/67 (1.5%)
Δρεπανοκυτταρική αναιμία ή στίγμα	0/67 (0%)
Πολυμεταγγιζόμενος	0/67 (0%)
Ανοσοανεπάρκεια	0/67 (0%)
Ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (κορτιζόνη, βιολογικοί παράγοντες, κα)	1/67 (1.5%)

Πίνακας 10 Συχνότητες επιβαρυντικών παραγόντων στον πληθυσμό μελέτης

Σε ότι αφορά τη συμπτωματολογία τους κατά την διάρκεια της λοίμωξης, το πιο συχνό σύμπτωμα που καταγράφηκε μέσω του ερωτηματολογίου ήταν ο πυρετός σε 18 συμμετέχοντες (26.9%) να δηλώνουν εμπύρετο κατά τη λοίμωξη ενώ το δεύτερο συχνότερο ήταν η καταβολή, που δηλώθηκε από 12 άτομα (17.9%). Επιπλέον, από οκτώ άτομα δηλώθηκαν ως συμπτώματα η μυαλγία, η κεφαλαλγία και ο αποπροσανατολισμός (12.0%). Διάρροια εμφάνισαν έξι άτομα (8.9%). Τα υπόλοιπα συμπτώματα εμφανίστηκαν σε ποσοστά μικρότερα του 7.5% το καθένα, όπως φαίνεται και στον πίνακα 11.

Συμπτωματολογία	Συχνότητα (N=67)
Πυρετός	18/67 (26.9%)
Διάρροια	6/67 (8.9%)
Δύσπνοια	2/67 (3.0%)
Φαρυγγαλγία	0/67 (0.0%)
Καταρροή	0/67 (0.0%)
Επιπεφυκτιδα	0/67 (0.0%)
Μυαλγία	8/67 (11.9%)
Κεφαλαλγία	8/67 (11.9%)
Εξάνθημα	2/67 (3.0%)
Αρθραλγία	3/67 (4.5%)
Καταβολή	12/67 (17.9%)
Ναυτία	5/67 (7.5%)
Κοιλιακό άλγος	2/67 (3.0%)
Δυσκαμψία αυχένα	6/67 (6.0%)
Αποπροσανατολισμός	8/67 (12.0%)
Τρόμος/σπασμούς	3/67 (4.5%)

Πίνακας 11 Συχνότητες συμπτωμάτων στον πληθυσμό μελέτης

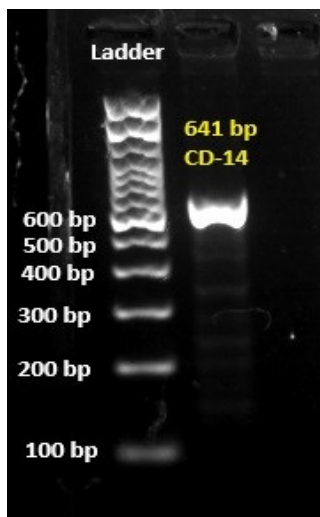
Στον πίνακα 12 καταγράφονται τα αποτελέσματα του ορολογικού ελέγχου των συμμετεχόντων καθώς και ο μοριακός έλεγχος για την παρουσία μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών. Ορολογικό έλεγχο πραγματοποιήθηκε σε 51 συμμετέχοντες από το σύνολο των 69. Θετικός

τίτλος IgG αντισωμάτων βρέθηκε σε 43 δείγματα (84.31%), ενώ θετικός τίτλος σε IgM αντισώματα βρέθηκε σε 13 δείγματα (25.49%). Στο σύνολο των 51 δειγμάτων, θετικός τίτλος σε τουλάχιστον ένα από τα δύο είδη ανιχνεύθηκε σε 45 δείγματα (88.24%), ενώ θετικός τίτλος και στα δύο μόνον σε 6 δείγματα (11.76%). Όσον αφορά τον μοριακό έλεγχο που παρουσιάζεται στον πίνακα 12, ο οποίος πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των δειγμάτων (N=69), για τον πολυμορφισμό *CD14* rs2569190 βρέθηκαν 20 άτομα με γονότυπο άγριου τύπου (Wild Type) (29.0%), 20 συμμετέχοντες χαρακτηρίστηκαν ως ομοζυγώτες (Homozygous) (29.0%), ενώ 29 άτομα ως ετεροζυγώτες (Heterozygous) (42.0%). Αντίστοιχα, για τον πολυμορφισμό *IL18* rs1834481 με γονότυπο άγριου τύπου (Wild Type) χαρακτηρίστηκαν 37 άτομα (53.6%), ομοζυγώτες (Homozygous) 28 (40.6%), και ετεροζυγώτες (Heterozygous) βρέθηκαν 4 (5.8%). Οι παρατηρούμενες γονοτυπικές συχνότητες στον υπό μελέτη πληθυσμό ικανοποιούν τις προϋποθέσεις της ισορροπίας Hardy-Weinberg.

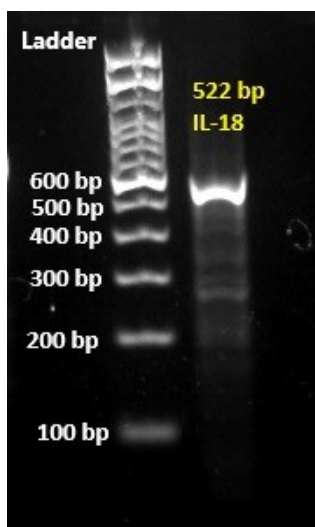
Ορολογικός έλεγχος (N=51)	Συχνότητα
IgG	43/51 (84.31%)
IgM	13/51 (25.49%)
IgG/IgM	
Τουλάχιστον ένα από τα δύο αντισώματα	45/51 (88.24%)
Και τα δύο αντισώματα	6/51 (11.76%)
Μοριακός έλεγχος (N=69)	
<i>CD14</i> rs2569190	
Wild Type	20/69 (29.0%)
Heterozygous	29/69 (42.0%)
Homozygous	20/69 (29.0%)
<i>IL18</i> rs1834481	
Wild Type	37/69 (53.6%)
Heterozygous	28/69 (40.6%)
Homozygous	4/69 (5.8%)

Πίνακας 12 Ορολογικός και μοριακός έλεγχος των δειγμάτων

Από την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ανίχνευση της περιοχής όπου υπάρχουν οι προς μελέτη πολυμορφισμοί προέκυψε προϊόν ενίσχυσης 641 bp για το γονίδιο *CD14* όπου βρίσκεται ο πολυμορφισμός rs2569190 (Εικόνα 18) ενώ το προϊόν ενίσχυσης για το γονίδιο *IL18* όπου βρίσκεται ο πολυμορφισμός rs1834481 είναι 522 bp. (Εικόνα 19)

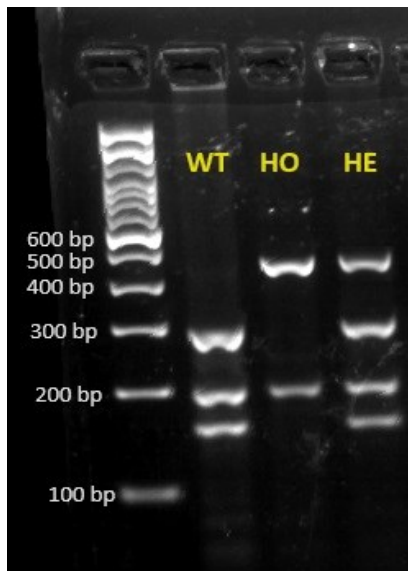


Εικόνα 18 Προϊόν ενίσχυσης μέσω PCR για το γονίδιο *CD14* όπου βρίσκεται ο πολυμορφισμός rs2569190



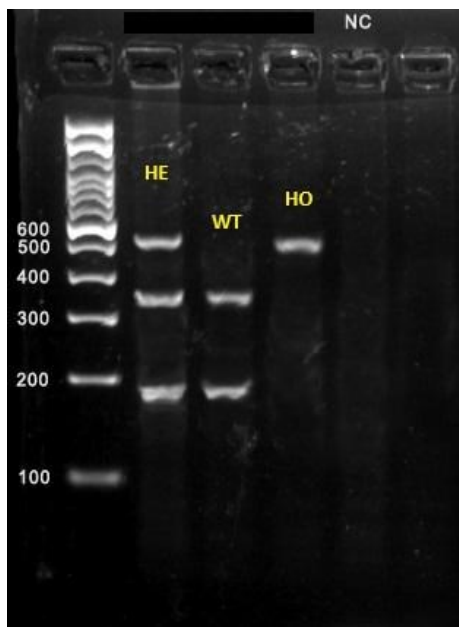
Εικόνα 19 Προϊόν ενίσχυσης μέσω PCR για το γονίδιο *IL18* όπου βρίσκεται ο πολυμορφισμός rs1834481

Στην συνέχεια από τον έλεγχο γονότυπου με τη χρήση περιοριστικού ενζύμου προέκυψε ότι για τον πολυμορφισμό rs2569190 στο γονίδιο *CD14* σε έναν συμμετέχοντα στην μελέτη αγρίου τύπου όπου δεν εντοπίζεται ο πολυμορφισμός θα παρατηρήσουμε 3 ζώνες (156 bp, 196 bp, και 289 bp), σε έναν ασθενή ομόζυγο προς τον πολυμορφισμό θα παρατηρήσουμε 2 ζώνες (196 bp και 445 bp), ενώ 4 ζώνες (156 bp, 196 bp, 289 bp και 445 bp) θα παρατηρηθούν οι συμμετέχοντες οι οποίοι είναι ετερόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό. (Εικόνα 20)



Εικόνα 20 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων μετά από την επώαση τους με ένζυμο *HaeIII*, για τον πολυμορφισμό *CD14 rs2569190*

Αντίστοιχα, μετά τη χρήση περιοριστικού ενζύμου για την ανίχνευση του πολυμορφισμού *rs1834481* στο γονίδιο της *IL18*, σε έναν συμμετέχοντα στην μελέτη αγρίου τύπου όπου δεν εντοπίζεται ο πολυμορφισμός θα παρατηρήσουμε 2 ζώνες (194 bp, και 328 bp), σε έναν ασθενή ομόζυγο προς τον πολυμορφισμό θα παρατηρήσουμε 1 ζώνη (522 bp), ενώ 3 ζώνες (194 bp, 328 bp και 522 bp) θα παρατηρηθούν οι συμμετέχοντες οι οποίοι είναι ετερόζυγοι ως προς τον πολυμορφισμό (Εικόνα 21).



Εικόνα 21 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων μετά από την επώαση τους με *HaeIII*, για τον πολυμορφισμό *IL18 rs1834481*

Επαγωγική στατιστική

Πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος υποθέσεων μεταξύ δύο ομάδων, την ομάδα των συμμετεχόντων που δεν νοσηλεύθηκαν και των συμμετεχόντων που νοσηλεύθηκαν. Ο στατιστικός έλεγχος υποθέσεων που ακολουθήθηκε είναι το χ^2 (chi-squared) test, δοθέντος ότι και η εξαρτημένη μεταβλητή καθώς και η ανεξάρτητη είναι κατηγορικές μεταβλητές.

Η ανάλυση των δεδομένων υποδεικνύει διαφορές μεταξύ νοσηλευόμενων και μη νοσηλευόμενων ασθενών όσον αφορά την παρουσία συγκεκριμένων συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα, η παρουσία πυρετού είναι ένα συχνό σύμπτωμα στους νοσηλευόμενους (N=16) σε σύγκριση με τα άτομα που δεν νοσηλεύτηκαν, όπου μόνο 2 άτομα παρουσίασαν αυτό το σύμπτωμα. Η τιμή p-value υποδεικνύει μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ μη-νοσηλευόμενων και νοσηλευόμενων συμμετεχόντων όσον αφορά την παρουσία πυρετού ο οποίος είναι συχνότερος στους νοσηλευόμενους ασθενείς σε σύγκριση με τους μη νοσηλευόμενους. Επιπλέον, τα αποτελέσματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μη νοσηλευόμενων και νοσηλευόμενων συμμετεχόντων όσον αφορά την παρουσία διάρροιας (p-value=0.002), μυαλγιών (p-value=0.002) και κεφαλαλγίας (p-value=0.002). Συγκεκριμένα, από τους μη νοσηλευόμενους ασθενείς κανένας δεν παρουσίασε συμπτώματα διάρροιας, ενώ μόνο δύο ανέφεραν μυαλγίες ή/και κεφαλαλγία. Στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν επίσης μεταξύ μη νοσηλευόμενων και νοσηλευόμενων όσον αφορά την παρουσία δυσκαμψίας αυχένα και ναυτίας. Συγκεκριμένα, κανένας από τους μη νοσηλευόμενους ασθενείς δεν ανέφερε δυσκαμψία αυχένα ή ναυτία, ενώ 4 άτομα (25.0%) εκ των νοσηλευόμενων παρουσίασαν δυσκαμψία αυχένα και, αντίστοιχα, ναυτία παρουσίασαν 5 άτομα (31.3%) (p = 0.002 για την δυσκαμψία αυχένα και p = 0.002 για τη ναυτία). Τέλος, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την παρουσία αποπροσανατολισμού, καταβολής και του συμπτώματος του τρόμου/σπασμού. Συγκεκριμένα, κανένας από τους ασυμπτωματικούς ασθενείς δεν ανέφερε αποπροσανατολισμό, ενώ 8 συμμετέχοντες (42,1%) εκ των νοσηλευόμενων παρουσίασαν το συγκεκριμένο σύμπτωμα (p < 0.001). Αντίστοιχα, μόνον τρία άτομα εκ των μη νοσηλευόμενων παρουσίασαν καταβολή, ενώ 9 από τους 16 νοσηλευόμενους παρουσίασαν αυτό το σύμπτωμα (p-value <0.001). Τέλος, το σύμπτωμα του τρόμου/σπασμού παρουσιάστηκε μόνον σε τρία άτομα στους νοσηλευόμενους (p-value = 0.012).

Τα συμπτώματα στα οποία δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες συμμετεχόντων συνοψίζονται στα παρακάτω: δύσπνοια (p-value = 0.054), δερματικά εξανθήματα (p-value = 0.423), αρθραλγίες (p-value = 0.139), και κοιλιακό άλγος (p-value = 0.054).

	Ομάδα 1: μη νοσηλευόμενοι (n=51)	Ομάδα 2: νοσηλευόμενοι (n=16)	Σύνολο (n=67)	p-value
ΠΥΡΕΤΟΣ	2/51 (3.9%)	16/16 (100.0%)	18/67 (26.9%)	<0.001
ΔΙΑΡΡΟΙΑ	0/51 (0%)	4/16 (25.0%)	4/67(6.0%)	0.002
ΔΥΣΠΝΟΙΑ	0/51 (0%)	2/16 (12.5%)	2/67 (3.0%)	0.054
ΜΥΑΛΓΙΕΣ	2/51 (3.9%)	6/16 (37.5%)	8/67 (11.9%)	0.002
ΚΕΦΑΛΑΛΓΙΑ	2/51 (3.9%)	6/16 (37.5%)	8/67 (11.9%)	0.002
ΔΕΡΜΑΤΙΚΑ ΕΞΑΝΘΗΜΑΤΑ	1/51 (2.0%)	1/16 (6.3%)	2/67 (3.0%)	0.423
ΑΡΘΡΑΛΓΙΕΣ	1/51 (2.0%)	2/16 (12.5%)	3/67 (4.5%)	0.139
ΚΑΤΑΒΟΛΗ	3/51 (5.9%)	9/16 (56.3%)	12/67 (17.9%)	<0.001
ΝΑΥΤΙΑ	0/51 (0%)	5/16 (31.3%)	5/67 (7.5%)	0.001
ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΑΛΓΟΣ	0/51 (0%)	2/16 (12.5%)	2/67 (3.%)	0.054
ΔΥΣΚΑΜΨΙΑ ΑΥΧΕΝΑ	0/51 (0%)	4/16 (25.0%)	4/67 (6.0%)	0.002
ΑΠΟΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΜΟΣ	0/51 (0%)	8/16 (50.0 %)	8/67 (11.9%)	<0.001
ΤΡΟΜΟΣ/ΣΠΑΣΜΟΥΣ	0/51 (0%)	3/16 (18.8%)	3/67 (4.5%)	0.012

Πίνακας 13 Σύγκριση συμπτωμάτων νοσηλευόμενων με μη νοσηλευόμενους

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται οι επιβαρυντικοί παράγοντες καθώς και πως αυτοί κατανέμονται ανάμεσα στις δύο ομάδες ελέγχου, νοσηλευόμενους και μη. Η αρτηριακή υπέρταση υπάρχει συχνότερα στους νοσηλευόμενους σε σχέση με αυτούς που δεν έχρηζαν νοσηλείας (p-value = 0.013). Συγκεκριμένα, η αρτηριακή υπέρταση εντοπίζεται σε 9 νοσηλευόμενους (56.3% έναντι 15.2% στους μη νοσηλευόμενους). Επιπλέον, στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσιάστηκε για τον σακχαρώδη διαβήτη (p-value = 0.025). Ο σακχαρώδης διαβήτης επίσης συνδέεται με την νοσηλεία, καθώς 8 συμμετέχοντες (50%) εμφανίζουν το συγκεκριμένο νόσημα σε σύγκριση με τους 10 (19.6%) των μη νοσηλευόμενων. Δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε κανέναν άλλον επιβαρυντικό παράγοντα που ελέγχθηκε στην παρούσα διπλωματική ανάμεσα στις δύο ομάδες των νοσηλευόμενων και μη.

Επιβαρυντικοί παράγοντες	Ομάδα 1: μη νοσηλευόμενοι (n=51)	Ομάδα 2: νοσηλευόμενοι (n=16)	Σύνολο (n=67)	P-value
ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ	11/51 (15.2%)	9/16 (56.3%)	20/67(29.9%)	0.013
ΥΠΕΡΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ	6/51 (11.8%)	4/16 (25.0%)	10/67 (14.9%)	0.234
ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΝΟΣΗΜΑ	3/51 (5.9%)	4/16 (25.0%)	7/67 (10.4%)	0.051
ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	10/51 (19.6%)	8/16 (50.0%)	18/67 (26.9%)	0.025
ΚΑΚΟΗΘΗΣ ΝΟΣΟΣ	1/51 (2.0%)	0/16 (0%)	1/67 (1.5%)	1.000
ΗΠΙΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	1/51 (2.0%)	0/16 (0%)	1/67 (1.5%)	1.000
ΑΣΘΜΑ	5/51 (9.8%)	1/16 (6.3%)	6/67 (9.0%)	1.000
ΧΡΟΝΙΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	2/51 (3.9%)	3/16 (18.8%)	5/67 (7.5%)	0.084
ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	1/51 (2.0%)	0/16 (0%)	1/67 (1.5%)	1.000
ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ	6/51 (11.8%)	3/16 (18.8%)	9/67 (13.4%)	0.437
ΚΑΠΝΙΣΜΑ	15/51 (29.4%)	6/16 (37.5%)	21/67 (31.3%)	0.551
ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΠΗΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	2/51 (3.9%)	2/16 (12.5%)	4/67 (6.0%)	0.239
ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ Ή ΣΤΙΓΜΑ	1/51 (2.0%)	0/16 (0%)	1/67 (1.5%)	1.000
ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	1/51 (2.0%)	0/16 (0%)	1/67 (1.5%)	1.000

Πίνακας 14 Σύγκριση ασυμπτωματικών και νοσηλευόμενων σε σχέση με υποκείμενους επιβαρυντικούς παράγοντες (* Μη νοσηλευόμενοι)

Ο πίνακας 15 δείχνει τη συσχέτιση των πολυμορφισμών *CD14* rs2569190 (C-159T) και *IL18* rs1834481 με την εμφάνιση κακής έκβασης της λοίμωξης, νοσηλεία (N=18) και χωρίς νοσηλεία (N=51). Για τον πολυμορφισμό *CD14* rs2569190, οι συχνότητες των γονότυπων ήταν παρόμοιες στις δύο ομάδες, με τους μη νοσηλευόμενους να είναι 15 (29.4%) με τον Wild type (CC), 19 (37.3%) με ετεροζυγωτία (CT) και 17 (33.3%) με ομοζυγωτία (TT), ενώ οι νοσηλευόμενοι είχαν 5 (27.8%) με Wild type (CC), 10 (55.6%) με ετεροζυγωτία (CT) και 3 (16.7%) με ομοζυγωτία (TT). Η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική (p-value = 0.311). Στον πολυμορφισμό *IL18* rs1834481, οι μη νοσηλευόμενοι συμμετέχοντες είναι 30 (58.8%) με Wild type (CC), 17 (33.3%) με ετεροζυγώτες (CG) και 4 (7.8%) με ομοζυγωτία (GG), ενώ οι νοσηλευόμενοι είναι 7 (38.9%) με Wild type (CC), 11 (61.1%) με ετεροζυγωτία (CG) και 0 (0%) με ομοζυγωτία (GG). Η διαφορά στον πολυμορφισμό *IL18* rs1834481 επίσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική (p-value = 0.120). Συνοπτικά, οι γονότυποι των πολυμορφισμών *CD14* rs2569190 και *IL18* rs1834481 δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νοσηλεία.

	Ομάδα 1: μη νοσηλευόμενοι (n=51)	Ομάδα 2: νοσηλευόμενοι (n=18)	P-value
<i>CD14</i> rs2569190 C-159T			
Wild type (CC)	15 (29.4%)	5 (27.8%)	0.311
Heterozygous (CT)	19 (37.3%)	10 (55.6%)	
Homozygous (TT)	17 (33.3%)	3 (16.7%)	
<i>IL18</i> rs1834481			
Wild type (CC)	30 (58.8%)	7 (38.9%)	0.120
Heterozygous (CG)	17 (33.3%)	11 (61.1%)	
Homozygous (GG)	4 (7.8%)	0 (0.0%)	

Πίνακας 15 Συσχέτιση των πολυμορφισμών CD14 rs2569190 (C-159T) και IL18 rs1834481 με την εμφάνιση συμπτωμάτων και την ανάγκη νοσηλείας

Έλεγχος υποθέσεων για τον πολυμορφισμό CD14 rs2569190

Η παρούσα ανάλυση εξετάζει τη συσχέτιση του πολυμορφισμού CD14 rs2569190 (C-159T) σε μη νοσηλευόμενους και νοσηλευόμενους ασθενείς με ή χωρίς αρτηριακή υπέρταση. Στην ομάδα των μη νοσηλευόμενων (N=51), από αρτηριακή υπέρταση έπασχαν 11 άτομα (21.6%), ενώ 40 (78.4%) είχαν ελεύθερο ατομικό ιστορικό. Αντίστοιχα, στην ομάδα των νοσηλευόμενων (N=16), υπέρταση καταγράφηκε σε 9 από τους 16 ασθενείς (56.3%). Συνολικά, από τους 67 συμμετέχοντες, υπέρταση παρατηρήθηκε σε 20 (29.9%), με τη διαφορά μεταξύ των ομάδων να είναι στατιστικά σημαντική (P-value = 0.013), γεγονός που υποδηλώνει πιθανή σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού και της υπέρτασης.

Αναφορικά με τους επιμέρους γονότυπους, στον αγρίου τύπου (Wild type, CC), από υπέρταση έπασχαν 5 ασθενείς (33.3%) στη μη νοσηλευόμενη ομάδα και 4 (80.0%) στη νοσηλευόμενη, ενώ το συνολικό ποσοστό ατόμων με υπέρταση στον συγκεκριμένο γονότυπο ήταν 9 (45.0%), χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική (P-value = 0.127). Στους ετεροζυγώτες (CT), μόνο 1 άτομο (5.3%) από τους μη νοσηλευόμενους είχε υπέρταση, ενώ στους νοσηλευόμενους το ποσοστό ήταν σαφώς υψηλότερο, με 4 άτομα (50.0%), γεγονός που οδήγησε σε στατιστικά σημαντική διαφορά (P-value = 0.017), ενισχύοντας την πιθανότητα συσχέτισης του ετεροζυγωτικού γονότυπου με την υπέρταση. Αντίθετα, στους ομοζυγώτες (TT), η παρουσία υπέρτασης δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων (P-value = 1.000), με 5 άτομα (29.4%) στη μη νοσηλευόμενη ομάδα και 1 (33.3%) στη νοσηλευόμενη να έχουν υπέρταση.

	Αρτηριακή υπέρταση			
CD14 rs2569190 C-159T	Ομάδα 1: μη νοσηλευόμενοι (n=51)	Ομάδα 2: νοσηλευόμενοι (n=16)	Total	P-value
Wild type	5/15 (33.3%)	4/5 (80.0%)	9/20 (45.0%)	0.127
Heterozygous	1/19 (5.3%)	4/8 (50.0%)	5/27 (18.5%)	0.017
Homozygous	5/17 (29.4%)	1/3 (33.3%)	6/20 (30.0%)	1.000
Total	11/51 (21.6%)	9/16 (56.3%)	18/67 (26.9%)	0.013

Πίνακας 16 Συσχέτιση του πολυμορφισμού CD14 rs2569190 C-159T με την ύπαρξη αρτηριακής πίεσης και την ανάγκη νοσηλείας

Ο πίνακας 17 εξετάζει τη συσχέτιση του πολυμορφισμού CD14 rs2569190 (C-159T) με την έκβαση της νόσου (νοσηλεία) σε ασθενείς με ή χωρίς σακχαρώδη διαβήτη. Σε κανέναν γονότυπο δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ νοσηλευόμενων και μη νοσηλευόμενων όσον αφορά την ύπαρξη σακχαρώδη διαβήτη. Η παρουσία ετερόζυγου γονοτύπου (p = 0.65) υποδηλώνει τάση. Τέλος, ανεξάρτητα από τον γονότυπο, ο σακχαρώδης

διαβήτη φαίνεται να εμφανίζεται πιο συχνά στους νοσηλευμένους από ότι στους μη νοσηλευόμενους ($p\text{-value} = 0.025$), όπως φάνηκε και στον πίνακα 14 παραπάνω, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

	Σακχαρώδης Διαβήτης			
CD14 rs2569190 C-159T	Ομάδα 1: μη νοσηλευόμενοι (n=51)	Ομάδα 2: νοσηλευόμενοι (n=16)	Total	P-value
Wild type	5/15 (33.3%)	4/5 (80.0%)	9/20 (45.0%)	0.127
Heterozygous	1/19 (5.3%)	3/8 (37.5%)	4/27 (14.8%)	0.065
Homozygous	4/17 (23.5%)	1/3 (33.3%)	5/20 (25.0%)	1.000
Total	10/51 (19.6%)	8/16 (50.0%)	18/67 (26.9%)	0.025

Πίνακας 17 Συσχέτιση του πολυμορφισμού CD14 rs2569190 C-159T με την ύπαρξη σακχαρώδη διαβήτη και την ανάγκη νοσηλείας

Λογιστική παλινδρόμηση για τον πολυμορφισμό *CD14* rs2569190 C-159T

Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης εξετάζει τη συσχέτιση του πολυμορφισμού *CD14* rs2569190 (C-159T) με τη νοσηλεία των ασθενών, εκτιμώντας την πιθανότητα νοσηλείας μέσω του λόγου πιθανοτήτων (Odds Ratio) και των αντίστοιχων διαστημάτων εμπιστοσύνης 95%.

Ο σταθερός όρος (Intercept) της ανάλυσης έδειξε έναν λόγο πιθανοτήτων 0.333 με διάστημα εμπιστοσύνης [0.121, 0.917] και στατιστικά σημαντική τιμή $p = 0.033$, γεγονός που υποδηλώνει ότι, ανεξάρτητα από τον γονότυπο, η βασική πιθανότητα νοσηλείας διαφοροποιείται σημαντικά.

Όσον αφορά τους γονότυπους του πολυμορφισμού, οι ετεροζυγώτες (CT) σε σύγκριση με τους φορείς του Wild type (CC) εμφάνισαν έναν λόγο πιθανοτήτων 1.579 με διάστημα εμπιστοσύνης [0.444, 5.618] και $p = 0.481$, υποδηλώνοντας ότι η παρουσία του ετεροζυγώτη γονότυπου μπορεί να σχετίζεται με υψηλότερη πιθανότητα νοσηλείας, ωστόσο η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίστοιχα, οι ομοζυγώτες (TT) σε σχέση με τους φορείς του Wild type (CC) εμφάνισαν έναν λόγο πιθανοτήτων 0.529 με διάστημα εμπιστοσύνης [0.108, 2.598] και $p = 0.433$, κάτι που δείχνει ότι η παρουσία του ομοζυγώτη γονότυπου ενδέχεται να σχετίζεται με χαμηλότερη πιθανότητα νοσηλείας, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα.

Predictor	Odds Ratio	95% Confidence Interval	p-value
Intercept	0.333	[0.121, 0.917]	0.033
<i>CD14</i> rs2569190 C-159T:			
Heterozygous – Wild type	1.579	[0.444, 5.618]	0.481
Homozygous – Wild type	0.529	[0.108, 2.598]	0.433
Note. Estimates represent the log odds of "Hospitalization = Group1: Yes" vs. "Hospitalization = Group2: No"			

Πίνακας 18 Λογιστική παλινδρόμηση που διερευνά τη σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού *CD14* rs2569190 C-159T και της νοσηλείας.

Έλεγχος υποθέσεων για τον πολυμορφισμό *IL18* rs1834481

Η ανάλυση εξετάζει τη συσχέτιση του πολυμορφισμού *IL18* rs1834481 με την παρουσία αρτηριακής υπέρτασης σε νοσηλευόμενους και μη νοσηλευόμενους ασθενείς. Στην ομάδα των μη νοσηλευόμενων (N=51), υπέρταση έχουν 11 άτομα (21.6%), ενώ 40 (78.4%) όχι. Αντίστοιχα, στους νοσηλευόμενους (N=16), υπέρταση έχουν 9 ασθενείς (56.3%), ενώ 7 (43.8%) όχι. Συνολικά, από τους 67 συμμετέχοντες, υπέρταση παρουσιάζουν 20 άτομα (29.9%), με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων (p-value = 0.013).

Αναφορικά με τους γονότυπους, στα άτομα με αγρίου τύπου γονότυπο wild type (CC), υπέρταση παρουσιάστηκε σε 6 άτομα (20.0%) στη μη νοσηλευόμενη ομάδα και σε 3 (50.0%) στη νοσηλευόμενη, ενώ συνολικά 9 ασθενείς (25.0%) με αυτόν τον γονότυπο είχαν υπέρταση. Παρότι το ποσοστό υπέρτασης ήταν υψηλότερο στους νοσηλευόμενους, η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική (p-value = 0.151). Στους ετεροζυγώτες (CG), υπέρταση καταγράφηκε σε 4 άτομα (23.5%) από τους μη νοσηλευόμενους και σε 6 (60.0%) από τους νοσηλευόμενους, με το συνολικό ποσοστό υπέρτασης να ανέρχεται στο 37.0%. Η διαφορά μεταξύ των ομάδων είναι μη στατιστικά σημαντική (p-value = 0.101). Στους ομοζυγώτες (GG), υπέρταση έχει μόνο ένας ασθενής (25.0%) από τους μη νοσηλευόμενους, ενώ κανείς από τους νοσηλευόμενους δεν έχει υπέρταση (0.0%). Το συνολικό ποσοστό υπέρτασης στους ομοζυγώτες ήταν 25.0%, με τη διαφορά μεταξύ των ομάδων να μην είναι στατιστικά σημαντική (p-value = 1.000).

	Αρτηριακή υπέρταση			
<i>IL18</i> rs1834481	Ομάδα 1: μη νοσηλευόμενοι (n=51)	Ομάδα 2: νοσηλευόμενοι (n=16)	Total	P-value
Wild type	6/30 (20.0%)	3/6 (50.0%)	9/36 (25.0%)	0.151
Heterozygous	4/17 (23.5%)	6/10 (60.0%)	10/27 (37.0%)	0.101
Homozygous	1/4 (25.0%)	0/0 (0.0%)	1/4 (25.0%)	1.000
Total	11/51 (21.6%)	9/16 (56.3%)	20/67 (29.9%)	0.013

Πίνακας 19 Συσχέτιση του πολυμορφισμού *IL18* rs1834481 με την ύπαρξη αρτηριακής πίεσης και την ανάγκη νοσηλείας

Ο πίνακας 20 εξετάζει τη συσχέτιση του πολυμορφισμού *IL18* rs1834481 με την παρουσία σακχαρώδη διαβήτη στους μη νοσηλευόμενους και νοσηλευόμενους ασθενείς. Σε κανέναν γονότυπο δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ νοσηλευόμενων και των μη νοσηλευόμενων όσον αφορά την ύπαρξη σακχαρώδη διαβήτη. Τέλος, ανεξάρτητα από τον γονότυπο, ο σακχαρώδης διαβήτης φαίνεται να εμφανίζεται πιο συχνά στους νοσηλευμένους από ότι στους μη νοσηλευόμενους (p-value = 0.025), όπως φάνηκε και στον πίνακα 13 παραπάνω.

	Σακχαρώδης Διαβήτης			
<i>IL18</i> rs1834481	Ομάδα 1: μη νοσηλευόμενοι (n=51)	Ομάδα 2: νοσηλευόμενοι (n=16)	Total	P-value
Wild type	5/30 (16.7%)	3/6 (50.0%)	9/36 (25.0%)	0.109
Heterozygous	4/17 (23.5%)	5/10 (50.0%)	9/27 (33.3%)	0.219
Homozygous	1/4 (25.0%)	0/0 (0.0%)	1/4 (25.0%)	1.000
Total	10/51 (19.6%)	8/16 (50.0%)	18/67 (26.9%)	0.025

Πίνακας 20 Συσχέτιση του πολυμορφισμού *IL18* rs1834481 με την ύπαρξη σακχαρώδη διαβήτη και την ανάγκη νοσηλείας

Λογιστική παλινδρόμηση για τον πολυμορφισμό *IL18* rs1834481

Η ανάλυση των παραγόντων κινδύνου για νοσηλεία ανέδειξε σημαντικά ευρήματα σχετικά με τον πολυμορφισμό *IL18* rs1834481. Η σταθερά (intercept) παρουσίασε odds ratio 0.233, με διάστημα εμπιστοσύνης 95% [0.102, 0.531] και στατιστικά σημαντικό p-value < 0.0001, υποδηλώνοντας ότι η βασική πιθανότητα νοσηλείας διαφοροποιείται σημαντικά. Αναφορικά με τους γονότυπους, οι ετεροζυγώτες (CG) σε σύγκριση με τον wild type (CC) εμφάνισαν αυξημένο σχετικό κίνδυνο νοσηλείας, με odds ratio 2.773 και διάστημα εμπιστοσύνης 95% [0.906, 8.490], αν και η διαφορά δεν έφτασε τη στατιστική σημαντικότητα (p-value = 0.074), γεγονός που υποδηλώνει μια τάση συσχέτισης που ενδεχομένως να επιβεβαιωθεί σε μεγαλύτερο δείγμα. Αντίθετα, στους ομοζυγώτες (GG) έναντι του wild type (CC), το odds ratio ήταν 0.000, με διάστημα εμπιστοσύνης [0.000, Inf] και p-value 0.994, δείχνοντας ότι δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση με τον κίνδυνο νοσηλείας.

Predictor	Odds Ratio	95% Confidence Interval	p-value
Intercept	0.233	[0.102, 0.531]	<.0001
<i>IL18</i> rs1834481			
Heterozygous – Wild type	2.773	[0.906, 8.490]	0.074
Homozygous – Wild type	0.000	[0.000, Inf]	0.994
Note. Estimates represent the log odds of "Hospitalization = Group1: Yes" vs. "Hospitalization = Group2: No"			

Πίνακας 21 Λογιστική παλινδρόμηση που διερευνά τη σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού *IL18* rs1834481 και της νοσηλείας.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο να διερευνήσει το ρόλο των γενετικών πολυμορφισμών *IL18* rs1834481 και *CD14* rs2569190 στην ανοσολογική απόκριση μετά από λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου (WNV), με ιδιαίτερη έμφαση στον τρόπο με τον οποίο αυτές οι παραλλαγές θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη σοβαρότητα και την πρόγνωση της νόσου. Τα πρωταρχικά ερωτήματα που καθοδήγησαν την έρευνα αυτή ήταν εάν η παρουσία των συγκεκριμένων πολυμορφισμών στα υπεύθυνα γονίδια για την IL-18 και το CD-14 επηρεάζει την ανοσολογική απόκριση έναντι του WNV και δεύτερον εάν μπορούν αυτοί οι γενετικοί πολυμορφισμοί να αποτελέσουν βιοδείκτες πρόβλεψης της σοβαρότητας της λοίμωξης από τον WNV και της νευροδιεισδυτικής νόσου.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τόσο η IL-18 όσο και το CD-14 είναι ζωτικής σημασίας στα μονοπάτια σηματοδότησης του ανοσιακού συστήματος που είναι απαραίτητα για τη διαχείριση ιογενών λοιμώξεων όπως ο WNV. Οι παραλλαγές σε αυτά τα γονίδια μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικές ανοσολογικές αποκρίσεις, με ορισμένα άτομα συνδυαστικά με την παρουσία υποκείμενων νοσημάτων να εμφανίζουν ισχυρότερες φλεγμονώδεις αντιδράσεις που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε σοβαρότερη έκβαση της λοίμωξης, όπως εγκεφαλίτιδα. Για παράδειγμα, ο πολυμορφισμός *IL18* rs1834481 μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή κυτταροκινών, ενώ ο πολυμορφισμός *CD14* rs2569190 μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα του ανοσιακού συστήματος να αναγνωρίζει και να ανταποκρίνεται στα συστατικά του ιού.

Η στατιστική ανάλυση δείχνει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού *CD14* rs2569190 και της νοσηλείας, καθώς η τιμή p -value = 0.482 είναι μεγαλύτερη από το 0.05 πράγμα που σημαίνει ότι οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στη τύχη. Ωστόσο, η τάση υψηλότερου Odds Ratio στους ετεροζυγώτες υποδηλώνει την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού με τη νοσηλεία.

Για τον *CD14* rs2569190, η μελέτη ανέδειξε ότι η παρουσία του ετεροζυγώτη γονότυπου CT σχετίζεται με υψηλότερα ποσοστά συμμετεχόντων που πάσχουν από αρτηριακή υπέρταση, ειδικά στους νοσηλευόμενους ασθενείς, ενώ οι γονότυποι CC και TT δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Η συνολική διαφορά στην εμφάνιση υπέρτασης μεταξύ νοσηλευόμενων και μη νοσηλευόμενων ήταν επίσης σημαντική, υποδηλώνοντας πιθανή σύνδεση του πολυμορφισμού *CD14* rs2569190 με την αρτηριακή υπέρταση. Αν και στο σύνολο τους οι πάσχοντες από σακχαρώδη διαβήτη φαίνεται να εμφανίζονται πιο συχνά στην ομάδα των νοσηλευόμενων (p -value= 0.025) αυτό συμβαίνει ανεξάρτητα από τον γονότυπο.

Για τον *IL18* rs1834481, η μελέτη ανέδειξε πως οι περισσότεροι συμμετέχοντες που άνηκαν στην ομάδα των νοσηλευόμενων έπασχαν από αρτηριακή υπέρταση, ιδιαίτερα μεταξύ των ετεροζυγώτων (CG), αν και η στατιστική σημαντικότητα δεν επιτεύχθηκε. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν την πιθανή εμπλοκή του πολυμορφισμού *IL18* rs1834481 στην παθογένεια της υπέρτασης, αν και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την επιβεβαίωση της συσχέτισης. Το ίδιο ισχύει και για την συσχέτιση του *IL18* rs1834481 με τον σακχαρώδη διαβήτη και την έκβαση της νόσου όπου κανένας γονότυπος δεν φαίνεται να παρουσιάζει κάποια συσχέτιση στατιστικά σημαντική. Παρότι τα δεδομένα υποδεικνύουν μία τάση μεγαλύτερης παρουσίας του ετεροζυγώτη γονότυπου σε νοσηλευόμενους ασθενείς, η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική (p = 0.074). Ωστόσο, τα αποτελέσματα μπορεί να υποδεικνύουν ότι ο πολυμορφισμός *IL18* rs1834481 μπορεί να σχετίζεται με τη νοσηλεία, αλλά απαιτείται μεγαλύτερο δείγμα για να επιβεβαιωθεί η στατιστική σημασία της συσχέτισης.

Περιορισμοί

Πρέπει να ληφθούν υπόψη μερικοί περιορισμοί της μελέτης. Το μέγεθος του δείγματος ήταν σχετικά μικρό, περιορίζοντας τη στατιστική ισχύ και τη δυνατότητα ανίχνευσης ανεπαίσθητων αλλά σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ πολυμορφισμών και αποτελεσμάτων της λοίμωξης. Ένα μεγαλύτερο δείγμα θα επέτρεπε πιο ισχυρά συμπεράσματα.

Επιπλέον, όλα τα δείγματα προέρχονταν από την ίδια γεωγραφική περιοχή, γεγονός που εγείρει ανησυχίες σχετικά με τις περιφερειακές μεροληψίες. Οι συμμετέχοντες ενδέχεται να μοιράζονται παρόμοιους περιβαλλοντικούς παράγοντες ή γενετικό υπόβαθρο, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Η εγγύτητα των συμμετεχόντων μπορεί επίσης να σημαίνει ότι ήταν πιο εξοικειωμένοι μεταξύ τους, επηρεάζοντας την ομοιογένεια των δεδομένων.

Η εκτεταμένη χρονική περίοδος μεταξύ της διάγνωσης μεταξύ διαφορετικών περιπτώσεων αποτελεί έναν άλλο περιορισμό. Αυτή η μεταβλητότητα μπορεί να οδήγησε σε διαφορές στις θεραπευτικές προσεγγίσεις των παρόχων υγειονομικής περίθαλψης ή στην αυτοδιαχείριση των υποκείμενων παθήσεων, επηρεάζοντας τα συνολικά αποτελέσματα των ασθενών.

Πλεονεκτήματα

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της παρούσας μελέτης είναι η πρωτοτυπία της. Εξ όσων γνωρίζουμε, καμία προηγούμενη έρευνα δεν έχει επικεντρωθεί σε αυτούς τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς στο πλαίσιο της λοίμωξης από τον WNV, γεγονός που καθιστά την παρούσα μελέτη μοναδική. Οι νέες γνώσεις που αποκτήθηκαν εδώ συμβάλλουν στην ευρύτερη κατανόηση των γενετικών παραγόντων που ενδέχεται να επηρεάζουν την πρόγνωση του WNV και θέτουν τις βάσεις για μελλοντικές έρευνες.

Μελλοντικές κατευθύνσεις

Είναι απαραίτητο να συγκεντρωθεί ένα μεγαλύτερο και πιο ποικιλόμορφο δείγμα για να επικυρωθούν τα ευρήματα και να υπάρξει μεγαλύτερη γενίκευση. Επιπλέον, η διενέργεια συστηματικής ανασκόπησης των γενετικών πολυμορφισμών και των επιπτώσεών τους στις ιογενείς λοιμώξεις θα μπορούσε να βοηθήσει στην πλαisiώση αυτών των αποτελεσμάτων στο πλαίσιο ευρύτερων ερευνητικών προσπαθειών. Η αντιμετώπιση της μεροληψίας δημοσίευσης είναι επίσης ζωτικής σημασίας- οι μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να επιδιώκουν την ολοκληρωμένη αναφορά, ανεξαρτήτως σημασίας, ώστε να παρέχουν μια ισορροπημένη προοπτική σχετικά με το ρόλο των γενετικών παραγόντων στη μόλυνση από τον WNV.

Συμπέρασμα

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη παρέχει σημαντικές αρχικές ενδείξεις σχετικά με τον πιθανό ρόλο των πολυμορφισμών *IL18* rs1834481 και *CD14* rs2569190 στην ανοσολογική απόκριση στη λοίμωξη από τον WNV. Τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι αυτοί οι γενετικοί δείκτες θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη σοβαρότητα της νόσου, ιδίως όσον αφορά τα νευροδιεισδυτικά αποτελέσματα. Ωστόσο, το μικρό μέγεθος του δείγματος, οι περιφερειακοί περιορισμοί και τα διαφορετικά χρονοδιαγράμματα θεραπείας υπογραμμίζουν την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα.

Η επέκταση του μεγέθους του δείγματος και η διεξαγωγή διαφορετικών γεωγραφικά μελετών θα είναι κρίσιμες για την επιβεβαίωση των τάσεων που παρατηρήθηκαν. Τελικά, η κατανόηση των γενετικών παραγόντων που εμπλέκονται στη μόλυνση από τον WNV θα μπορούσε να οδηγήσει σε βελτιωμένα προγνωστικά εργαλεία, όπως η εύρεση πιθανών βιοδεικτών, και πιο στοχευμένες παρεμβάσεις δημόσιας υγείας για τη διαχείριση μελλοντικών επιδημιών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρακάτω φαίνεται σε μορφή εικόνας το ερωτηματολόγιο το οποίο απαντήθηκε από τους συμμετέχοντες στην μελέτη με σκοπό την συλλογή των δημογραφικών δεδομένων, του προσωπικού ιατρικού ιστορικού αλλά και των πληροφοριών περί νοσηλείας τους.

Κωδικός συμμετέχοντα (για διασύνδεση ερωτηματολογίου με δείγμα):

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ

1. Επώνυμο		2. Όνομα	
3. Τηλέφωνο:		4. e-mail:	
5. Ημερομηνία γέννησης:			
6. Φύλο:	Αρρεν	Θήλυ	7. Εθνικότητα: Ελληνική Άλλο (Προσδιορίστε)
8. Κατοικία / Νομός:		9. Πόλη/χωριό: Θρ. Τ.Κ.	

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ & ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

10α. Έχετε νοσήσει από τον 1ο του Δυτικού Νέιλου; ☐ ΟΧΙ ☐ ΝΑΙ ☐ Δεν γνωρίζω		
10β. Εάν ναι, συμπληρώστε την ημερομηνία διάγνωσης: .../.../...		
10γ. Εάν ναι, που έγινε η διάγνωση και με τι εξέταση:		
10δ. Συμπτώματα:		
☐ Πυρετός	☐ Μυαλγίες	☐ Κοιλιακό άλγος
☐ Δύσπνοια	☐ Κεφαλαλγία	☐ Δυσκαμψία αυχένα
☐ Δύσπνοια	☐ Δερματικά εξανθήματα	☐ Αποπροσανατολισμός
☐ Φαρυγγαλγία	☐ Αρθραλγίες	☐ Τρόμος / σπασμούς
☐ Καταροή	☐ Καταβολή	☐ Άλλο νευρολογικό σύμπτωμα
☐ Εμπρεκτικήδα	☐ Ναυτία/έμετος	☐ Άλλα, ποια:
10ε. Χρειάστηκε να νοσηλευθείτε λόγω των συμπτωμάτων; ☐ ΟΧΙ ☐ ΝΑΙ		
10ε. Αν ΝΑΙ, νοσηλευτήκατε σε: ☐ ΜΕΘ/ΜΑΦ ☐ Θάλαμο		

ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ - ΕΠΙΒΑΡΥΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

11. Ποιους παράγοντες κινδύνου για σοβαρή νόσο έχετε;		
☐ Αρτηριακή Υπέρταση	☐ Ασθμία	☐ Μεσογειακή αναιμία ή στίγμα
☐ Υπερλιπιδαιμία	☐ Χρόνια αναπνευστική νόσος Προσδιορίστε :	☐ Δρεπανοκυτταρική αναιμία ή στίγμα
☐ Καρδιαγγειακό νόσημα	☐ Χρόνια νεφρολογική νόσος Προσδιορίστε :	☐ Πολυμεταγγιζόμενος
☐ Σακχαρώδης διαβήτης	☐ Παχυσαρκία	☐ Ανοσοανεπάρκεια Προσδιορίστε :
☐ Κακοήθης νόσος	☐ Κύηση-λοχεία	☐ Ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (κορτιζόνη, βιολογικοί παράγοντες, κα) Προσδιορίστε :
☐ Νεφρική νόσος	☐ Κάπνισμα	☐ Άλλο Προσδιορίστε :
☐ Ηπατική νόσος	☐ Διαταραχές πήκτικότητας	

Εικόνα 22 Ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1 Κρούσματα πυρετού του Δυτικού Νείλου ανά πληγείσα περιοχή στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο, περίοδος μετάδοσης 2010 (https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-fever-cases-affected-areas-europe-and-mediterranean-2010-transmission)	7
Εικόνα 2 Χάρτης αποτύπωσης ασθενών με λοίμωξη από τον Ιό του Δυτικού Νείλου με εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα, 2010 (https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/etisia_ekthesi_idn_2010_ellada_revised_2013.pdf)	7
Εικόνα 3 Επίπτωση (ανά 100,00 πληθυσμού) ασθενών που έχουν διαγνωσθεί με λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου με εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα ανά Καλλικρατικό Δήμο, Ελλάδα, 2010. ΕΟΔΥ	9
Εικόνα 4 Γεωγραφική κατανομή κρουσμάτων λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου, Ελλάδα, 2022	9
Εικόνα 5 Κύκλος μετάδοσης του Ιού του Δυτικού Νείλου (πηγή : https://www.cdc.gov/west-nile-virus/php/transmission/index.html)	10
Εικόνα 6 Η δομή και το γονιδίωμα του WNV (Mukhopadhyay S., Kim, B.S., Chipman P.R., Rossmann M.G., and Kuhn R.J. (2003). Structure of West Nile virus. Science 302, 248. και Brinton MA. (2002). The Molecular Biology of West Nile Virus:A New Invader of the Western	11
Εικόνα 7 Κλινική εικόνα λοίμωξης από τον Ιό του Δυτικού Νείλου στον άνθρωπο (http://www.malwest.gr/el-gr/)	13
Εικόνα 8 Κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία στη μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου (10.1038/nrmicro2950)	15
Εικόνα 9 Κυτταρική-ενδογενής έμφυτη ανοσολογική απόκριση στη μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου. (10.1038/nrmicro2950)	17
Εικόνα 10 Πληθυσμός μελέτης.....	30
Εικόνα 11 Αλληλουχία του γονιδίου IL18 μαζί με τους εκκινητές (πράσινο/μπλε) και την θέση του πολυμορφισμού rs1834481 (κίτρινο)	34
Εικόνα 12 Αλληλουχία του γονιδίου CD14 μαζί με τους εκκινητές (πράσινο/μπλε) και την θέση του πολυμορφισμού rs2569190 (κίτρινο)	34
Εικόνα 13 Θέσεις όπου τέμνει το περιοριστικό ένζυμο HaeIII	38
Εικόνα 14 Θέσεις στις οποίες κόβει το ένζυμο HaeIII στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου CD14 για την ανεύρεση του πολυμορφισμού rs2569190, όταν δεν υπάρχει ο πολυμορφισμός	39
Εικόνα 15 Θέσεις στις οποίες κόβει το ένζυμο HaeIII στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου CD14 για την ανεύρεση του πολυμορφισμού rs2569190, όταν υπάρχει ο πολυμορφισμός ..	39
Εικόνα 16 Θέσεις στις οποίες κόβει το ένζυμο HaeII στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου IL18 για την ανεύρεση του πολυμορφισμού rs1834481, όταν δεν υπάρχει ο πολυμορφισμός.....	40
Εικόνα 17 Θέσεις στις οποίες κόβει το ένζυμο HaeII στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου IL18 για την ανεύρεση του πολυμορφισμού rs1834481, όταν υπάρχει ο πολυμορφισμός.....	40

Εικόνα 18 Προϊόν ενίσχυσης μέσω PCR για το γονίδιο CD14 όπου βρίσκεται ο πολυμορφισμός rs2569190	46
Εικόνα 19 Προϊόν ενίσχυσης μέσω PCR για το γονίδιο IL18 όπου βρίσκεται ο πολυμορφισμός rs1834481	46
Εικόνα 20 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων μετά από την επώαση τους με HaeIII, για τον πολυμορφισμό CD14 rs2569190	47
Εικόνα 21 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων μετά από την επώαση τους με HaeIII, για τον πολυμορφισμό IL18 rs1834481	47
Εικόνα 22 Ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη.....	61

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1 Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου (ΔΝ), με και χωρίς προσβολή του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), και αριθμός θανάτων σε ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό, Ελλάδα, 2010 – 2023 1)Εγκεφαλίτιδα ή/και μηνιγγίτιδα ή/και οξεία χαλαρή παράλυση. 2)Περιλαμβάνεται ένα περιστατικό που μολύνθηκε το 2018, αλλά διαγνώστηκε το 2019. 3)Περιλαμβάνεται ένας θάνατος νοσηλευόμενου ασθενούς που μολύνθηκε το 2018 και κατέληξε το 2019.	8
Πίνακας 2 Εκκινητές γονιδίου IL18 rs1834481	33
Πίνακας 3 Εκκινητές γονιδίου CD14 rs2569190.....	34
Πίνακας 4 Αντιδραστήρια προς PCR reaction.....	35
Πίνακας 5 Σύνθεση αντιδραστηρίων του Master mix	35
Πίνακας 6 Σύνθεση αντιδραστηρίων του DFS mix	36
Πίνακας 7 Πίνακας συνθηκών PCR	36
Πίνακας 8 Σύνθεση αντιδραστηρίων προς Enzyme mix	38
Πίνακας 9 Δημογραφικά δεδομένα δείγματος.....	42
Πίνακας 10 Συχνότητες επιβαρυντικών παραγόντων στον πληθυσμό μελέτης	43
Πίνακας 11 Συχνότητες συμπτωμάτων στον πληθυσμό μελέτης	44
Πίνακας 12 Ορολογικός και μοριακός έλεγχος των δειγμάτων	45
Πίνακας 13 Σύγκριση συμπτωμάτων νοσηλευόμενων με μη νοσηλευόμενους	49
Πίνακας 14 Σύγκριση ασυμπτωματικών και νοσηλευόμενων σε σχέση με υποκείμενους επιβαρυντικούς παράγοντες (* Μη νοσηλευόμενοι)	50
Πίνακας 15 Συσχέτιση των πολυμορφισμών CD14 rs2569190 (C-159T) και IL18 rs1834481 με την εμφάνιση συμπτωμάτων και την ανάγκη νοσηλείας.....	51
Πίνακας 16 Συσχέτιση του πολυμορφισμού CD14 rs2569190 C-159T με την ύπαρξη αρτηριακής πίεσης και την ανάγκη νοσηλείας	52
Πίνακας 17 Συσχέτιση του πολυμορφισμού CD14 rs2569190 C-159T με την ύπαρξη σακχαρώδη διαβήτη και την ανάγκη νοσηλείας.....	53
Πίνακας 18 Λογιστική παλινδρόμηση που διερευνά τη σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού CD14 rs2569190 C-159T και της νοσηλείας.....	54
Πίνακας 19 Συσχέτιση του πολυμορφισμού IL18 rs1834481 με την ύπαρξη αρτηριακής πίεσης και την ανάγκη νοσηλείας.....	55

Πίνακας 20 Συσχέτιση του πολυμορφισμού IL18 rs1834481 με την ύπαρξη σακχαρώδη διαβήτη και την ανάγκη νοσηλείας.....	56
Πίνακας 21 Λογιστική παλινδρόμηση που διερευνά τη σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού IL18 rs1834481 και της νοσηλείας.	57

Αναφορές

- _R, C. R. (n.d.). A Language and Environment for Statistical Computing_. 4.2. Vienna, Austria: R Foundation.
- Akira, S. U. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*.
- Al-ardawy, Y. A.-S. (2024). Study of the relationship between genetic variants of IL-18 and the occurrence of inflammatory bowel disease. *Egypt J Med Hum Genet*.
- Arroyo-Espliguero R, A. P. (2004). CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? *Heart*. doi:10.1136/hrt.2002.001297
- Auerswald, H., Ruget, A., & Ladreyt, H. (2020). Serological Evidence for Japanese Encephalitis and West Nile Virus Infections in Domestic Birds in Cambodia. *Front Vet Sci.*, 7, 15. From 10.3389/fvets.2020.00015
- Bai, F. e. (2010). A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J. Infect. Dis*.
- Bakaros E, V. I. (2023). Innate Immune Gene Polymorphisms and COVID-19 Prognosis. *Viruses*.
- Bank, S. A. (2014). Associations between functional polymorphisms in the NFκB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics J*.
- Benzarti E, M. K. (2023). Interleukins, Chemokines, and Tumor Necrosis Factor Superfamily Ligands in the Pathogenesis of West Nile Virus Infection. *Viruses*.
- Betsem E, K. Z. (2017). Correlation of West Nile Virus Incidence in Donated Blood with West Nile Neuroinvasive Disease Rates, United States, 2010-2012. *Emerg Infect Dis*.
- Boga, J., Alvarez-Arguelles, M., & Rojo-Alba, S. (2019). Simultaneous detection of Dengue virus, Chikungunya virus, Zika virus, Yellow fever virus and West Nile virus. *J Virol Methods*, 268, 53-55. From 10.1016/j.jviromet.2019.03.014
- Bradshaw MJ, V. A. (2016). Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Neurotherapeutics*.
- Brinton, M. (2024). Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus. *Viruses*.
- Bruns, A. M. (2012). Activation of RIG-I-like receptor signal transduction. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*.
- Campbell GL, M. A. (2002). West Nile virus. *Lancet Infect Dis*.
- CDC. (2024, 5 15). CDC - WEST NILE VIRUS. Retrieved 2024 from West Nile Virus: <https://www.cdc.gov/west-nile-virus/php/transmission/index.html>
- Chancey C, G. A. (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int*. doi:10.1155/2015/376230

- Ciota, A. (2017). West Nile virus and its vectors. *Curr Opin Insect Sci.*, 22, 22-36. From 10.1016/j.cois.2017.05.002.
- Colpitts, T., Conway, M., & Montgomery, R. (2012). West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. *Clin Microbiol Rev.*, 25, 635-648. From 10.1128/CMR.00045-12.
- da Cruz, H. (n.d.). *Arbovirus Encephalitides - StatPearls*. Retrieved September 29, 2024 from NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560866/>
- De Filette M, U. S. (2012). Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet Res.*
- Diamond, M. S. (2003). Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunol.* .
- Diefenbach RJ, M.-S. M. (2008). Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol.*
- Dinarelli Charles, N. D. (2013). Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Frontiers in Immunology.*
- Donadieu E, B. C. (2013). Differential Virulence and Pathogenesis of West Nile Viruses. *Viruses.*
- Drzewnioková, P. B. (2019). The complete genome sequence analysis of West Nile virus strains isolated in Slovakia (central Europe). *Arch Virol.*
- ECDC. (2025). *European Centre for Disease Prevention and Control*. Retrieved 2025 from Historical data by year - West Nile virus seasonal surveillance: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/historical?>
- Eleni Patsoula, A. V. (2016). West Nile Virus Circulation in Mosquitoes in Greece (2010–2013). *BioMed Research International.*
- Fredericksen, B. (2013). The neuroimmune response to West Nile virus. *J. Neurovirol.*
- G., K. (2018). Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol Rev.*
- Gao SJ, Z. L. (2015). Interleukin-18 genetic polymorphisms contribute differentially to the susceptibility to Crohn's disease. *World J Gastroenterol.*
- Genetic susceptibility to congenital Zika syndrome: Current research and future perspectives.* (2021). Elsevier Science. Retrieved September 29, 2024
- Girón-Ortega JA, M.-C. M.-S.-S.-G. (2021). Modifications of CD4 T cells, CD4/CD8 ratio and serum levels of soluble CD14 in HIV-HCV-coinfected patients after sustained HCV response induced by direct-acting antiviral agents: influence of liver cirrhosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*
- Glass, W. G. (2005). Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J Exp Med.*
- Granucci Francesca, Z. I. (2013). Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* doi:10.3389/fcimb.2013.00032
- Haghshenas MR, H. S.-F. (2009). IL-18 serum level and IL-18 promoter gene polymorphism in Iranian patients with gastrointestinal cancers. *J Gastroenterol Hepatol.*

- Hale, G. L. (n.d.). Flaviviruses and the Traveler: Around the World and to Your Stage. A Review of West Nile, Yellow Fever, Dengue, and Zika Viruses for the Practicing Pathologist. *Modern Pathology*, 36(6).
- Hills SL, N. M. (2023). Japanese Encephalitis among Adults: A Review. . *Am J Trop Med Hyg*.
- Honnold SP, M. E.-C. (2015). Eastern equine encephalitis virus in mice I: clinical course and outcome are dependent on route of exposure. *Virology*.
- Ichikawa, T. e. (2002). Involvement of IL-1 β and IL-10 in IFN- α -mediated antiviral gene induction in human hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Ihim SA, A. S. (2022). Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment. *Front Immunol*.
- Ihim SA, A. S. (2022). Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment. *Front Immunol*.
- J., S.-I. (2000). Twelve die of West Nile Virus in Israel. *BMJ*.
- Johnston, L. J. (2000). Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J. Invest. Dermatol.*
- Kamel MA, S. E. (2023). Association of serum CD14 level and functional polymorphism C-159T in the promoter region of CD14 gene with allergic rhinitis. *Clin Exp Med*.
- Karim SU, B. F. (2023). Introduction to West Nile Virus. *Methods Mol Biol*.
- Keller BC, J. C. (2007). Innate immune evasion by hepatitis C virus and West Nile virus. *Cytokine Growth Factor Rev*.
- Keskin O, B. E. (2006). The effect of CD14-c159T genotypes on the cytokine response to endotoxin by peripheral blood mononuclear cells from asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol*.
- Koch M, P. É. (2021). Identifying risks for severity of neurological symptoms in Hungarian West Nile virus patients. *BMC Infect Dis*.
- Koch W, W. H. (2011). Interleukin 18 gene variation and risk of acute myocardial infarction. *Cytokine*.
- Koo QY, K. A. (2009). Conservation and variability of West Nile virus proteins. *PLoS One*.
- Kunhee Na, B.-C. O. (2023). Multifaceted role of CD14 in innate immunity and tissue homeostasis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. doi:10.1016/j.cytogfr.2023.08.008
- Li, X., Li, X., & Deng, C. (2017). Visualization of a neurotropic flavivirus infection in mouse reveals unique viscerotropism controlled by host type I interferon signaling. *Theranostics*, 7(4), 912-925. From 10.7150/thno.16615.
- Lim, P. Y. (2011). . Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo. *J. Virol*.
- Lin J, Y. Y. (2007). Effects of CD14-159 C/T polymorphism on CD14 expression and the balance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in whole blood culture. *Shock*.
- Lindsey NP, S. J. (2012). Medical Risk Factors for Severe West Nile Virus Disease, United States, 2008–2010. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Loo, Y. M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*.
- Mancuso E, C. J. (2022). West Nile and Usutu Virus Introduction via Migratory Birds: A Retrospective Analysis in Italy. *Viruses*.

- Mansur A, L. B. (2015). The CD14 rs2569190 TT Genotype Is Associated with an Improved 30-Day Survival in Patients with Sepsis: A Prospective Observational Cohort Study. *PLoS One*.
- Marino L, C. A. (2023). Interleukin 18 and IL-18 BP response to Sars-CoV-2 virus infection. *Clin Exp Med*.
- Medhat E, S. H.-N. (2015). Serum Soluble CD14 in Egyptian Patients with Chronic Hepatitis C: Its Relationship to Disease Progression and Response to Treatment. *J Interferon Cytokine Res*.
- Mehul S. Suthar, M. G. (n.d.). Evasion and disruption of innate immune signalling by hepatitis C and West Nile viruses. *Cellular Microbiology*. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01311.x
- Michael S. Diamond, E. M. (2009). The host immunologic response to West Nile encephalitis virus. *Front. Biosci*.
- Mori, A., Pomari, E., & Deiana, M. (2021). Molecular techniques for the genomic viral RNA detection of West Nile, Dengue, Zika and Chikungunya arboviruses: a narrative review. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21, 591-612. From 10.1080/14737159.2021.1924059
- Nieto-Fontarigo JJ, S. F.-J.-F.-C.-C.-G.-B. (2018). The CD14 (-159 C/T) SNP is associated with sCD14 levels and allergic asthma, but not with CD14 expression on monocytes. *Sci Rep*.
- Niu ZL, Z. P. (2015). Association of plasma interleukin-18 levels and polymorphisms in interleukin-18 gene with outcomes of hepatitis C virus infections: a meta-analysis. *J Immunoassay Immunochem*.
- Ojurongbe O, F. R. (2017). Genetic Diversity of CD14 Promoter Gene Polymorphism (rs2569190) is Associated With Regulation of Malaria Parasitemia and Susceptibility to Plasmodium falciparum Infection. . *Infectious Diseases: Research and Treatment*.
- Persaud AT, K. J. (2024 MAY). Virion-incorporated CD14 enables HIV-1 to bind LPS and initiate TLR4 signaling in immune cells. *J Virol*.
- Perwitasari, O. C. (2011). Inhibitor of κ B kinase ϵ (IKK ϵ), STAT1, and IFIT2 proteins define novel innate immune effector pathway against West Nile virus infection. *J. Biol. Chem*.
- Pielnaa P, A.-S. M. (2020). Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*. doi:10.1016/j.virol.2020.01.015
- Rani A, E. S. (2024). Understanding the link between neurotropic viruses, BBB permeability, and MS pathogenesis. *J Neurovirol*.
- Rizzo S, I. P.-C. (2020). Selection and characterization of highly specific recombinant antibodies against West Nile Virus E protein. *J Biotechnol*.
- Rossi SL, R. T. (2010). West Nile virus. *Clin Lab Med*.
- Samarani S, A. O. (2016). Imbalanced production of IL-18 and its antagonist in human diseases, and its implications for HIV-1 infection. *Cytokine*.
- Sewgobind S, M. F. (2023). JMM Profile: West Nile virus. *J Med Microbiol*.
- Sharygin D, K. L. (2023). Role of CD14 in human disease. *Immunology*. doi:10.1111/imm.13634.

- Smithburn KC, H. T. (1940). A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine*.
- Song BH, Y. S. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J Neuroimmunol*.
- Song, B.-H. e. (n.d.). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*,, 308.
- Srichawla, B., Manan, M., & Kipkorir, V. (2024). Neuroinvasion of emerging and re-emerging arboviruses: A scoping review. *SAGE Open Medicine*, 12. From 10.1177/20503121241229847
- Steele KE, T. N. (2010). REVIEW PAPER: pathology of animal models of alphavirus encephalitis. *Vet Pathol*.
- Stephanie M. Lim, P. K. (2011). West Nile Virus: Immunity and Pathogenesis. *Viruses*.
- Suen WW, P. N.-O. (2014). Mechanism of West Nile virus neuroinvasion: a critical appraisal. *Viruses*.
- Suthar, M. D. (2013). West Nile virus infection and immunity. *Nat Rev Microbiol*. doi:10.1038/nrmicro2950
- Tenover, B. R. (2007). Multiple functions of the IKK related kinase IKKε in interferon-mediated antiviral immunity. *Science*.
- Valiakos, G. V. (2013). West Nile Virus: Basic Principles, Replication Mechanism, Immune Response and Important Genetic Determinants of Virulence. *InTech*.
- Vecchié A, B. A. (2021). IL-18 and infections: Is there a role for targeted therapies? *J Cell Physiol*.
- Verma, S. e. (2009). West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology*.
- Vidaña B, B. N.-R.-C. (2020). The Role of Birds of Prey in West Nile Virus Epidemiology. *Vaccines (Basel)*.
- Wang, P. e. (2008). Matrix metalloproteinase 9 facilitates West Nile virus entry into the brain. *J. Virol*.
- Wang, T. e. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nature Med*.
- WE., L. (2002). The changing epidemiology of HSV-1 and HSV-2 and implications for serological testing. *Herpes*.
- Wilson, J. R. (2008). West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J. Virol*.
- Wu YQ, C. S. (2018). Association between CD14 rs2569190 C>T polymorphism and ischemic stroke susceptibility: a meta-analysis based on 5,277 subjects. *Neuropsychiatr Dis Treat*.
- Yang, D., Li, X., & Tu, D. (2023). Advances in viral encephalitis: Viral transmission, host immunity, and experimental animal models. *Zool Res.*, 44, 525-542. From 10.24272/j.issn.2095-8137.2023.025.
- Yasuda K, N. K. (2019). Interleukin-18 in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*.

- Yasuda, K., Nakanishi, K., & Tsutsui, H. (2019). Interleukin-18 in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.*
- Yu Y, Q. J. (2019). Relationship of genetic polymorphisms in CTLA-4 and IL-18 with viral hepatitis: evidence from a meta-analysis. *Epidemiol Infect.*
- Yun SI, L. Y. (2014). Japanese encephalitis: the virus and vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* doi:10.4161/hv.26902.
- Zhao L, B. M. (2011). Association of CD14 -260 (-159) C>T and asthma: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med Genet.*
- Zhenghao Wu, Z. Z. (2019). CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews.*
- Zubair AS, M. L. (2024). Virology, ecology, epidemiology, pathology, and treatment of eastern equine encephalitis. *J Neurol Sci.* doi:10.1016/j.jns.2024.122886.
- Αλεξίου, Σ. (2021). Μελέτη του πολυμορφισμού rs2569190 του γονιδίου CD14 σε ασθενείς με COVID-19.
- ΕΟΔΥ. (n.d.). *eody.gov.gr*. Retrieved 2024 from Ετήσιες επιδημιολογικές εκθέσεις: <https://eody.gov.gr/epidimiologika-statistika-dedomena/etisies-epidimiologikes-ektheseis/#heading-11>
- Θεσσαλίας, Ε. Υ. (2013). MALWEST. (Ειδικού προγράμματος ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία, ενίσχυση της επιτήρησης στην ελληνική επικράτεια) From <http://www.malwest.gr/>: <http://www.malwest.gr/el-gr/%CE%B9%CE%BF%CF%83%CE%B4%CF%85%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CF%85%CE%BD%CE%B5%CE%B9%CE%BB%CE%BF%CF%85/%CF%80%CE%BB%CE%B7%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%BF%CF%81%CE%AF%CE%B5%CF%82%CE%B3%CE%B9%CE%B1%CE%B5%CF%80%CE%B1%CE%B3%CE%B3%CE%B5%CE%BB%CE%>
- Θεσσαλίας, Ε. Υ. (2014). MALWEST. From Επιδημιολογικά Δεδομένα: <http://www.malwest.gr/el-gr/%CE%B9%CE%BF%CF%83%CE%B4%CF%85%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CF%85%CE%BD%CE%B5%CE%B9%CE%BB%CE%BF%CF%85/%CF%80%CE%BB%CE%B7%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%BF%CF%81%CE%AF%CE%B5%CF%82%CE%B3%CE%B9%CE%B1%CE%B5%CF%80%CE%B1%CE%B3%CE%B3%CE%B5%CE%BB%CE%>
- ΚΕΕΛΠΝΟ. (Ιούνιος 2015). *Ενημέρωση επαγγελματιών υγείας για την λοίμωξη από τον ιό του Δυτικού Νείλου.*
- Παλιάτσα, Β. (2021). Συσχετίσεις του πολυμορφισμού rs1834481 του γονιδίου της Ιντερλευκίνης 18 με την πρόγνωση ασθενών με SARS-CoV-2 λοίμωξη.