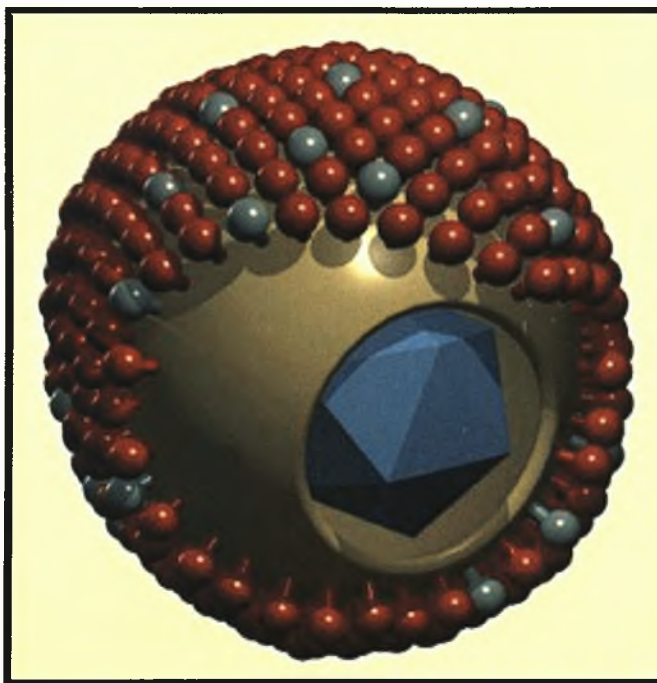


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
Αριθ. Πρωτ. 193  
Ημερομηνία 18-7-20

ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ  
ΙΩΝ ΕΡΣΤΕΙΝ-BARR (EBV) ΚΑΙ ΣΥΤΟΜΕΓΑΛΟVIRUS (CMV) ΣΕ  
ΤΥΧΑΙΟ ΔΕΙΓΜΑ ΑΙΜΟΔΟΤΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΟΝΟΜΑ : ΠΟΥΛΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8176/1  
Ημερ. Εισ.: 16-04-2010  
Δωρεά:  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2010  
ΠΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087105

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ  
ΙΩΝ ΕΡΣΤΕΙΝ-BARR (EBV) ΚΑΙ ΣΥΤΟΜΕΓΑΛΟVΙRUS (CMV) ΣΕ  
ΤΥΧΑΙΟ ΔΕΙΓΜΑ ΑΙΜΟΔΟΤΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

- ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής σχολής  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, Λέκτορας Βιοχημείας Μικροβίων,  
Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
- ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήματος  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας  
ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΚΥΡΙΑΚΟΥ

Δημήτριος Μοσιαλός

Νικόλαος Μπαλατσός

ΟΝΟΜΑ : ΠΟΥΛΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ  
ΛΑΡΙΣΑ 2010

## Ευχαριστίες

Η διπλωματική αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Γενικό Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, στο Αιματολογικό τμήμα υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας καθηγήτριας της Ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Δέσποινας Κυριάκου. Θα ήθελα αρχικώς να ευχαριστήσω θερμά την κ. Κυριάκου για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο συγκεκριμένο εργαστήριο και να πραγματοποιήσω την παρούσα εργασία. Επίσης ευχαριστώ την κ. Ερασμία Ρούκα για την πραγματικά πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη της κατά την παρουσία μου στο εργαστήριο. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεργάτη κ. Χρήστο Παπανικολάου καθώς και τους υπόλοιπους συνεργάτες του εργαστηρίου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
• ΣΚΟΠΟΣ.....	5
• ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
• ABSTRACT.....	5
• ΕΡΗΗΤΟΙΟΙ.....	5
1.α ΙΟΣ ΕΡSTEIN-BARR (EBV).....	6
1.α.1 Μορφολογία του ιού.....	6
1.α.2 Δομή ιϊκού γονιδιώματος.....	6
1.α.3 Μόλυνση με EBV.....	7
1.α.4 Λυτική ενεργοποίηση.....	9
1.α.5 Ανοσολογική απόκριση του κυττάρου ξενιστή έναντι του ιού EBV.....	10
1.α.6 Παθογένεση ειδικών νόσων σχετιζόμενων με τον EBV.....	11
1.β ΙΟΣ CYTOMEGALOVIRUS (CMV).....	13
1.β.1 Δομή του ιού.....	14
1.β.2 Δομή του γονιδιώματος.....	14
1.β.3 Αντιγραφή ιϊκού γονιδιώματος.....	15
1.β.4 Γονιδιακή έκφραση .....	15
1.β.5 Γεωγραφική κατανομή του ιού.....	15
1.β.6 Ανοσολογική απάντηση του κυττάρου ξενιστή έναντι του ιού CMV.....	16
1.β.7 Μόλυνση από CMV και εκδήλωση συμπτωμάτων.....	17
1.β.8 Εκ γενετής μόλυνση με CMV.....	18
1.β.9 Διάγνωση και θεραπεία της μόλυνσης από CMV.....	19
1.γ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Real Time PCR, RT-PCR).....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	29
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	31
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	32

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ :

### ▪ ΣΚΟΠΟΣ:

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μοριακή ανίχνευση των ιών EBV και CMV σε δείγμα αιμοδοτικού πληθυσμού της Θεσσαλίας, με την τεχνική της αλυσιδωτής σε πραγματικό χρόνο αντίδρασης της πολυμεράσης (Real time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).

### ▪ ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Οι ερπητοϊοί (Herpesviridae) αποτελούν μια από τις κυριότερες αιτίες μόλυνσης του ανθρώπινου πληθυσμού. Ειδικότερα, οι ιοί Epstein-Barr και Cytomegalovirus, που μελετώνται στην παρούσα εργασία είναι οι πιο κοινοί ιοί αυτής της οικογένειας και ευθύνονται για μια σειρά ασθενειών που πλήττουν τον άνθρωπο.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, περιλαμβάνει τα εξής βήματα :

- Απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα.
- Χρήση της μεθόδου της αλυσιδωτής σε πραγματικό χρόνο αντίδρασης της πολυμεράσης (RT-PCR), προκειμένου να ενισχυθεί συγκεκριμένη αλληλουχία του ιϊκού γενώματος για καθένα από τους ιούς.

Η καταγραφή των αποτελεσμάτων και η εξαγωγή συμπεράσματος για πιθανή σύνδεση της ανίχνευσης του ιού με την ηλικία των αιμοδοτών και την ηπατική τους βιοχημεία είναι το τελευταίο στάδιο της παρούσας εργασίας.

### ▪ ABSTRACT:

The *Herpesviridae* are a large group of well-characterized double-stranded DNA viruses and one of the common cause of human infection .Especially, Epstein-Barr (EBV) and Cytomegalovirus (CMV), are the most common members of this family and cause plenty of human diseases. The experimental procedure that was followed has the following steps :

- Extraction of DNA from hole blood
- Use of the method of Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), in order to amplify particular sequence of the viral genome, for each virus that is studied

The last step of this study includes the report of the results and the conclusion for potential link between the detection of the virus and the age of the blood donors as well as their hepatic biochemistry.

### ▪ ΕΡΠΗΤΟΙΟΙ :

Οι ερπητοϊοί (Herpesviridae) είναι μια οικογένεια ιών δίκλωνου DNA που προκαλούν μεγάλη ποικιλία ασθενειών σε ανθρώπους και ζώα, συμπεριλαμβανομένων του έρπητα, της ανεμοβλογιάς και της λοιμώδους μονοπυρήνωσης. Χαρακτηριστικό των ιών της οικογένειας αυτής είναι η ικανότητά τους να παραμένουν σε λανθάνουσα μορφή στα κύτταρα του ξενιστή για μεγάλο

χρονικό διάστημα και να δραστηριοποιούνται μόνο σε συνθήκες καταπόνησης. Υπάρχουν 100 γνωστοί ιοί που ανήκουν σε αυτήν την οικογένεια και χωρίζονται σε τρεις υπο-οικογένειες.

### **1.α. ΙΟΣ EPSTEIN-BARR (EBV):**

Ο ιός Epstein-Barr (EBV), ή Human Herpesvirus 4 (HHV-4) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους M.A Epstein, G.B. Achung και Y.M. Barr το 1964. Είναι του γένους των Lymphocryptovirus και ανήκει στην οικογένεια των ερπητοϊών και συγκεκριμένα στην υπο-οικογένεια των γάμα-ερπητοϊών (gammaherpesviridae). Ο EBV αποτελεί έναν από τους πιο διαδεδομένους ιούς και στις ανεπτυγμένες χώρες, το 50% των παιδιών κάτω των 5 ετών και το 95% των ενηλίκων έχουν μολυνθεί από τον συγκεκριμένο ιό. Σχετίζεται με μια σειρά από ασθένειες, όπως η λοιμώδης μονοπυρήνωση και ήταν ο πρώτος ιός που συσχετίστηκε με την εμφάνιση καρκίνου, το λέμφωμα του Burkitt.

#### **1.α.1 Μορφολογία του ιού**

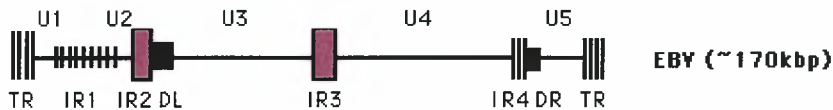
Το ιικό σωματίο του EBV, είναι δομικά σύνθετο και αποτελείται από τέσσερις μορφολογικά διακριτές μονάδες. Συγκεκριμένα, ο EBV αποτελεί έναν επενδεδυμένο ιό, διαμέτρου 100-110 nm και το κέντρο του είναι ένας πυρήνας αποτελούμενος από δίκλωνο DNA. Το νουκλεοκαψίδιο που περιβάλλει αυτόν τον πυρήνα εμφανίζει εικοσαεδρική συμμετρία, και αποτελείται από 162 καψομερή, καθένα από τα οποία απαρτίζεται με τη σειρά του από έναν αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνών. Έξω από το νουκλεοκαψίδιο βρίσκεται ένα άμορφο στρώμα που καλείται υμένιο (tegument) και είναι μια ινώδης δομή, χαρακτηριστική των ερπητοϊών. Το υμένιο περιβάλλει ένας φάκελος (envelope), ο οποίος στην εξωτερική του επιφάνεια περιέχει πολλές μικρές ακίδες (spikes). (Εικόνα 1)



Εικόνα 1 : Το ιικό σωματίο του EBV, με την χαρακτηριστική μορφολογία του φακέλου, στην επιφάνεια του οποίου βρίσκονται γλυκοπρωτεΐνες

### 1.α.2 Δομή του ιϊκού γονιδιώματος

Το γονιδίωμα του EBV, όπως αναφέρθηκε, είναι ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA μεγέθους περίπου 172kb και χαρακτηρίζεται από terminal direct repeats (TRs) και internal direct repeats (IRs), που διαιρούν το γονιδίωμα σε κοντές (US) και μακριές (UL) ειδικές αλληλουχίες. Χαρακτηριστική είναι ακόμη η ύπαρξη μιας περιοχής (DL) στο αριστερό άκρο της UL περιοχής, η οποία εμφανίζει μεγάλη ομολογία με μια περιοχή (DR), η οποία βρίσκεται στο δεξί άκρο της UL περιοχής. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2 : Το γονιδίωμα του EBV με τις χαρακτηριστικές περιοχές του.

Έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον δυο τύποι ιών στον ανθρώπινο πληθυσμό. Οι δύο αυτοί τύποι έχουν ονομαστεί EBV -1 και EBV-2 και παρουσιάζουν εκτεταμένη ομολογία σε όλο το γονιδίωμα τους, ωστόσο οι διαφορές που παρουσιάζουν έχουν σημειωθεί στα γονίδια EBNA-2, EBNA-LP, EBNA-3A,-3B, -3C και στα EBERs.

### 1.α.3 Μόλυνση με EBV

Η μόλυνση με EBV αρχίζει κυρίως στο επιθήλιο του ρινοφάρυγγα και μπορεί να διαρκέσει για πολλά χρόνια. Στην αρχή της μόλυνσης ο ιός μολύνει τα B κύτταρα τα οποία συνωστίζονται σε αυτή την περιοχή, κοντά στην επιθηλιακή μεμβράνη. Ο EBV μπορεί να μολύνει μικρό αριθμό κυτταρικών τύπων και συγκεκριμένα επιθηλιακά κύτταρα (oro- και naso-pharynx) και B λεμφοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνεια τους έναν υποδοχέα, που αποτελεί συστατικό του συμπληρώματος και ονομάζεται CD21 (ή CR2 ή C3d). Στο περίβλημα του ιού υπάρχει η γλυκοπρωτεΐνη gp350/220, η οποία δεσμεύεται στον υποδοχέα CD21. Η μόνη πρωτεΐνη που δεσμεύει την gp350/220, είναι ο υποδοχέας CD21. Έτσι η προσκόλληση του ιού στο μελλοντικό κύτταρο-ξενιστή είναι αποκλειστικά υπόθεση των πρωτεϊνών gp350/220 και CD21.

Η gp350/220 δεν είναι υπεύθυνη μόνο για την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο αλλά και για την εισχώρηση του σε αυτό. Πολλά μόρια της γλυκοπρωτεΐνης, στο εξωτερικό περίβλημα του ιού, συνδέονται με τον CD21, δημιουργώντας έτσι καλύμματα μεταξύ του CD21 και της γλυκοπρωτεΐνης. Η σύνδεση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την μεγέθυνση των B κυττάρων και τη δημιουργία συσσωματωμάτων, αλλά όχι την αύξηση της σύνθεσης κυτταρικού DNA ή RNA.

Η μόλυνση από τον ιό μπορεί να έχει ποικίλες επιδράσεις στα κύτταρα που μολύνει. Με την λυτική μόλυνση (Lytic Infection) προκαλείται καταστροφή του κυττάρου ξενιστή, ενώ σε περίπτωση λανθάνουσας μόλυνσης (Latent Infection), παρατηρείται καθυστέρηση μεταξύ της μόλυνσης και της εμφάνισης των





Μετά την μόλυνση, δύο τινά θα συμβούν: ή θα επικρατήσει λανθάνουσα κατάσταση, ή θα προκληθεί λύση του κυττάρου. Χαρακτηριστικό των ερπητοϊών γενικά και συνεπώς και του EBV, είναι το γεγονός ότι παραμένει στο κύτταρο του ξενιστή μέσω της ικανότητας του να εδραιώνει μια λανθάνουσα κατάσταση και με το κατάλληλο ερέθισμα να επαναενεργοποιείται. Στην λανθάνουσα αυτή κατάσταση ο ιός αυτο-αντιγράφει το γονιδίωμα του, το οποίο υφίσταται ως εξωχρωμοσωμικό κυκλικό μόριο (επίσωμα).

Για τον ιό EBV έχει βρεθεί ότι υπάρχουν τρεις διακριτοί τύποι λανθάνουσας κατάστασης (I, II και III). Όλες οι πρωτεΐνες της λανθάνουσας κατάστασης, δηλαδή οι 6 EBV-specified nuclear antigens (EBNAs 1, 2, 3A, 3B, 3C, and leader protein, EBNA-LP) και οι 3 latent membrane proteins (LMPs 1, 2A and 2B), εκφράζονται στην λανθάνουσα κατάσταση τύπου II. Για την τύπου I λανθάνουσα κατάσταση, χαρακτηριστική είναι η έκφραση του γονιδίου EBNA-1, το οποίο είναι υπεύθυνο για την διατήρηση του πλασμιδιακού υίκου DNA στα κύτταρα του ξενιστή και την ενεργοποίηση του για αντιγραφή. Αυτό συναντάται στο λέμφωμα του Burkitt. Για την τύπου III λανθάνουσα κατάσταση έκτος από την έκφραση του EBNA-1, είναι απαραίτητη και η έκφραση του LMP, χαρακτηριστικό που απαντάται στον καρκίνο του ρινοφάρυγγα και στο θετικό στον EBV λέμφωμα Hodgkin's.

Αν και οι περισσότερες πρωτεΐνες EBNA προσκολλώνται στο DNA και έχουν δεσμευτική ικανότητα, η EBNA-1 διαφέρει καθώς είναι η μοναδική που σχετίζεται με την χρωμοσωμική μίτωση και δεσμεύεται ισχυρά με μια αλληλουχία του DNA. Η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να σχετίζεται με την αρχική αναπαραγωγή του DNA και την διατήρηση του ως επίσωμα σε πρωτογενή κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο EBNA-1. Το γονίδιο EBNA-2 σχετίζεται με την χρωματίνη του κυττάρου και είναι φωσφορυλιωμένο. Τα EBNA-3A, -3B και -3C είναι τρία γονίδια που έχουν κοινή καταγωγή και τα προϊόντα τους εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου σε συσσωματώματα. Το EBNA-LP εντοπίζεται στον πυρήνα και ίσως εμπλέκεται στην διαδικασία αναπαραγωγής του DNA του ιού. Τέλος τα EBERs ίσως παίζουν κάποιο ρόλο στην λειτουργικότητα του RNA διότι σε λανθάνουσα κατάσταση όλα τα mRNAs του ιού είναι σε καταστολή.

Υπάρχουν τρεις κλάσεις αντιγονικών συστημάτων με βάση τον υϊκό κύκλο στον οποίο εκφράζονται. Τα αντιγόνα στην λανθάνουσα φάση είναι οι πρωτεΐνες EBNAs και οι LMPs. Μαζί με τα αντιγόνα μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας και ίσως άλλα κυτταρικά αντιγόνα, ένα ή περισσότερα από τα αντιγόνα του ιού κατά την λανθάνουσα φάση αποτελούν το αντιγόνο μεμβράνης των κυττάρων (LYDMA, lymphocyte detected membrane antigen) το οποίο αναγνωρίζεται από τα T κυτταροτοξικά κύτταρα του ξενιστή. Πρώιμα αντιγόνα (early antigens, EA) συνθέτονται μετά από την μετατροπή της λανθάνουσας φάσης του ιού σε παραγωγική, ενώ στα όψιμα αντιγόνα (late antigens) συμπεριλαμβάνονται συστατικά του καψιδίου του ιού και του ελύτρου.

#### 1.α.4 Λυτική ενεργοποίηση

Στην περίπτωση μόλυνσης των επιθηλιακών κυττάρων μπορεί να υπάρξει λανθάνουσα κατάσταση αλλά το πιο σύνηθες είναι να πραγματοποιηθεί αντιγραφή του υϊκού γονιδιώματος και στη συνέχεια λύση των κυττάρων. Κυρίαρχο ρόλο στην μετάβαση από την λανθάνουσα στην λυτική κατάσταση παίζει η πρωτεΐνη Z, η οποία κωδικοποιείται από το υϊκό γονίδιο BZLF1 και μπορεί να αναφέρεται επίσης και ως

ZEBRA, Zta ή BZLF1 πρωτεΐνη. Το γονίδιο BZLF1 είναι κωδικοποιημένο τουλάχιστον σε τρεις διαφορετικούς τύπους mRNA, δυο από τους οποίους περιέχουν αλληλουχίες ενός ενεργοποιητή R. Ο ενεργοποιητής R που δρα trans επάγει την έκφραση άλλων πρώιμων γονιδίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αντιγραφής του ιϊκού γονιδιώματος καθώς και των ιϊκών αντιγόνων. Άλλη μια βασική πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται από τον ιό είναι η BCRF-1. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ιϊκό ομόλογο της IL-10. Η IL-10 χρησιμεύει για να αυξήσει την ποσότητα των T2-βοηθητικών κυττάρων. Τα T1-βοηθητικά κύτταρα είναι τα πρώτα κύτταρα που αντιδρούν σε μια φλεγμονώδη αντίδραση. Έτσι, με την χρήση της BCRF-1 που καταστέλλει τον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, ο ιός αποφεύγει την απομάκρυνση από το κύτταρο, παρά την αυξημένη παραγωγή ιϊκών αντιγονικών προϊόντων. Τέλος, οι πρωτεϊνικοί υποδοχείς συζευγμένοι με G-πρωτεΐνη (GPCRs) που κωδικοποιούνται από το ιϊκό γονίδιο BILF, έχουν σχετιστεί με την λυτική μόλυνση που οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Τα γονιδιακά προϊόντα του BILF, όχι μόνο είναι λειτουργικά, αλλά ενεργοποιούν και τους μεταγραφικούς παράγοντες CRE και NFκB. Και οι δύο αυτοί παράγοντες εμπλέκονται στην μεταγραφή πρωτεϊνών, οι οποίες με την σειρά τους εμπλέκονται στην μετάδοση του μηνύματος επιβίωσης του ιού, οδηγώντας στον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των μολυσμένων από τον ιό λεμφοκυττάρων.

### **1.α.5 Ανοσολογική απόκριση του κυττάρου ξενιστή έναντι του ιού EBV**

Πιστεύεται ότι η χρόνια αναπαραγωγή του ιού στο επιθήλιο επιτρέπει τη διατήρηση του ιού στο λεμφικό σύστημα με συνεχόμενη επιμόλυνση των λεμφοκυττάρων. Η παρουσία του ιού στα επιθηλιακά κύτταρα προκαλεί έναν έντονο ανοσολογικό ερεθισμό, ο οποίος χαρακτηρίζεται από παραγωγή αντισωμάτων έναντι μιας μεγάλης ποικιλίας ιϊκών προϊόντων, μια κυτταρική ανταπόκριση, καθώς επίσης και από έκκριση κυτταροκινών.

Ο ακριβής ρόλος των αντισωμάτων στον έλεγχο της μόλυνσης δεν είναι γνωστός. Εξουδετερωτικά αντισώματα που εμφανίζονται αμέσως μετά την μόλυνση και παραμένουν για ολόκληρη τη ζωή ίσως δρουν στο να περιορίσουν την εξάπλωση του ιού, αλλά τελικά έχουν λίγη αποτελεσματικότητα στον περιορισμό της αναπαραγωγής του ιού στην ρινοφαρυγγική κοιλότητα. Αντισώματα εμφανίζονται νωρίς και στις ασυμπτωτικές μολύνσεις, αλλά εξαφανίζονται γρήγορα. Αντισώματα έναντι των EBNA εμφανίζονται αργότερα και η κινητική τους διαφέρει όσον αφορά τα προϊόντα των διαφόρων γονιδίων EBNA.

Ένα φυσιολογικό άτομο ελέγχει την αναπαραγωγή του ιού στα λεμφοκύτταρα μέσω μιας ποικιλίας κυτταρικών ανοσολογικών μηχανισμών. Αξιοσημείωτη είναι η δράση δυο ειδών κυτταροτοξικών κυττάρων :των NK (natural killer) και των T-8-κυτταροτοξικών κυττάρων. Επίσης υπάρχουν κυτταρικοί πληθυσμοί που αναχαιτίζουν την ανάπτυξη και σύνθεση ανοσοσφαιρίνης που επάγεται από τον EBV. Η ιντερφερόνη είναι ένα σπουδαίο συστατικό του ανοσολογικού ελέγχου έναντι του ιού. Η ιντερφερόνη-α παράγεται από τα B κύτταρα και τα NK κύτταρα, ενώ η ιντερφερόνη-γ παράγεται από τα T κύτταρα τα οποία ενεργούν κάτω από την επιρροή της IL-1 και IL-2. Ο συνδυασμός της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας δρα στην καταστολή των B κυττάρων και στην αναπαραγωγή του ιού. Η ανοσοκαταστολή μπορεί να συμβάλλει στην απελευθέρωση του ιού από αυτούς τους ελέγχους.

### 1.α.6 Παθογένεση ειδικών νόσων σχετιζόμενων με τον EBV

Ο EBV είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της ανάπτυξης λεμφώματος του Burkitt στην Αφρική, του ρινοφαρυγγικού καρκίνου στην ανατολή και της λοιμώδους μονοπυρήνωσης στην δύση. Μια πρωταρχική μόλυνση από τον EBV μπορεί να είναι α) ασυμπτωματική, ή β) συμπτωματική, με αποτέλεσμα εμφάνιση λοιμώδους μονοπυρήνωσης. Ασυμπτωματική μόλυνση από EBV παρατηρείται κατά κύριο λόγο στις ανεπτυγμένες χώρες, όπου μάλιστα η μόλυνση πραγματοποιείται στα πρώτα χρόνια ζωής. Παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση ή όχι συμπτωμάτων σε μια πρωταρχική μόλυνση είναι τόσο η ηλικία όσο και η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ατόμου.

#### Λοιμώδης μονοπυρήνωση

Όπως αναφέρθηκε, σε ποσοστό 35 με 50%, των αρχικών μολύνσεων με τον ιό σε ενήλικα άτομα, προκαλείται λοιμώδης μονοπυρήνωση. Συμπτώματα της συγκεκριμένης ασθένειας αποτελούν η αδιαθεσία, ο πυρετός που μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από μια βδομάδα, ο βήχας και η εμφάνιση εξανθήματος. Άλλα συμπτώματα μπορεί να είναι η μεγέθυνση του ήπατος και του σπλήνα, η λεμφαδενοπάθεια, η φαρυγγίτιδα και η αμυγδαλίτιδα.

Η ασθένεια σπάνια είναι θανατηφόρα και δεν έχει υπάρξει κάποια συσχέτιση της με προβλήματα του καρδιακού ή του κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς επίσης ούτε με προβλήματα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Παρόλο που τα συμπτώματα της ασθένειας εξασθενούν μετά από περίπου ένα μήνα, ο ιός που βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση εντοπίζεται στον λάρυγγα και στο αίμα ισοβίως, και όταν παροδικά επαναενεργοποιείται εντοπίζεται κυρίως στο σιελόγλονο υγρό. Η επαναενεργοποίηση αυτή είναι συνήθως ασυμπτωματική. Η μετάδοση του ιού μέσω του αέρα ή του αίματος δεν συμβαίνει φυσιολογικά. Η περίοδος επώασης ή ο χρόνος από την στιγμή της μόλυνσης μέχρι την εμφάνιση των συμπτωμάτων, ποικίλλει από 4 έως 6 εβδομάδες. Οι ασθενείς με λοιμώδη μονοπυρήνωση μπορούν να μεταδώσουν την ασθένεια μέσα σε χρονικό διάστημα μερικών εβδομάδων.

Η κλινική διάγνωση της λοιμώδους μονοπυρήνωσης συνήθως βασίζεται στην ανάπτυξη φαρυγγίτιδας (ερεθισμένος λαιμός), στην εμφάνιση λεμφαδενοπάθειας και στην εμφάνιση επίμονου πυρετού, που διαρκεί για περισσότερο από τέσσερις εβδομάδες. Επιπλέον ορολογικοί έλεγχοι για την συγκεκριμένη νόσο εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων, αυξημένο συνολικό αριθμό λεμφοκυττάρων καθώς επίσης ανιχνεύουν την ύπαρξη ετερόφιλων IgM αντισωμάτων. Τα αρχικώς αυξημένα επίπεδα αυτών των ετερόφιλων αντισωμάτων εξασθενούν ύστερα από περίπου 4 εβδομάδες.

Δεν υπάρχει συγκεκριμένη θεραπεία της λοιμώδους μονοπυρήνωσης πέρα από την θεραπεία των συμπτωμάτων της. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως αν τα συμπτώματα της ασθένειας υπερβούν το χρονικό διάστημα των 6 μηνών τότε η ασθένεια αναφέρεται ως χρόνια λοίμωξη του EBV.

#### Post-transplant lymphoma (PTL):

Ασθενείς με ανοσοκαταστολή λόγω μεταμόσχευσης, έχουν μειωμένη λειτουργία του ανοσολογικού τους συστήματος και εμφανίζουν αυξημένη ευπάθεια σε ιικές μολύνσεις, συμπεριλαμβανομένης της μόλυνσης από EBV. Τα άτομα αυτά

εμφανίζουν μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης του 'post-transplant lymphoma' (PTL), ενός όγκου που προκαλείται από την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων Β κυττάρων απουσία οποιουδήποτε ελέγχου από τα Τ κύτταρα. Παρόμοιο τύπο όγκου εμφανίζουν ασθενείς με AIDS σε τελικό στάδιο, των οποίων ο ιός HIV έχει καταστρέψει το ανοσολογικό τους σύστημα.

#### Λέμφωμα Burkitt :

Η σχέση του EBV με το λέμφωμα Burkitt χρονολογείται από την ανακάλυψη του. Το ενδημικό λέμφωμα του Burkitt (BL) είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου σε παιδιά της Αφρικής και της Νέας Γουινέας. Οι ασθενείς εμφανίζουν όγκους που εντοπίζονται στο πρόσωπο και συγκεκριμένα στα σαγόνια, αλλά και στην περιοχή των ματιών.

Όλα τα καρκινικά κύτταρα είναι μονοκλωνικής προέλευσης και εμφανίζουν μια χαρακτηριστική μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 8 και 14. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ο γενετικός τόπος του γονιδίου c-myc να τοποθετηθεί δίπλα στο γενετικό τόπο των ανοσοσφαιρινών. Έτσι το ογκογονίδιο είναι υπό την επίδραση του υποκινητή ενός γονιδίου που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα Β λεμφοκύτταρα, με συνέπεια τον μετασχηματισμό των Β κυττάρων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η μετάθεση δεν παρατηρείται σε ασθενείς με λοιμώδη μονοκυρήνωση.

Η επιδημιολογική εμπλοκή του EBV στο λέμφωμα του Burkitt βασίζεται στην αναγνώριση του ιϊκού γονιδιώματος με τις τεχνικές του Southern blotting και της PCR.

Ένας σημαντικός παράγοντας που εξηγεί την χαρακτηριστική γεωγραφική κατανομή της εμφάνισης του λεμφώματος Burkitt είναι η ελονοσία (εικόνα 4). Μια εξήγηση του φαινομένου είναι πως το παράσιτο λειτουργεί σαν χρόνια ανοσολογικό διεγερτικό ερέθισμα για τα Β κύτταρα που αναπτύσσονται και αυτό ίσως αυξάνει τον κίνδυνο να πραγματοποιηθεί η μετάθεση στα κύτταρα αυτά.



Εικόνα 4 : Κατανομή εμφάνισης του σχετιζόμενου με τον EBV λεμφώματος του Burkitt και του καρκίνου του ρινοφάρυγγα.

Λέμφωμα του Hodgkin (HL) :

Το Λέμφωμα του Hodgkin είναι ένας άλλος τύπος καρκίνου που έχει συσχετιστεί με τον ιό EBV. Η ασθένεια αυτή εμφανίζεται στο σύνολο του ανθρώπινου πληθυσμού με σχεδόν ίδια συχνότητα. Αν και δεν είναι πλήρως κατανοητή η μοριακή βάση της ασθένειας είναι πιθανό η συνεχόμενη έκφραση ορισμένων ιικών πρωτεϊνών να είναι καθοριστική για την εμφάνιση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου.

Καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα (Nasopharyngeal carcinoma, NPC) :

Αυτή η ασθένεια χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη καρκίνου στα επιθηλιακά κύτταρα του ανώτερου τμήματος του αναπνευστικού συστήματος. Η ασθένεια εμφανίζεται παγκόσμια αλλά κυρίως σε περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας και ιδιαίτερα στην νότια Κίνα (εικόνα 4). Οι ασθενείς με NPC εκφράζουν συγκεκριμένες ιικές πρωτεΐνες της λανθάνουσας φάσης, κάτι που υποδεικνύει πως ο ιός έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου.

Η μη ομοιόμορφη κατανομή της ασθένειας σε διάφορους πληθυσμούς δεν μπορεί να εξηγηθεί μόνο βάσει της μόλυνσης. Έτσι διαπιστώθηκε ο ουσιώδης ρόλος άλλων συμπαραγόντων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη αυτού του τύπου καρκίνου. Αυτοί οι παράγοντες είναι μια γενετική ευπάθεια των συγκεκριμένων πληθυσμών που εμφανίζουν την ασθένεια καθώς και η επίδραση κάποιων χημικών καρκινογόνων που χρησιμοποιούνται τοπικά σε αυτές τις περιοχές.

Άλλη μια ασθένεια που σχετίζεται με τον EBV είναι η Oral hairy leukoplakia, η οποία χαρακτηρίζεται ως επιθηλιακή υπερπλασία στην στοματική κοιλότητα και πλέον παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα εμφάνισης, καθώς πλήττει ασθενείς με AIDS.

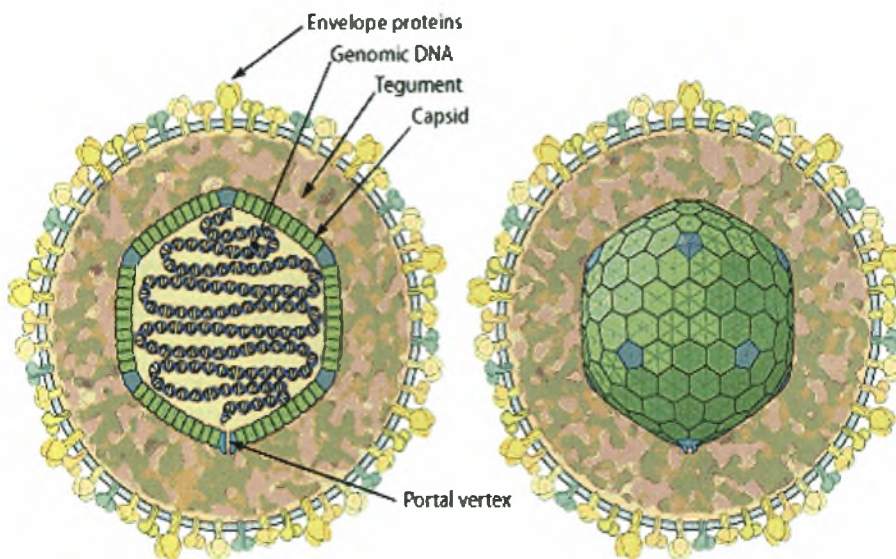
Τέλος, ένα άλλο σύνδρομο που οφείλεται στον ιό EBV είναι το X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP), το οποίο χαρακτηρίζεται από μια αυξημένη ανοσολογική αντίδραση, που οδηγεί στον θάνατο λόγω του glandular fever και της ανάπτυξης καρκίνου των λεμφαδένων.

## 1.β ΜΕΓΑΛΟΚΥΤΤΑΡΟΙΟΣ ( CYTAROMEGALOVIRUS, CMV)

Ο κυτταρομεγαλοϊός (Cytomegalovirus, CMV), ή Human herpesvirus 5 (HHV-5), είναι μέλος της οικογένειας των ερπητοϊών και συγκεκριμένα ανήκει στην υπο-οικογένεια των βήτα-ερπητοϊών. Τα χαρακτηριστικά που δικαιολογούν αυτήν την κατάταξη είναι η ικανότητα του ιού να προσβάλλει μονοπύρηνια κύτταρα και λεμφοκύτταρα καθώς και ο μεγάλης διάρκειας κύκλος αντιγραφής. Το όνομα του προήλθε από τα χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν τα μολυσμένα κύτταρα, δηλαδή την μεγέθυνση του κυτταροπλάσματος και γενικά του κυττάρου. Ο ιός που προσβάλλει τον άνθρωπο (HCMV) απομονώθηκε για πρώτη φορά από τρεις διαφορετικούς επιστήμονες : τους Smith και Rowe το 1956 και τον Weller το 1957.

### 1.β.1 Δομή του ιού

Η δομή του CMV είναι παρόμοια με των υπολοίπων ερπητοϊών . Παρουσιάζει εικοσαεδρικό καψίδιο που αποτελείται από 162 καψομερή, το υμένιο, τον επενδύτη και τις υπόλοιπες χαρακτηριστικές δομές στην επιφάνεια των ερπητοϊών, όπως περιγράφονται για τον ιό EBV.



Εικόνα 5 : Η δομή του ιού CMV, που αποτελείται από όλες τις χαρακτηριστικές δομές των ερπητοϊών

### 1.β.2 Δομή γονιδιώματος

Το γονιδίωμα του CMV είναι ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο περίπου 220 kb, και αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα γονιδιώματα της οικογένειας των ερπητοϊών. Μπορεί να κωδικοποιήσει πάνω από 200 πιθανά πρωτεϊνικά προϊόντα αν και η λειτουργία των περισσότερων από αυτά είναι ακόμα άγνωστη. Υπάρχουν πολλά στελέχη του ιού, καθένα από τα οποία προσβάλλει διαφορετικούς οργανισμούς, αλλά μεταξύ αυτών των στελεχών υπάρχει ομολογία του γονιδιώματος σε βαθμό περίπου 80%. Χαρακτηριστικό του γονιδιώματος του CMV είναι η ύπαρξη της μακριάς ειδικής αλληλουχίας (UL) και της κοντής ειδικής αλληλουχίας (US). Αυτές οι δύο αλληλουχίες μπορούν να αντιστραφούν και έτσι να υπάρξουν τέσσερα ισομερή του ιϊκού γονιδιώματος.



Εικόνα 6: Σχηματικός χάρτης του γονιδιώματος του CMV, το οποίο οργανώνεται σε δυο ειδικές αλληλουχίες (unique long, UL και unique short, US), που βρίσκονται δίπλα στις δυο θέσεις των αναστροφών επαναλήψεων (TRL/IRL και IRS/TRS)

### 1.β.3 Αντιγραφή ιϊκού γονιδιώματος

Αντιγραφή στην λυτική κατάσταση :

Αρχικά ο ιός προσκολλάται στο κύτταρο του ξενιστή μέσω ειδικών υποδοχέων και στη συνέχεια συντήκεται με την κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του πυρήνα και των πρωτεϊνών του υμένιου στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Στη συνέχεια, το καψίδιο μεταφέρεται στον πυρηνικό πόρο και έτσι το ιϊκό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου. Το ιϊκό γονιδίωμα υπάρχει στο κύτταρο του ξενιστή ως κυκλικό μόριο( επίσωμα) και αντιγράφεται με την διαδικασία του κυλιόμενου κύκλου. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την μεταγραφή των άμεσων πρώιμων γονιδίων (immediate early genes), τα οποία προωθούν την μεταγραφή των πρώιμων γονιδίων (early genes) από την πολυμεράση II του ξενιστή. Έπειτα τα μετάγραφα μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα όπου πραγματοποιείται η μετάφραση τους. Οι πρώιμες πρωτεΐνες (early proteins) εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιϊκού DNA και μεταφέρονται πίσω στον πυρήνα. Η σύνθεση πολλαπλών αντιγράφων ιϊκού DNA γίνεται από την ιϊκή πλέον DNA πολυμεράση. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μεταγραφή των όψιμων mRNA από την DNA πολυμεράση II του ξενιστή, μεταφορά στο κυτταρόπλασμα και μεταγραφή σε όψιμες πρωτεΐνες. Οι όψιμες αυτές πρωτεΐνες, που είναι είτε δομικές είτε πυρηνικές, μεταφέρονται πίσω στον πυρήνα. Το τελικό στάδιο της διαδικασίας είναι η συναρμολόγηση του ιού και η απελευθέρωση του από την πλασματική μεμβράνη.

Αντιγραφή στην λανθάνουσα κατάσταση :

Σε αυτήν την φάση η αντιγραφή του κυκλικού ιϊκού επισώματος γίνεται μαζί με την αντιγραφή του DNA του ξενιστή, χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό αντιγραφής του κυττάρου ξενιστή.

### 1.β.4 Γονιδιακή έκφραση

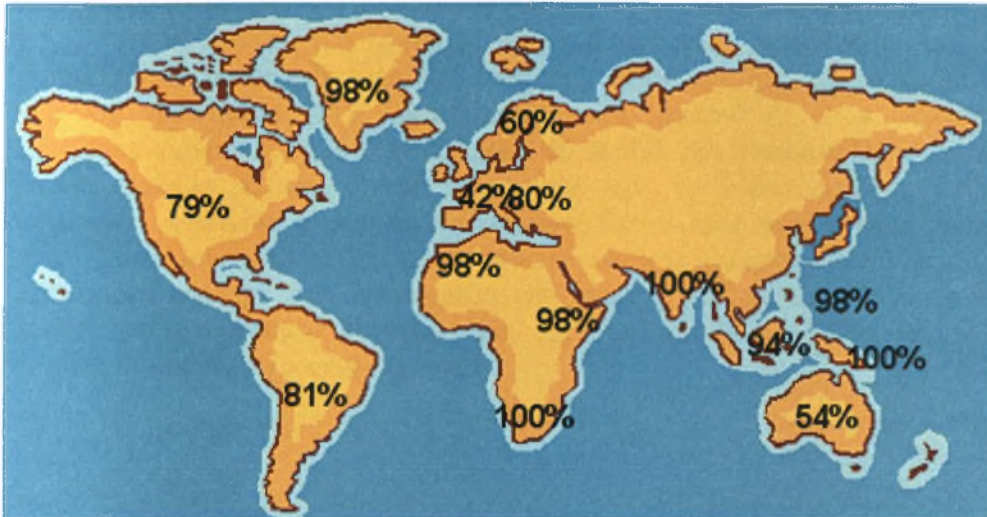
Κάθε ιϊκό μετάγραφο συνήθως κωδικοποιεί μια μοναδική πρωτεΐνη και έχει έναν υποκινητή ή μια ρυθμιστική αλληλουχία, ένα TATA box, μια θέση αναστολής της μεταγραφής, μια 5' αμετάφραστη περιοχή 30-300 bp, μια 3' αμετάφραστη αλληλουχία 10-30 bp και τέλος μια αλληλουχία-σήμα για την πολύ-A ουρά. Υπάρχει μεγάλη επικάλυψη μεταξύ των γονιδίων, ενώ πολύ λίγα γονίδια υφίστανται μάτισμα. Ορισμένα από τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) είναι αντισημαίνοντα και επίσης ορισμένα μπορεί να είναι υπό τον έλεγχο περισσότερων του ενός υποκινητών. Τέλος στο γονιδίωμα του ιού υπάρχουν και κάποια μη κωδικά γονίδια

### 1.β.5 Γεωγραφική κατανομή του ιού

Ο HCMV δεν παρουσιάζει συγκεκριμένο γεωγραφικό εντοπισμό και εμφανίζεται παγκοσμίως με διαφορετική όμως συχνότητα ανά περιοχή. Έχει αποδειχθεί πως ο ιός εμφανίζεται συχνότερα στις αναπτυσσόμενες χώρες και σε κοινωνίες χαμηλότερου κοινωνικοοικονομικού επιπέδου. Το 40 % των ενηλίκων



παγκοσμίως έχει μολυνθεί από τον ιό σε κάποια φάση της ζωής του. Επίσης, ο CMV είναι ο πιο συχνά διαδεδομένος ιός στα υπό ανάπτυξη έμβρυα και μπορεί να προκαλέσει ποικίλες ανωμαλίες στην ανάπτυξη τους.



Εικόνα 7 : Γεωγραφική κατανομή του CMV. Παρατηρείται μια διαφορετική συχνότητα εμφάνισης ανά περιοχή. Αφρική:82-100%, Αυστραλία/Δυτική Ευρώπη/ΗΠΑ:42-85%, Νότια Αμερική:81-98%

Η μετάδοση του ιού πραγματοποιείται από άτομο σε άτομο, μέσω της επαφής. Ο ιός υπάρχει στα βιολογικά υγρά ενός μολυσμένου ατόμου, δηλαδή στο αίμα, στο σάλιο και στα δάκρυα. Άλλες οδοί μόλυνσης είναι μέσω του πλακούντα, μέσω της μεταμόσχευσης οργάνου, μέσω του μητρικού γάλατος και τέλος μέσω της σεξουαλικής επαφής.

### 1.β.6 Ανοσολογική απάντηση του κυττάρου ξενιστή έναντι του ιού CMV

Τα ιικά αντιγόνα που αναγνωρίζει το κύτταρο ξενιστής είναι οι γλυκοπρωτεΐνες που βρίσκονται στη επιφάνεια του επενδύτη του ιού. Συγκεκριμένα, η γλυκοπρωτεΐνη B (gB) αποτελεί κύριο ερέθισμα ώστε να προκαλέσει την ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή. Σε μια αρχική μόλυνση με τον ιό, αντισώματα CMV IgM, εντοπίζονται τις πρώτες 4 έως 7 εβδομάδες και παραμένουν 16 έως 20 εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση. Τα περισσότερα παραγόμενα αντισώματα είναι ειδικά και δρουν εναντίον της γλυκοπρωτεΐνης gB. Ωστόσο και άλλες πρωτεΐνες του υμένιου του ιού, όπως οι : pp150, pp28 και pp65, προκαλούν την έντονη και διαρκή ανοσολογική απάντηση του ξενιστή. Συγκεκριμένα, η φωσφοπρωτεΐνη 65(pp65) αποτελεί τον κύριο στόχο των κυτταροτοξικών T κυττάρων. Η κυτταρική ανοσολογική απάντηση του ξενιστή αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα περιορισμού της μόλυνσης με CMV, με τα ειδικά για τον CMV, CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> λεμφοκύτταρα, τα οποία έχουν ουσιώδη ρόλο στην προστασία του κυττάρου ξενιστή

τόσο κατά την αρχική μόλυνση όσο και κατά την επαναενεργοποίηση του ιού.

Ωστόσο, ο CMV έχει αναπτύξει τρόπους που του επιτρέπουν να παρακάμπτει την αμυντική γραμμή του κυττάρου ξενιστή. Η μολυσματικότητα του ιού είναι αποτέλεσμα των μηχανισμών που έχει αναπτύξει προκειμένου να μην εντοπίζεται στον ξενιστή. Συγκεκριμένα, ο HCMV έχει τρία γονίδια που του επιτρέπουν να αποφεύγει το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Ένα από αυτά είναι το γονίδιο US3, τα προϊόντα του οποίου αποτρέπουν την μετακίνηση του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας προς την μεμβράνη. Επίσης, το προϊόν του US6 γονιδίου αποτρέπει την μετακίνηση των πεπτιδίων των πρωτεϊνών με αντιγονοπαρουσιαστική ιδιότητα. Τέλος, το προϊόν του γονιδίου US11 μετακινεί την βαριά αλυσίδα κλάσης I του αντιγόνου από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτοσόλιο, κάνοντας το έτσι μη λειτουργικό. Και τα τρία αυτά γονίδια παρεμβαίνουν στην διαδικασία παρουσίασης του αντιγόνου στο μολυσμένο κύτταρο. Έτσι, το μολυσμένο κύτταρο δεν αναγνωρίζει την ύπαρξη του ιού και δεν προκαλεί καμία ανοσολογική απάντηση εναντίον του, με αποτέλεσμα ο ιός να παραμένει στον ξενιστή για μεγάλο χρονικό διάστημα.

### **1.β.7 Μόλυνση από τον CMV και εκδήλωση συμπτωμάτων**

Στην πρωτογενή μόλυνση, συνήθως δεν παρουσιάζονται συμπτώματα. Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις που στην πρωτογενή μόλυνση εμφανίζονται συμπτώματα όμοια με αυτά της γρίπης. Ο CMV μπορεί να προκαλέσει σύνδρομο μονοπυρήνωσης όμοιο με αυτό που προκαλείται από τον EBV. Στα συμπτώματα περιλαμβάνονται: πυρετός που διαρκεί αρκετές ημέρες, γενικευμένη αδιαθεσία, κόπωση, μυϊκός πόνος και απώλεια βάρους. Και οι δύο ιοί μπορούν να προκαλέσουν ήπια ηπατίτιδα και μια αύξηση των επιπέδων των λεμφοκυττάρων στο αίμα. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν πως ασθενείς με CMV εμφανίζουν λιγότερο συχνά ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία και φαρυγγίτιδα σε σχέση με τους μολυσμένους από EBV ασθενείς και επίσης οι μολυσμένοι με CMV ασθενείς εμφανίζουν πυρετό που διαρκεί περισσότερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τους μολυσμένους από EBV ασθενείς. Ωστόσο αυτά τα κλινικά ευρήματα είναι ανεπαρκή για να διαφοροποιήσουν τους δυο ιούς και για τον λόγο αυτό θα πρέπει να υπάρξει περαιτέρω εξέταση ώστε να καθοριστεί αν πρόκειται για μονοπυρήνωση που προέρχεται από μόλυνση από τον CMV.

Όπως κάθε μέλος της οικογένειας των ερπητοϊών, έτσι και ο CMV μετά την πρωτογενή μόλυνση έχει την ικανότητα να παραμένει στον ξενιστή σε λανθάνουσα κατάσταση και να επαναενεργοποιείται με το κατάλληλο ερέθισμα. Συγκεκριμένες ομάδες ατόμων, όπως άτομα με ανοσοκαταστολή, μπορούν να μολυνθούν και να εκδηλώσουν μια ποικιλία ασθενειών, καθώς δεν είναι σε θέση να αναπτύξουν καμία αμυντική γραμμή έναντι του ιού. Τέτοιες ομάδες είναι οι ασθενείς που πάσχουν από AIDS, καθώς επίσης οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση κάποιου οργάνου. Οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς εμφανίζουν σοβαρή πνευμονία, ασθένεια που πλήττει τον γαστρεντερικό σωλήνα, ηπατίτιδα, αμφιβληστροειδίτιδα, εγκεφαλοπάθεια και σύνδρομο CMV. Οι ασθενείς που πάσχουν από AIDS και παρουσιάζουν μειωμένα ποσοστά CD4 κυττάρων, πολύ συχνά

πάσχουν από αμφιβληστροειδίτιδα που ακολουθείται από προβλήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος.

**Ηπατίτιδα:**

Σε ασθενείς με πρωτογενή μόλυνση CMV και μονοπυρήνωση συχνά εμφανίζονται συμπτώματα ηπατίτιδας. Σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί μια παροδική αύξηση των επιπέδων των ηπατοκυτταρικών ενζύμων καθώς επίσης μπορεί να αναπτυχθεί, σπάνια βέβαια, ίκτερος. Αν και για την ασθένεια υπάρχει ευνοϊκή πρόγνωση, ωστόσο έχουν καταγραφεί θάνατοι σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Παθολογικά χαρακτηριστικά είναι η διείσδυση των μονοπύρηνων κυττάρων από την περιοχή εισόδου του ιού και επίσης η ανάπτυξη κοκκιωματώδους μόλυνσης.

**Πνευμονία :**

Οι ενήλικες ασθενείς μολυσμένοι από CMV, που αναπτύσσουν το σύνδρομο μονοπυρήνωσης περιστασιακά μπορεί να πάσχουν από πνευμονία. Το ποσοστό ανάπτυξης πνευμονίας είναι περίπου 0-6%, αν και σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς το ποσοστό φτάνει το 19%. Συνήθως τα συμπτώματα της πνευμονίας εξασθενούν μετά την υποχώρηση της πρωτογενούς μόλυνσης και δεν έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία. Ωστόσο, στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς η πνευμονία μπορεί να αποβεί επικίνδυνη για την ζωή. Τα πιο κοινά κλινικά χαρακτηριστικά σε αυτήν την περίπτωση είναι ο πυρετός και η δύσπνοια. Ο CMV ανιχνεύεται πιο συχνά στους πνεύμονες ασθενών που πάσχουν από HIV, αν και δεν προκαλείται κάποια ασθένεια με ιδιαίτερα κλινικά χαρακτηριστικά.

**Γαστρίτιδα και κολίτιδα:**

Ο CMV μπορεί να μολύνει την γαστρεντερική οδό, από την στοματική κοιλότητα έως το παχύ έντερο. Η τυπική εκδήλωση της ασθένειας είναι η ανάπτυξη έλκους. Η γαστρίτιδα μπορεί να εμφανίσει κοιλιακό πόνο, ενώ η κολίτιδα εμφανίζει συνήθως συμπτώματα ασθένειας με διάρροια. Οι ασθένειες του γαστρεντερικού σωλήνα που προκαλούνται από τον CMV διαρκούν συνήθως λιγότερο σε σχέση με ασθένειες που εντοπίζονται σε άλλα όργανα, λόγω της αποβολής των μολυσμένων κυττάρων από την γαστρεντερική βλεννώδη μεμβράνη.

**Αμφιβληστροειδίτιδα**

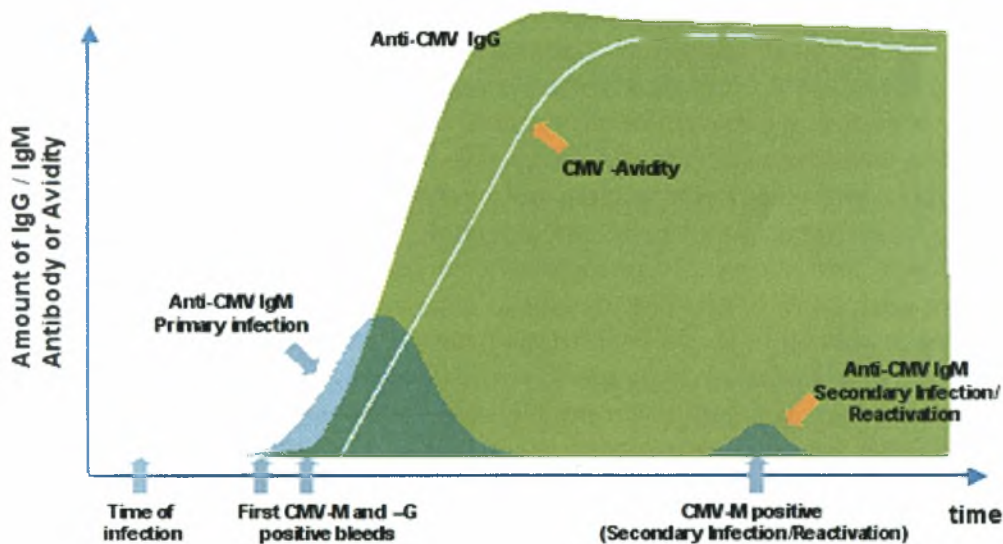
Αυτού του τύπου η ασθένεια, που προκαλείται από τον CMV, συναντάται συχνά σε ασθενείς που πάσχουν από AIDS, βρίσκονται σε τελικό στάδιο της ασθένειας και εμφανίζουν μειωμένο ποσοστό CD4<sup>+</sup> λεμφοκυττάρων στο αίμα. Τυπικά, στους ασθενείς αυτούς παρατηρείται μια σταδιακή μείωση στην ικανότητα όρασης, που μπορεί να οδηγήσει σε τύφλωση, τόσο μονομερή όσο και αμφίπλευρη, αν δεν υπάρξει θεραπεία.

### **1.β.8 Εκ γενετής μόλυνση με CMV (Congenital CMV Infection)**

Σε αυτή την περίπτωση μόλυνσης, η μητέρα, η οποία είναι μολυσμένη από τον ιό, τον μεταδίδει στο έμβryo. Η μετάδοση του ιού πραγματοποιείται μέσω του πλακούντα στο έμβryo, ενώ αν πρόκειται για νεογέννητο, η μετάδοση γίνεται μέσω του μητρικού γάλατος.

Τα συμπτώματα που εμφανίζονται σε μια εκ γενετής μόλυνσης με CMV για το νεογέννητο είναι ποικίλα και μπορεί να περιλαμβάνουν καθυστέρηση ανάπτυξης κατά την γέννηση, ανωμαλίες του κεντρικού νευρικού συστήματος, μικροκεφαλία, πνευματική καθυστέρηση και ανωμαλίες στο ήπαρ και τον σπλήνα. Αρκετά συχνά στα νεογνά εμφανίζονται συμπτώματα που σχετίζονται με απώλεια ακοής και νευροαισθητήρια κώφωση καθώς επίσης με απώλεια όρασης.

Η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα για να καθοριστεί ο κίνδυνος της εκ γενετής μόλυνσης του εμβρύου ή του νεογέννητου και της εμφάνισης συμπτωμάτων σε αυτό. Εμφανίζεται μεγάλη διαφορά στην πιθανότητα μετάδοσης του ιού από την μητέρα στο έμβρυο ή στο νεογέννητο, ανάλογα αν η μόλυνση της μητέρας είναι πρωτογενής ή όχι. Σε μια πρωτογενή μόλυνση της μητέρας, υπάρχει πιθανότητα 30 με 40% να μεταδοθεί ο ιός στο έμβρυο, ενώ αυτή η πιθανότητα μειώνεται στο 0,5 με 1%, όταν η μητέρα έχει ήδη προσβληθεί από τον ιό σε προηγούμενη φάση της ζωής της. Έτσι, γίνεται κατανοητό ότι έχει μεγάλη σημασία να καθοριστεί αν η μόλυνση της μητέρας είναι πρωτογενής ή όχι.



Εικόνα 8:Σχηματική απεικόνιση της μόλυνσης με CMV. Φαίνονται χαρακτηριστικά τόσο η πρωτογενής μόλυνση, όσο και η δευτερογενής.

### 1.β.9 Διάγνωση και θεραπεία της μόλυνσης από CMV :

Υπάρχουν διάφορες εργαστηριακές μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαγνωστεί η μόλυνση με τον CMV. Μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για πρόωμη διάγνωση της μόλυνσης είναι η DEFF (Detection of early antigen fluorescent foci ). Το δείγμα εμβολιάζεται σε μια κυτταρική καλλιέργεια. Μετά από 24 ώρες η καλλιέργεια εξετάζεται με ανοσοφθορισμό προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι ιικών πρωτεϊνών. Με βάση την ιστοπαθολογία, τα μολυσμένα κύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν με βιοψία λόγω της μεγέθυνσης τους

και λόγω της ύπαρξης συσσωματωμάτων, με χαρακτηριστική εμφάνιση. Με τον ιστολογικό ανοφθορισμό μπορούν να ανιχνευτούν τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα του ήπατος και του πνεύμονα τα οποία είναι σημασμένα με ειδικά αντι-CMV αντισώματα. Τέλος, η τεχνική της PCR είναι μια ευαίσθητη και γρήγορη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του ιού.

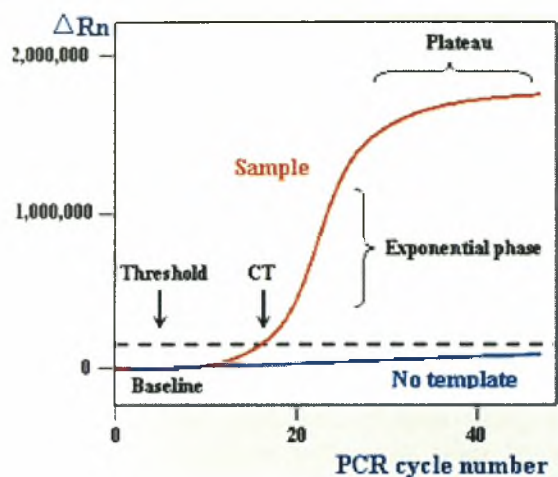
Γενικά, για τα υγιή άτομα που προσβάλλονται από τον ιό, δεν απαιτείται κάποια ειδική θεραπεία. Σε περίπτωση μόλυνσης ενός νεογνού, ενός ανοσοκατεσταλμένου ατόμου, ή σε περίπτωση που ένα άτομο εμφανίζει έντονα συμπτώματα, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν κάποια αντιικά ενδοφλέβια φάρμακα. Παραδείγματα τέτοιων φαρμάκων είναι τα εξής : *cidofovir* , *ganciclovir* και *foscarnet*. Ωστόσο αυτά τα φάρμακα δεν προσφέρουν θεραπεία έναντι του ιού, αλλά μειώνουν την αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος, συμβάλλοντας έτσι στην αποφυγή ή αντιμετώπιση κάποιων συμπτωμάτων.

### **1.γ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (REAL-TIME PCR, RT-PCR)**

Η RT-PCR είναι μια μέθοδος που έχει σαν βάση την κλασική μέθοδο της PCR παρέχοντας επιπλέον την δυνατότητα, αρχικά, ανίχνευσης και έπειτα, ποσοτικοποίησης της αλληλουχίας-στόχου σε κάθε στάδιο της αντίδρασης. Για τον λόγο αυτό αναφέρεται και ως «Ποσοτική σε πραγματικό χρόνο PCR», (Real time quantitative PCR, RQ-PCR). Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι η αυξημένη εξειδίκευση, η ευαισθησία και η αξιοπιστία της, γεγονός που την καθιστά μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες πλέον εργαστηριακές τεχνικές.

Η RQ- PCR βασίζεται στην ενεργότητα 5' νουκλεάσης του ενζύμου Taq πολυμεράση, που συμμετέχει στην αντίδραση και στη σύνδεση του προϊόντος της PCR με φθοριόχρωμα σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικό θερμοκυκλοποιητή, που είναι εξοπλισμένος με ειδικό ανιχνευτή φθορισμού, και συνδέεται με υπολογιστικό σύστημα για ανάλυση με κατάλληλο πρόγραμμα. Η ανίχνευση του προϊόντος της PCR πραγματοποιείται κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης, σε κάθε κύκλο της. Η ένταση φθορισμού που προσδιορίζεται σε κάθε κύκλο, είναι ανάλογη της ποσότητας του προϊόντος που παράγεται. Έτσι, η ένταση αυξάνεται εκθετικά, κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης.

Ο φθορισμός που ανιχνεύεται, προέρχεται τόσο από το περιβάλλον (background) και αποτελεί τον μη ειδικό φθορισμό, αλλά και από το προϊόν της αντίδρασης, που είναι ο ειδικός φθορισμός. Βάσει αυτού, είναι δυνατό να γίνει ο καθορισμός του σημείου ή ουδού (cut-off level) για τον ειδικό φθορισμό. Αυτό το όριο, που καλείται και γραμμή μετάπτωσης, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του κύκλου μετάπτωσης κάθε δείγματος. Ο κύκλος μετάπτωσης (Threshold Cycle, CT) είναι ο κύκλος της αντίδρασης στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά τον ουδό μετάβασης. Η τιμή μετάπτωσης είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα.



Εικόνα 9: Το διάγραμμα παριστά μια τυπική καμπύλη της αντίδρασης Real-Time PCR.

Για να πραγματοποιηθεί η ποσοτικοποίηση σε μια αντίδραση RT-PCR είναι απαραίτητη η παράλληλη ενίσχυση ενός γονιδίου αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να εκφράζεται σταθερά σε όλους τους τύπους κυττάρων, τόσο των υγιών όσο και των μη φυσιολογικών, να μην επηρεάζεται από πιθανή θεραπευτική αγωγή και τέλος να μην υπάρχουν ψευδογονίδια.

Υπάρχουν δυο στρατηγικές ποσοτικοποίησης σε μια αντίδραση RT-PCR, η απόλυτη ποσοτικοποίηση και η σχετική ποσοτικοποίηση. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute Quantification), η ποσοτικοποίηση του άγνωστου δείγματος πραγματοποιείται βάσει μιας «πρότυπης καμπύλης», που κατασκευάζεται με αραιώσεις γνωστών δειγμάτων. Η ακρίβεια στην συγκεκριμένη περίπτωση εξαρτάται αποκλειστικά από την ακρίβεια των προτύπων. Ιδιαίτερη σημασία έχει ο σχεδιασμός των προτύπων, η προστασία και ο καθορισμός της ακριβούς συγκέντρωσής τους, καθώς και η σταθερότητα τους κατά τη διάρκεια μιας μακροχρόνιας αποθήκευσης.

Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιείται στην απόλυτη ποσοτικοποίηση μπορεί να βασιστεί σε γνωστές συγκεντρώσεις πρότυπων μορίων DNA, π.χ ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA (rec DNA), γενωμικού DNA, προϊόντος της RT-PCR, ή τέλος εμπορικά συντιθέμενου μεγάλου ολιγονουκλεοτιδίου.

Τα κλωνοποιημένα ανασυνδυασμένα μόρια DNA και τα μόρια του γενωμικού DNA είναι πολύ σταθερά ακόμα και μετά από μακροχρόνια αποθήκευση, σε αντίθεση με τα νεοσυντιθέμενα RNA καθώς επίσης είναι πιο ανθεκτικά στην μη-ειδική απομάκρυνση από την Taq πολυμεράση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της PCR. Τα μικρότερα σε μήκος πρότυπα μόρια, καθώς και τα μόρια που παρέχονται από το εμπόριο, παρουσιάζουν πλεονέκτημα καθώς το μήκος και η συγκέντρωσή τους είναι γνωστή και επιπλέον, δεν είναι απαραίτητη η χρονοβόρα διαδικασία της σύνθεσης των προτύπων, της κλωνοποίησης, του μετασχηματισμού, της προετοιμασίας του πλασμιδίου, της γραμμικής μορφοποίησης και τέλος, του ακριβούς καθορισμού της συγκέντρωσης των προτύπων.

Μια άλλη επιλογή είναι η χρήση ανασυνδυασμένου RNA (rec RNA). Πρόκειται για μόριο που συντίθεται *in vitro* με κλωνοποίηση ενός τμήματος προϊόντος της RT-PCR σε πλασμίδιο. Ωστόσο, επειδή σε αυτή τη περίπτωση μεσολαβεί ένα ακόμα βήμα στην αντίδραση της PCR, το βήμα της αντίστροφης μεταγραφής του rec RNA σε cDNA, θα πρέπει να ελεγχθεί η αποδοτικότητα συνολικά της αντίδρασης, εάν επρόκειτο το recDNA να παρέχει ένα έγκυρο πρότυπο για την ποσοτικοποίηση του mRNA. Αυτό συμβαίνει γιατί μόνο τα ειδικά μόρια

recRNA είναι παρόντα στο επιπλέον βήμα της αντίστροφης μεταγραφής και η κινητική της σύνθεσης του cDNA δεν είναι όμοια με αυτή των μορίων RNA του άγνωστου δείγματος. Αυτή η διαφορά μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό σύνθεσης cDNA, δηλαδή να αυξηθεί η αποδοτικότητα της αντίδρασης και συνεπώς να δημιουργηθεί μια λανθασμένη πρότυπη καμπύλη που θα υπερεκτιμά τις ποσότητες κατά την ποσοτικοποίηση. Λύση στο πρόβλημα αυτό μπορεί να είναι η απομόνωση και χρήση ολικού RNA από βακτήρια, ή η χρήση μορίων RNA που διατίθενται στο εμπόριο.

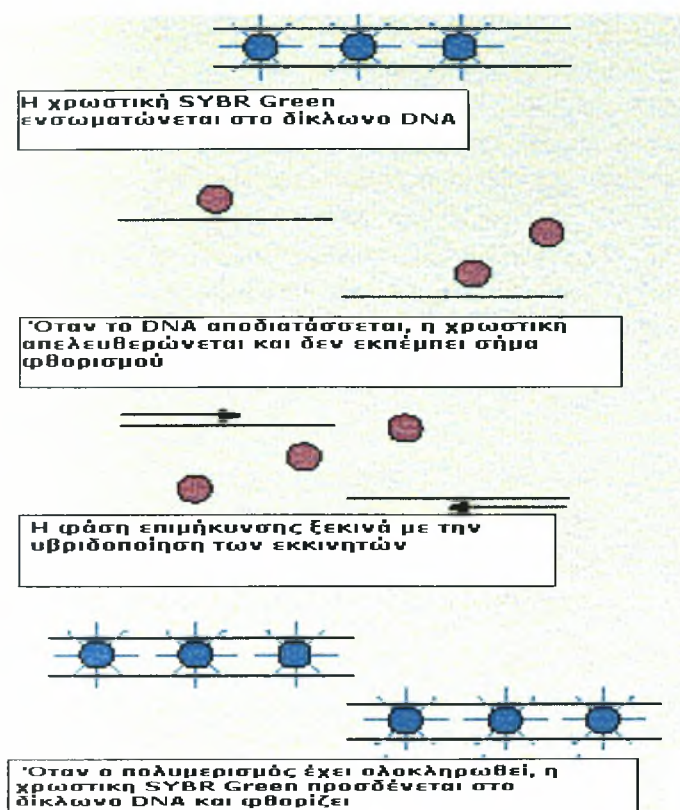
Η ποσότητα του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς προσδιορίζεται με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης και το αποτέλεσμα εκφράζεται ως αναλογία έκφρασης του γονιδίου στόχου προς το γονίδιο αναφοράς. Ένα από τα πλέον κατάλληλα γονίδια αναφοράς είναι το γονίδιο ABL, καθώς παρουσιάζει σταθερή έκφραση και συγκρίσιμη στο μυελό των οστών τόσο σε φυσιολογικά όσο και λευχαιμικά κύτταρα. Άλλα γονίδια αναφοράς είναι τα G6PD, GAPDH, PBGB και β-ακτίνη.

Η δεύτερη στρατηγική ποσοτικοποίησης, η σχετική ποσοτικοποίηση (Relative Quantification), πραγματοποιείται με σύγκριση ανάμεσα στο δείγμα (DNA ή cDNA) που αφορά το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και στο αντίστοιχο δείγμα που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς και η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου στόχου διαιρείται με την συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως αναλογία έκφρασης μεταγράφων του γονιδίου στόχου προς το γονίδιο αναφοράς.

Πλέον χρησιμοποιούνται κυρίως τρία διαφορετικά πρωτόκολλα RT-PCR, τα εξής: α) ανάλυση RT-PCR με χρήση χρωστικής SYBR Green, β) ανάλυση με ανιχνευτές υδρόλυσης και τέλος, γ) ανάλυση με ανιχνευτές υβριδισμού.

α) Ανάλυση RT-PCR με χρήση χρωστικής SYBR Green:

Η μέθοδος αυτή αποτελεί την πιο απλή και οικονομική επιλογή. Βασίζεται στην χρήση της χρωστικής SYBR Green, η οποία ενσωματώνεται στο DNA. Συγκεκριμένα, η χρωστική αυτή προσδένεται στην μικρή αύλακα του δίκλωνου μορίου DNA και ενισχύει το φθορισμό του, κάτι που δεν συμβαίνει όταν το μόριο είναι μονόκλωνο. Κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, ο φθορισμός αυξάνεται σταδιακά και μεγιστοποιείται στο τέλος κάθε αντίστοιχης φάσης. Ακόμα, κατά την φάση της αποδιάταξης παρατηρείται μείωση ή ακόμα και απουσία του σήματος φθορισμού (εικόνα 10)



Εικόνα 10 : Η χρωστική SYBR Green προσδένεται μόνο στα δίκλιωνα μόρια και καθώς η αντίδραση προχωρά και αυξάνεται το προϊόν, αυξάνεται ο φθορισμός.

Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι το γεγονός ότι η χρωστική SYBR Green συνδέεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, συμπεριλαμβανομένων των μη ειδικών προϊόντων της αντίδρασης ή και των διμερών που δημιουργούν οι εκκινητές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την λάθος εκτίμηση της συγκέντρωσης του ειδικού προϊόντος.

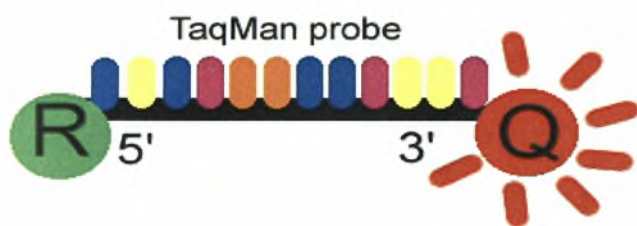
Προκειμένου να εξακριβωθεί αν έχουν σχηματιστεί ειδικά προϊόντα πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve). Κάθε τμήμα δίκλωνου DNA έχει ένα συγκεκριμένο σημείο τήξης ( $T_m$ ), που είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% της ποσότητας του DNA έχει γίνει μονόκλωνο. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται χρωστικές που συνδέονται στο DNA, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία ανιχνεύεται μια ξαφνική μείωση του φθορισμού όταν επιτυγχάνεται η θερμοκρασία  $T_m$ . Αυτό γίνεται λόγω της απομάκρυνσης των δύο αλυσίδων και λόγω της απελευθέρωσης της χρωστικής. Αυτό το σημείο καθορίζεται από το σημείο κάμψης της καμπύλης τήξης. Έτσι αν έχει σχηματιστεί μόνο το ειδικό προϊόν της PCR θα είναι ορατή μόνο μια κορυφή στην εικόνα ενδείξεων των σημείων τήξης.

#### β) Ανάλυση με ανιχνευτές υδρόλυσης:

Η ανάλυση με χρήση ανιχνευτών υδρόλυσης (hydrolysis probes) βασίζεται στην 5'-3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης που συμμετέχει στην αντίδραση. Η δομή του ανιχνευτή είναι τέτοια που στο 5' άκρο του είναι συνδεδεμένο ένα φθοριόχρωμα αναφοράς (π.χ FAM, VIC, JOE) και στο 3' άκρο υπάρχει ένας καταστολέας φθοριοχρώματος (π.χ TAMRA). Οι ανιχνευτές είναι σχεδιασμένοι ώστε να υβριδίζονται σε ένα εσωτερικό τμήμα του προϊόντος της PCR.



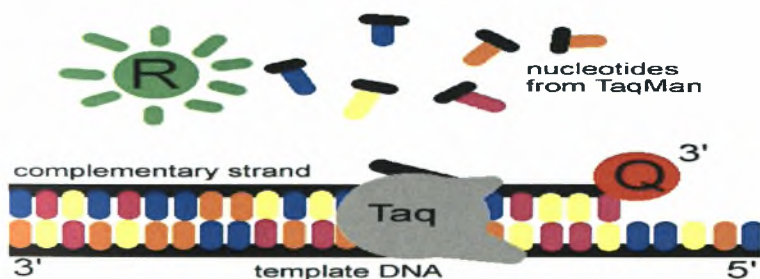
Στη φάση που ο ανιχνευτής δεν είναι υβριδισμένος στο DNA και η δομή του είναι άθικτη, τα δυο φθοριοχρώματα βρίσκονται σε μικρή απόσταση και ο φθορισμός που εκπέμπεται από το φθοριόχρωμα αναφοράς απορροφάται από τον καταστολέα φθορισμού· διαδικασία που αναφέρεται και ως μεταφορά συντονισμένης ενέργειας φθορισμού (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET). Όταν η αντίδραση είναι στη φάση επιμήκυνσης και εκτός των εκκινητών έχει ήδη υβριδιστεί και ο ανιχνευτής, η Taq πολυμεράση σταδιακά υδρολύει τον ανιχνευτή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να απομακρυνθεί το φθοριόχρωμα αναφοράς από τον καταστολέα του και σταδιακά να είναι δυνατή η ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπει το φθοριόχρωμα αναφοράς.



Εικόνα 11: Δομή του ανιχνευτή υδρόλυσης (TaqMan). Ο κόκκινος κύκλος αναπαριστά τον καταστολέα του φθοριοχρώματος και ο πράσινος κύκλος το μόριο του οποίου ο φθορισμός καταστέλλεται.



Εικόνα 12: Υβριδοποίηση των εκκινητών και του ανιχνευτή στην αλληλουχία στόχο. Η Taq πολυμεράση μπορεί πλέον να δημιουργήσει τον συμπληρωματικό κλώνο.



Εικόνα 13: Η χρωστική ανάφοράς απελευθερώνεται από το επεκταμένο δίκλωνο μόριο DNA λόγω της δράσης της Taq πολυμεράσης. Έτσι, ο φθορισμός από το φθοριόχρωμα αναφοράς δεν καταστέλλεται από τον καταστολέα του και μπορεί να ανιχνευθεί.

γ) Ανάλυση με ανιχνευτές υβριδισμού:

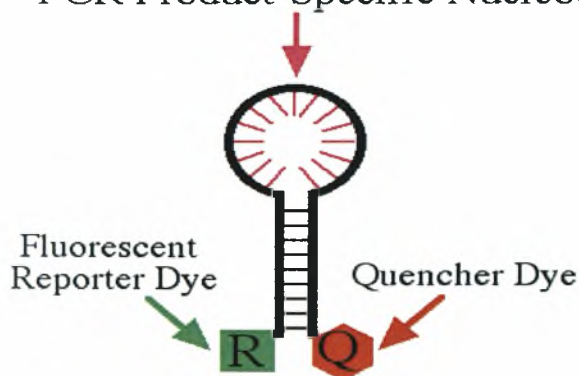
Αυτός ο τύπος ανάλυσης της RT-PCR χρησιμοποιεί δυο αλληλοεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας, ο ένας σημασμένος στο 3' άκρο με ένα φθοριόχρωμα-δότη (π.χ FAM) και ο άλλος

σημασμένος στο 5' άκρο με ένα φθοριόχρωμα-δέκτη (π.χ LC Red640, LC Red 705). Οι δυο ανιχνευτές υβριδίζονται σε κοντινές περιοχές στην αλληλουχία-στόχο. Κατά τη διεγέρση του φθοριοχρώματος-δότη, εκπέμπεται ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Όταν τα δυο φθοριοχρώματα βρίσκονται κοντά, το φως που εκπέμπεται από τον δότη θα διεγείρει το φθοριόχρωμα-δέκτη (FRET). Αυτό οδηγεί σε εκπομπή του φθορισμού από φθοριόχρωμα-δέκτη, ο οποίος ανιχνεύεται κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της PCR.

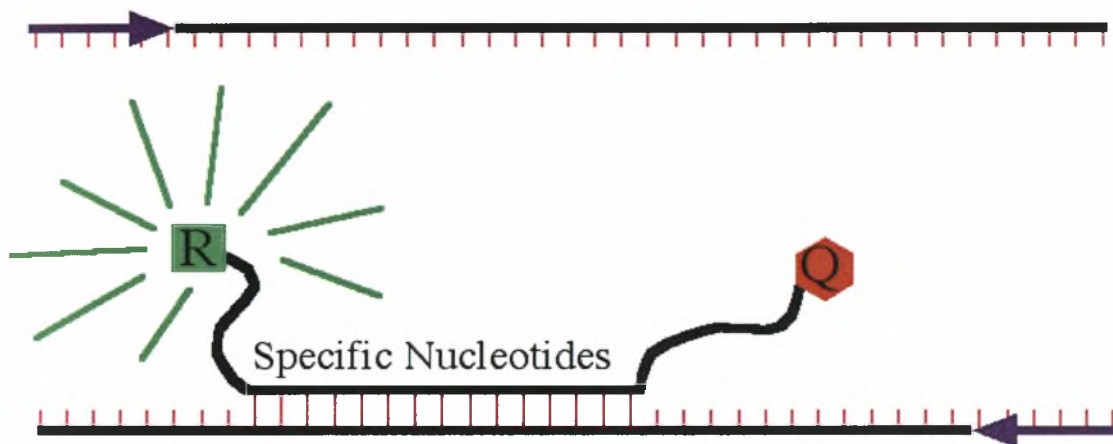
Εκτός των παραπάνω πρωτοκόλλων έχουν αναπτυχθεί και άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούν διαφορετικό είδος ανιχνευτών. Τέτοια παραδείγματα είναι οι ανιχνευτές εκπομπής διαλείποντος φθορισμού (Molecular Beacons), οι Scorpions, ανιχνευτές που είναι ενωμένοι με μόρια που μπορούν να προσδεθούν στη μικρή αύλακα του DNA (Minor groove-binding-MGB probes), οι ResonSense, οι Hy-Beacon και τέλος οι Light-up. Ωστόσο, σε μεγαλύτερη κλίμακα χρησιμοποιούνται οι Molecular Beacons και οι Scorpions.

Ο ανιχνευτής Molecular Beacon έχει ίδια μορφή με τους ανιχνευτές TaqMan, με δυο μόρια στα δύο άκρα, των οποίων όμως οι αλληλουχίες είναι συμπληρωματικές και έτσι δημιουργείται δομή φουρκέτας. Ο σχηματισμός φουρκέτας έχει σαν αποτέλεσμα το φθοριόχρωμα αναφοράς και ο καταστολέας φθοριοχρώματος να βρίσκονται πολύ κοντά και έτσι να μην παράγεται φθορισμός. Η διαφορά με τους ανιχνευτές TaqMan, είναι πως ο φθορισμός παράγεται όταν οι Molecular Beacons υβριδιστούν στην αλληλουχία-στόχο, χωρίς να απαιτείται η αποικοδόμηση του ανιχνευτή. Με τον υβριδισμό του ανιχνευτή στην αλληλουχία-στόχο, αλλάζει η διαμόρφωσή του και ο καταστολέας φθοριοχρώματος απομακρύνεται αρκετά από το φθοριόχρωμα αναφοράς, το οποίο τελικά εκπέμπει φθορισμό. Χαρακτηριστικό των ανιχνευτών αυτής της κατηγορίας, εξαιτίας του οποίου πήραν και το όνομα τους, είναι το γεγονός ότι αναβοσβήνουν ρυθμικά ανά κύκλο αντίδρασης, καθώς στο στάδιο υβριδισμού εκπέμπεται φθορισμός, ενώ στο στάδιο του πολυμερισμού σχηματίζουν τη δομή φουρκέτας και δεν παράγεται πλέον σήμα φθορισμού. Η ακτινοβολία αυξάνεται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης ανάλογα με τα προϊόντα που σχηματίζονται.

#### PCR Product-Specific Nucleotides



Εικόνα 14: Δομή φουρκέτας του ανιχνευτή molecular beacon, όπου το φθοριόχρωμα αναφοράς (πράσινο σχήμα) και το φθοριόχρωμα καταστολέας (κόκκινο σχήμα) είναι σε κοντινή απόσταση και έτσι ο φθορισμός δεν ανιχνεύεται λόγω του καταστολέα. Οι ροζ γραμμές αναπαριστούν νουκλεοτίδια που μπορούν να υβριδιστούν στο προϊόν της PCR



Εικόνα 15: Ανίχνευση προϊόντος PCR με χρήση ανιχνευτή molecular beacon. Όταν ο ανιχνευτής συνδεθεί στο προϊόν της PCR, μπορεί να φθορίσει όταν εκτεθεί σε κατάλληλου μήκους κύμα φωτός. Η ποσότητα φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα του προϊόντος που ενισχύεται.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### ΥΛΙΚΑ:

Το υλικό μελέτης αποτέλεσαν στο σύνολό τους 154 υγιείς και ασυμπτωματικοί αιμοδότες, εκ των οποίων στους 69 έγινε ανίχνευση για τον ιό EBV και στους 85 έγινε ανίχνευση για τον ιό CMV.

Τα δείγματα αίματος που εξετάστηκαν, προέρχονται από γενική εξέταση αίματος 2 ml και είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η επιλογή τους έγινε τυχαία. Οι αιμοδότες, που αντιπροσωπεύουν και τα δυο φύλα, είναι κάτοικοι της κεντρικής Ελλάδας (Θεσσαλία), τόσο των αστικών κέντρων (Λάρισα), όσο και των περιχώρων του νομού. Για όλους τους αιμοδότες καταγράφηκε η ηλικία τους καθώς επίσης και η ηπατική βιοχημεία τους. Οι αιμοδότες που εξετάστηκαν για την ύπαρξη του ιού CMV είχαν μέσο όρο ηλικίας τα 39 έτη, ενώ για τον EBV ο μέσος όρος ηλικίας ήταν τα 36 έτη. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν μοριακά και ορολογικά για τους ιούς HIV, HCV και HBV και βρέθηκαν αρνητικά.

### ΜΕΘΟΔΟΙ:

- Απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα.

Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το Magration-MagaZorb DNA Common Kit-200 N της εταιρίας Precision System Science(PSS), σε συνδυασμό με το μηχάνημα Magration System 12GC, της ίδιας εταιρίας.

Πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ο μικρός χρόνος διάρκειας, ο μικρός κίνδυνος σφάλματος και τέλος το γεγονός ότι αποτελεί μια πλήρως αυτοματοποιημένη επιλογή.

Η μέθοδος βασίζεται στην χρήση μαγνητικών σφαιριδίων για την απομόνωση του γενετικού υλικού από 200μl ολικού αίματος. Με τα κατάλληλα buffers που παρέχονται από το kit και περιλαμβάνουν : πρωτεϊνική κινάση K, lysis buffer, binding buffer, washing buffer 1 & 2 και τέλος τα μαγνητικά σφαιρίδια, πραγματοποιείται η απομόνωση του γενετικού υλικού.

Συνοπτικά τα στάδια της διαδικασίας παρατίθενται στην εικόνα1 και περιλαμβάνουν :

- λύση των κυττάρων του αίματος
- εισαγωγή των μαγνητικών σφαιριδίων και δέσμευση του DNA σε αυτά
- πραγματοποίηση δύο διαδοχικών εκπλύσεων
- το τελικό στάδιο διαχωρισμού που βασίζεται στην ύπαρξη μαγνητισμού.



Εικόνα 16 : Τα στάδια απομόνωσης του γενωμικού DNA από αρχικό δείγμα ολικού αίματος με την μέθοδο διαχωρισμού που στηρίζεται στην χρήση μαγνητικών σφαιριδίων.

- Ηλεκτροφόρηση του DNA

Το επόμενο βήμα μετά την απομόνωση είναι η ηλεκτοφόρηση του DNA. Σκοπός του συγκεκριμένου βήματος είναι η επιβεβαίωση ότι το υλικό που πήραμε όντως περιέχει DNA. Για την ηλεκτροφόρηση του DNA χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτροφορητικές συσκευές της εταιρίας Invitrogen, gel αγαρόζης 1% καθώς και η χρωστική Coomassie blue, της εταιρίας Invitrogen.

Σε ηλεκτροφορητική συσκευή χρησιμοποιείται gel αγαρόζης 1%, στο οποίο φορτώνονται 5 μl DNA και 2 μl χρωστικής Coomassie blue.

- Αλυσιδωτή σε πραγματικό χρόνο αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

### **RT-PCR για την ανίχνευση του ιού CMV**

Τα εμπορικά kit της Nanogen που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αξιοποιούν την Taqman χημεία (ανιχνευτές υδρόλυσης) σε συνδυασμό με το μηχάνημα Rotor-Gene της εταιρίας Corbett. Το kit περιέχει τα εξής :

- **CMV AmpliMIX:** είναι ένα μίγμα εκκινητών για την αντίδραση της RT-PCR σε σταθεροποιητικό διάλυμα. Οι εκκινητές είναι ειδικοί για μια περιοχή του εξονίου 4 του ιικού γονιδίου CMV MIEA (major immediate early antigen, HCMVUL123 ). Η διαπίστωση ύπαρξης DNA στα υπό μελέτη δείγματα έγινε με ενίσχυση του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι ειδικοί για τον υποκινητή και την 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της ανθρώπινης β-σφαιρίνης.
- **CMV AmpliPROBE:** είναι ένα μίγμα φθορίζοντων ανιχνευτών για την αντίδραση της RT-PCR σε σταθεροποιητικό διάλυμα. Οι ανιχνευτές για τον CMV είναι σημασμένοι με το φθοριόχρωμα δότη FAM και με το φθοριόχρωμα δέκτη της ομάδας MGB-NFQ. Οι ανιχνευτές για το positive control είναι σημασμένοι με το φθοριόχρωμα δότη VIC και με το φθοριόχρωμα δέκτη της ομάδας MGB-NFQ.
- **CMV AmpliMASTER:** το μίγμα αυτό περιλαμβάνει τα απαραίτητα συστατικά για μια αντίδραση PCR, δηλαδή τα κατάλληλα buffers, χλωριούχο μαγνήσιο, τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, την Taq πολυμεράση, καθώς επίσης το ένζυμο UNG (uracyl-Nglycosidase), το οποίο απενεργοποιεί πιθανό προϊόν της αντίδρασης που είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης και τέλος το φθοριόχρωμα ROX, το οποίο σχετίζεται με το αποτέλεσμα του φθορισμού που θα δοθεί από την αντίδραση.

Η διαδικασία της προετοιμασίας των tubes της αντίδρασης έχει ως εξής:

Στο μίγμα του AmpliMASTER προστίθενται 100 μl από το μίγμα του AmpliMix και 100 μl από το μίγμα του AmpliPROBE και πραγματοποιείται καλή ανάδευση. Στη συνέχεια μοιράζονται σε κάθε tube της αντίδρασης 20 μl από το τελικό μίγμα AmpliMASTER. Στα tubes της αντίδρασης προστίθενται το υπό εξέταση DNA σε ποσότητα 5 μl ενώ σε ένα από αυτά προστίθενται 5 μl του positive control, και σε ένα δεύτερο προστίθενται 5 μl αποστειρωμένου ύδατος, το οποίο λειτουργεί ως negative control.

Μετά την προετοιμασία των tubes της αντίδρασης, τα τελευταία τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή και ξεκινούν οι κύκλοι της αντίδρασης.

### **RT-PCR για την ανίχνευση του ιού EBV**

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και κατά την αντίδραση της RT-PCR για την ανίχνευση του ιού EBV. Σε αυτή την περίπτωση το γονίδιο που ενισχύεται είναι το EBNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen 1).

Ποσοτικοποίηση θετικών δειγμάτων:

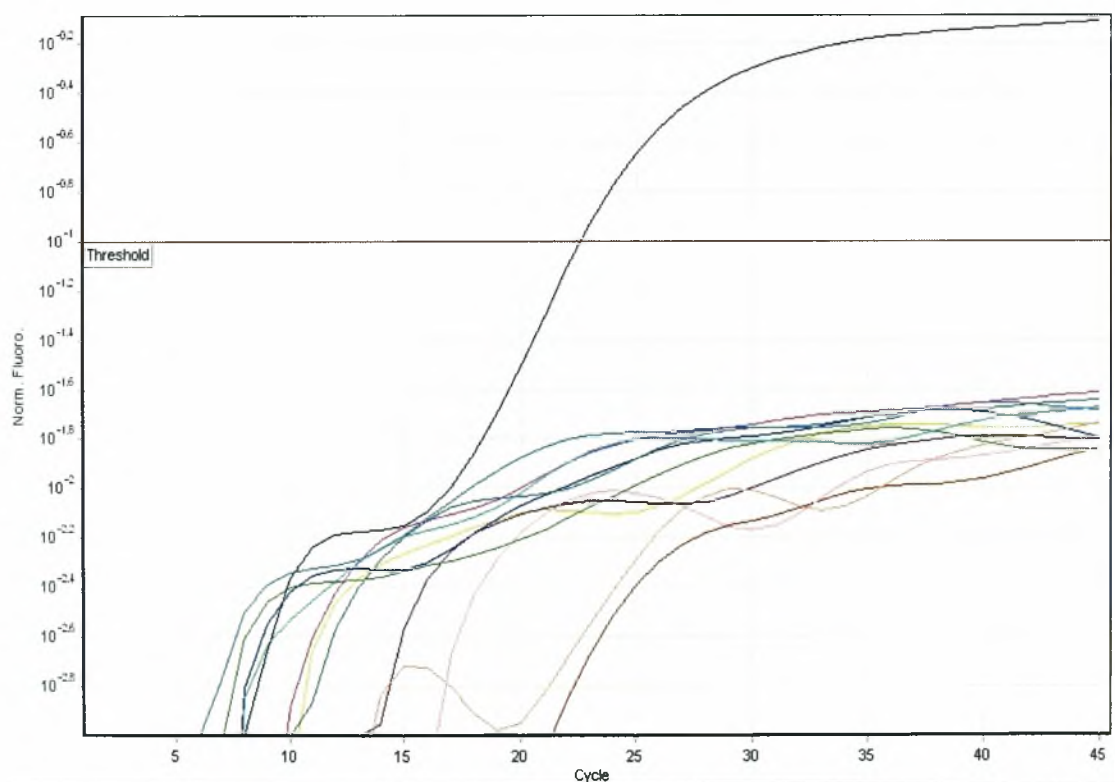
Σε ορισμένα από τα θετικά δείγματα τόσο για τον ιό EBV όσο και για τον ιό CMV έγινε ποσοτικοποίηση, μια διαδικασία κατά την οποία γίνεται προσδιορισμός του ιικού φορτίου. Για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα με γνωστή

συγκέντρωση ( $10^5, 10^4, 10^3, 10^2$  αντίγραφα του ιού) ώστε να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη. Βάσει της πρότυπης καμπύλης είναι δυνατό να μετρηθούν τα αντίγραφα του ιού σε θετικά δείγματα.

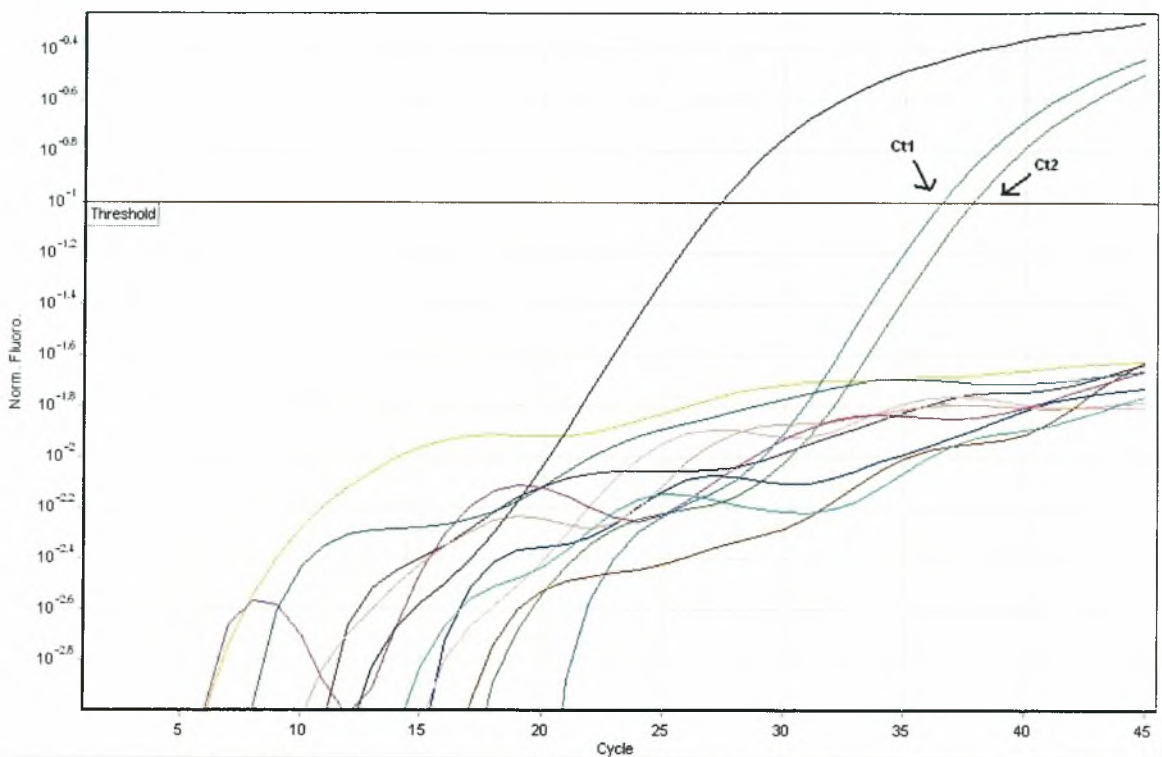
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την εξέταση των δειγμάτων για την ανίχνευση του ιού βρέθηκε ότι η συχνότητα μοριακής ανίχνευσης είναι 1,18% και δεν υπήρξε κάποια συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης της ανίχνευσης του ιού και της ηλικίας των αιμοδοτών. Για τον ιό EBV η συχνότητα μοριακής ανίχνευσης ανέρχεται στο 11,6%. Και σε αυτή την περίπτωση δεν εμφανίζεται κάποια συσχέτιση μεταξύ της ανίχνευσης του EBV και της ηλικίας των αιμοδοτών.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η ανάλυση των αποτελεσμάτων σε μια αντίδραση RT-PCR βασίζεται σε υπολογιστικό σύστημα. Ενδεικτικά, η εικόνα που λαμβάνουμε μετά το τέλος της αντίδρασης για μια αντίδραση με όλα τα δείγματα αρνητικά (εικόνα 17) και κάποια δείγματα θετικά (εικόνα 18) φαίνονται στις παρακάτω εικόνες

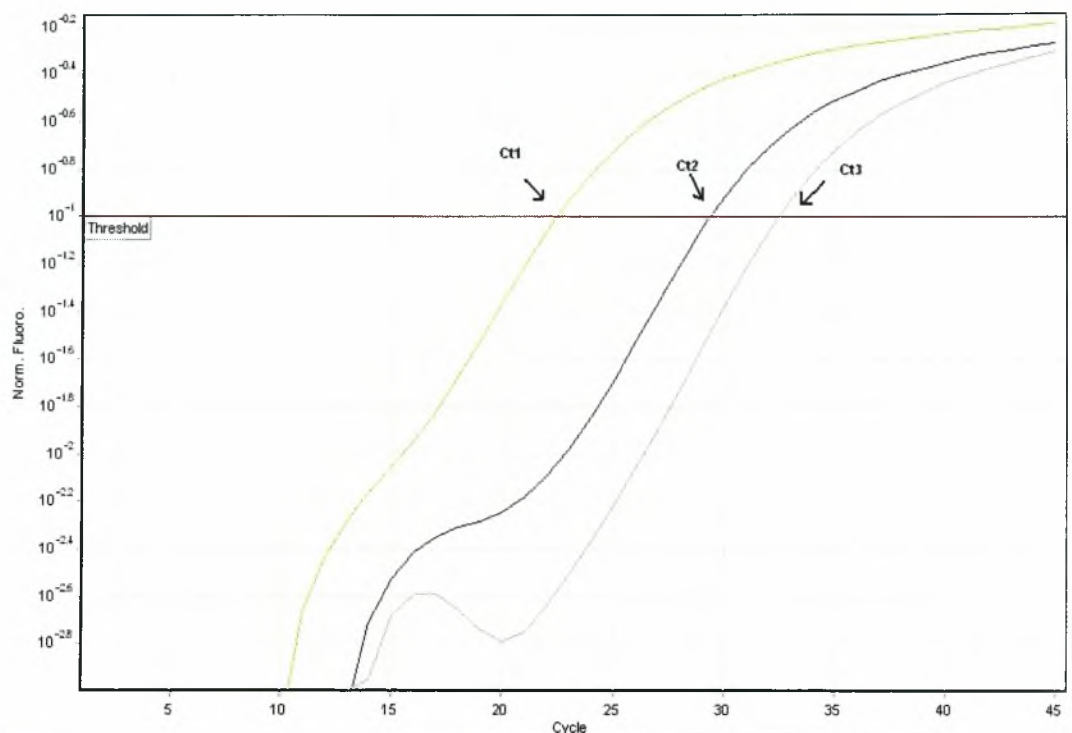


Εικόνα 17 :Απεικόνιση αποτελεσμάτων μιας αντίδρασης RT-PCR, στην οποία όλα τα δείγματα είναι αρνητικά για τον ιό EBV.Στον κατακόρυφο άξονα τοποθετούνται τα επίπεδα φθορισμού, ενώ στον οριζόντιο καταγράφονται οι κύκλοι της αντίδρασης. Η καμπύλη που φαίνεται να περνάει πάνω από το καθορισμένο όριο φθορισμού (threshold), αποτελεί το θετικό control της αντίδρασης.



Εικόνα 18 : Απεικόνιση αποτελεσμάτων μιας αντίδρασης RT-PCR, στην οποία δυο από τα δείγματα είναι θετικά. Για το κάθε θετικό δείγμα σημειώθηκε και το Ct, ο κύκλος δηλαδή της αντίδρασης στον οποίο ο φθορισμός του δείγματος ξεπερνά το όριο φθορισμού και έτσι θεωρείται θετικό.

Κατά την διαδικασία ποσοτικοποίησης των θετικών δειγμάτων τόσο για τον ιό EBV όσο και για τον ιό CMV, χρησιμοποιήθηκαν όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα πρότυπα δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντιγράφων του ιού (standards), προκειμένου να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 19).



Εικόνα 19 : Απεικόνιση των τριών standards που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ποσοτικοποίηση των θετικών για τον ιό EBV δειγμάτων. Αναφέρεται το Ct για κάθε ένα από τα πρότυπα. Να σημειωθεί πως το πρότυπο με τα περισσότερα αντίγραφα του ιού ( $10^5$  αντίγραφα) (πράσινη καμπύλη) εμφανίζει μικρότερο Ct και ακολουθούν το πρότυπο με  $10^3$  αντίγραφα (Ct2) και το πρότυπο με  $10^2$  αντίγραφα (Ct3).

Τα ιϊκά αντίγραφα/αντίδραση στα δείγματα που ποσοτικοποιήθηκαν κυμαίνονταν από 10-25 και για τους 2 ιούς. Συγκεκριμένα για τον ιό CMV βρέθηκαν έως και 17 αντίγραφα / αντίδραση σε θετικό δείγμα που ανιχνεύτηκε, ενώ για τον EBV έως και 25 αντίγραφα / αντίδραση.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση των ιών EBV και CMV στον αιμοδοτικό πληθυσμό της Κεντρικής Θεσσαλίας. Με βάση την συχνότητα που ανευρέθηκε, η πιθανότητα μετάδοσης του ιού CMV στον ελληνικό πληθυσμό είναι σπάνια, ενώ η πιθανότητα μετάδοσης του ιού EBV είναι ελαφρώς αυξημένη. Ωστόσο, ο μικρός αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν πιθανώς να μην επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για τις πιθανότητες μετάδοσης των συγκεκριμένων ιών στον ελληνικό πληθυσμό.



## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ο Ιός Epstein-Barr, Στ. Κοτταρίδης, Αθήνα 1991
2. Βιολογία των μικροοργανισμών, Μ.Τ. Madigan, J.M. Martinko, J.Parcker, 2005
3. Αρχές Ιατρικής Γενετικής, T.D.Gelechter, F.S.Collins, D.Ginsburg, 2003
4. <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/herpes.htm>
5. <http://www.uq.edu.au/vdu/VDUEBV.htm>
6. [http://en.wikipedia.org/wiki/Epstein-Barr\\_virus](http://en.wikipedia.org/wiki/Epstein-Barr_virus)
7. [http://www.brown.edu/Courses/Bio\\_160/Projects2000/Herpes/EBV/EBV-Immunology.html](http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/Herpes/EBV/EBV-Immunology.html)
8. <http://www.dentistry.leeds.ac.uk/oralpath/viruses/viral%20infections/ebv.htm>
9. <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/ebv.htm>
10. <http://info.cancerresearchuk.org>
11. [http://www.brown.edu/Courses/Bio\\_160/Projects2000/Herpes/EBV/EBV-Immunology.html](http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/Herpes/EBV/EBV-Immunology.html)
12. <http://cmbi.bjmu.edu.cn/www-learn/micro-ac-uk/335/HHV4.html>
13. <http://www.bio.davidson.edu/courses/Immunology/Students/spring2006/Magargal/mononucleosis.htm>
14. <http://www.microbiologybytes.com/virology/HHV5.html>
15. <http://www.dentistry.leeds.ac.uk/oralpath/viruses/viral%20infections/CMV.htm>
16. [http://www.expasy.ch/viralzone/all\\_by\\_species/180.html](http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/180.html)
17. <http://ndt.oxfordjournals.org/cgi/content/full/18/9/1703>
18. <http://www.cdc.gov/cmV/facts.htm>
19. <http://emedicine.medscape.com/article/215702-overview>
20. [http://www.abbottdiagnostics.com.au/Your\\_Health/Infectious\\_Diseases/CMV/](http://www.abbottdiagnostics.com.au/Your_Health/Infectious_Diseases/CMV/)
21. Στοιχεία Μοριακής Βιολογίας και Μοριακής Αιματολογίας, Ν.Λαουντάρη. Χ.Μπελέση, 2005
22. [http://www.nist.gov/cstl/biochemical/genetics/cmV\\_structure.cfm](http://www.nist.gov/cstl/biochemical/genetics/cmV_structure.cfm)